

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Pharmakologie
Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

**Keratinozytenbasierte Wundaufgabe zur Förderung der
diabetischen Wundheilungsstörung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der theoretischen Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Damian Maucher

aus Neustadt a. d. Rheda (Wejherowo/ Polen)

Frankfurt am Main, 2015

Dekan:	Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Stefan Frank
Korreferent/in:	Prof. Dr. Thomas Schmitz-Rixen
Tag der mündlichen Prüfung:	06.06.2018

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1.1	Die Haut.....	1
1.1.1	Aufbau und Funktion der Haut.....	1
1.1.2	Epidermis.....	2
1.1.3	Dermis und Subkutis	4
1.2	Die akute Wundheilung der Haut	5
1.2.1	Hämostase nach Gefäßverletzung	6
1.2.2	Die Entzündungsreaktion nach Verletzung	7
1.2.2.1	Frühe Phase der Entzündung: Bedeutung der neutrophilen Granulozyten .	7
1.2.2.2	Späte Phase der Entzündung: Rolle der Wundmakrophagen.....	8
1.2.3	Die Granulationsphase: Interaktion von Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und MΦ	10
1.2.3.1	Migration und Proliferation von Keratinozyten.....	11
1.2.3.2	Matrixaufbau und Ausbildung des Granulationsgewebes.....	12
1.2.4	Remodellierung und Narbengewebe	14
1.3	Die chronische Wundheilung.....	14
1.3.1	Die Pathophysiologie chronischer Wunden	14
1.3.2	Das diabetische Fußsyndrom.....	16
1.4	Entwicklung biotechnologischer Wundauflagen	18
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	20
II	Material und Methode	21
1	Material.....	21
1.1	Chemikalien	21

1.2	Puffer und Lösungen.....	22
1.3	Kits und sonstige Materialien	23
1.4	Enzyme	23
1.5	Antikörper	24
1.5.1	Primärantikörper.....	24
1.5.2	Sekundärantikörper.....	24
1.6	Oligonukleotide	25
1.6.1	Primer für Taqman®	25
1.6.2	Primer für miScript SYBR® Green.....	25
1.7	Geräte.....	25
1.8	Computersoftware.....	26
2	Methoden	27
2.1	Herstellung des biologisch-aktiven Wunddressings (BAWD)	27
2.1.1	Ausgangsmaterialien	27
2.1.2	Beschaffenheit und Rolle des Trägermaterials.....	28
2.1.3	Herstellverfahren	28
2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.2.1	Proteinextraktion	30
2.2.2	Messung der Proteinkonzentration	31
2.2.3	Western Blot-Analyse.....	31
2.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.2.3.2	Transfer (Blotting) und Immundetektion	32
2.2.3.3	Quantifizierung mittels ImageJ	33
2.2.4	Proteome Profiler™-Array	33
2.2.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	33

2.2.6	Immunhistochemie	34
2.2.6.1	Herstellung von Paraffinschnitten	34
2.2.6.2	Herstellung von Kryoschnitten	34
2.2.6.3	Immunhistochemische Färbung	34
2.2.6.4	Immunfluoreszenz-basierte Färbung.....	36
2.2.6.5	Azan-Färbung.....	37
2.2.6.6	Opal™-Färbung	38
2.2.7	Durchflusszytometrische Untersuchungen	39
2.3	Molekulargenetische Methoden.....	40
2.3.1	Isolation von RNA mit GSCN.....	40
2.3.2	Isolation von RNA mit TRIzol	40
2.3.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	41
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	41
2.3.5	Reverse Transkription von mRNA.....	41
2.3.6	Reverse Transkription von microRNA.....	42
2.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.3.8	Real-Time Taqman®-Polymerase-Kettenreaktion.....	43
2.3.9	Illumina-Dye-Sequenzierung.....	44
2.4	Tierexperimentelle Methoden.....	47
2.4.1	Haltung der Tiere.....	47
2.4.2	Mauslinien	47
2.4.3	Wundheilungsstudien, allgemeiner Ablauf	47
2.4.4	Besonderheiten bei Applikation des BAWD.....	48
2.5	Zellkulturexperimente.....	49

2.5.1	Isolation und Zellkultur von mesenchymalen Stammzellen.....	49
2.5.2	Zellkultur von Kerationzyten und Gewinnung konditionalen Überstandes	50
2.5.3	Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Adipozyten und Osteozyten.....	50
2.5.4	FACS-basierte Detektion MSC-assoziiertes Oberflächenmoleküle	51
2.5.5	Stimulation der MSCs mit konditioniertem Kerationzyten-Überstand	52
2.6	Übersicht der Experimente	52
III	Ergebnisse	53
3.1	BAWD als zelluläres Therapeutikum zur Behandlung diabetischer Wunden.	53
3.1.1	Differentielle Genexpression als Antwort auf <i>in vitro</i> -Stimulation des BAWD mit wundrelevanten Mediatoren	54
3.1.2	BAWD-vermittelter Aufbau von Granulationsgewebe	57
3.1.2.1	Makro- und mikroskopische Wundevaluation nach BAWD-Behandlung.	57
3.1.2.2	BAWD-Interaktion mit murinem Wundgewebe	60
3.2	Auswirkung der BAWD-Behandlung auf inflammatorische Prozesse.....	62
3.2.1	Expression pro-inflammatorischer Zytokine	62
3.2.2	Chemokine.....	64
3.2.3	Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen.....	68
3.2.4	BAWD-vermittelte immunmodulatorische Effekte.....	72
3.3	BAWD induziert die Ausbildung eines funktionalen Granulationsgewebes... 74	
3.4	BAWD-vermittelte muskelspezifische Genexpression	76
3.4.1	Identifizierung differentiell exprimierter Gene	76
3.4.2	Expression Fett- und Muskel-spezifischer Gene	79
3.4.3	Detektion von muskelspezifischen Proteinen in der Wundheilung.....	80
3.4.3.1	BAWD-vermittelte Induktion in der Wunde diabetischer Tiere	80

3.4.3.2	Expression muskelspezifischer Faktoren während der akuten Wundheilung	83
3.5	BAWD-vermittelte Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen.....	87
3.5.1	BAWD-vermittelte Akkumulation von Sca1-positiven Zellen	87
3.5.2	Sca1-positive Zellen in der Wunde normal heilender Tiere.....	90
3.6	Einfluss von konditioniertem Keratinozyten-Medium auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.....	96
3.6.1	Isolation, Kultur und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen	96
3.6.2	Stimulation der MSCs mit konditioniertem Keratinozyten-Medium	101
3.7	Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse.....	103
IV	Diskussion.....	106
4.1	Verwendung biologisch-aktiver Wunddressings (BAWD) in der Behandlung diabetischer Ulzerationen	106
4.2	Moduliert das BAWD die Entzündungsreaktion nach Verletzung direkt oder indirekt?	109
4.2.1	Heilung aufgrund differenzierter Verteilung von Immunzellen.....	109
4.2.2	Heilung aufgrund der BAWD-vermittelten Differenzierung regenerativer M2-ähnlicher Makrophagen?	111
4.2.3	BAWD-vermittelte Induktion des anti-inflammatorischen TNFAIP-6-Proteins	113
4.3	MSCs in der murinen Heilung normal heilender und diabetisch-gestörter Wunden.....	115
4.4	Muskelaufbau und eine mögliche Funktion in der kutanen Wundheilung	117
V	Zusammenfassung.....	122
VI	Abstract	124
VII	Literaturverzeichnis.....	125

VIII Anhang	139
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	139
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	140
7.3 Tabellenverzeichnis	142
7.4 Whole-Genom-Sequenzierung.....	142
7.4.1 Whole-Genom-Sequenzierung nach <i>in vitro</i> -Stimulation des BAWD...	142
7.4.2 Whole-Genom-Sequenzierung nach <i>in vivo</i> -Behandlung mit BAWD...	145
7.5 Publikationen	150
7.5.1 Publikationen.....	150
7.5.2 Posterbeiträge	150
7.5.3 Vorträge.....	150

I Einleitung

1.1 Die Haut

1.1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist ein komplexes Organ, das aus verschiedenen Zelltypen aufgebaut wird (Abbildung 1.1). Sie ist mit etwa 2 m² das größte menschliche Organ und schützt in ihrer Grundfunktion den Körper gegen äußere schädigende Einflüsse wie Austrocknung, Keime und schädliche UV-Strahlung. Sie übernimmt stoffwechselrelevante und immunologische Funktionen und ist Teil der Wärmeregulation des Organismus.

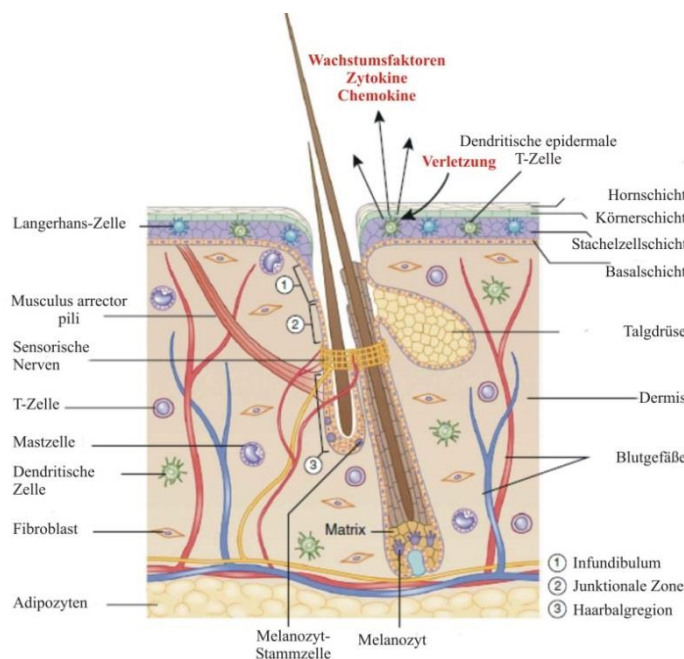


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Haut
(modifiziert nach Hsu *et al.* 2014)

Die Haut ist mit zahlreichen Sinneszellen ausgestattet, die auf die Wahrnehmung unterschiedlicher Reize spezialisiert sind. Die Schmerzempfindung erfolgt über Nozizeptoren, während die Mechanorezeptoren (Meissner-Körperchen, Merkel-Zellen, Vater-Pacini-Körperchen) Tast- und Berührungsreize vermitteln.

Die Ausübung und Funktion als Schutz- und Sinnesorgan wird durch den strukturellen Aufbau ermöglicht, der aus Epidermis, Dermis und subkutanen Regionen besteht (Abbildung 1.1). Obwohl Haarfollikel und Drüsen bis in die Subkutis hineinreichen, sind sie epidermale Strukturen und dienen u.a. als Reservoir verschiedenster epidermaler Stammzellen (ESC).

1.1.2 Epidermis

Die Epidermis ist die äußerste Schicht der Haut. Sie ist charakterisiert durch die sukzessive Enddifferenzierung basaler Keratinozyten von basal nach distal. Dadurch entstehen das *stratum basale* (Basalschicht), *stratum spinosum* (Stachelzellschicht), *stratum granulosum* (Körnerschicht), *stratum lucidum* (Glanzschicht) und abschließend *stratum corneum* (Hornschrift) (Abbildung 1.2).

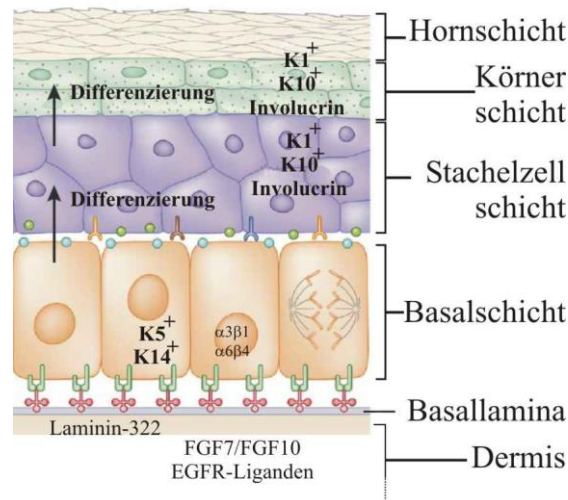


Abbildung 1.2: Epidermale Stratifizierung
(modifiziert nach Hsu *et al.* 2014)

Die Epidermis ist daher ein mehrschichtiges, stratifiziertes Plattenepithel und besteht neben Keratinozyten aus Merkel-Zellen, Melanozyten und immunologischen Zellen dendritischen Typs (Langerhans- und dendritische epidermale T-Zellen) (Abbildung 1.1). Langerhans-Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen (APC, *antigen presenting cell*), während die dendritische epidermale T-Zelle (DETC, *dendritic epidermal t cell*) ausschließlich in muriner Haut vorkommt und eine Funktion in der Homöostase der Haut durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren übernimmt. Weitere Funktionen der DETCs werden gegenwärtig erforscht [Jameson und Havran, 2007]. Die Versorgung der Haut mit essentiellen Nährstoffen, Sauerstoff und Hormonen wird durch dermale Arterien und Venen ermöglicht.

Eine zentrale Besonderheit epidermaler Homöostase ist die Regeneration und Reproduktion aus einer Basalzellschicht. Neben epidermalen Stammzellen der Haarbalgregion und der germinalen Haarzone weisen interfollikuläre Epidermisbereiche (IFE) Stammzellen auf, die in und an der Basalschicht lokalisiert sind [Mackenzie, 1997; Ghazizadeh und Taichman, 2001]. Die Basalmembran trennt die Epidermis von der Dermis und wird aus extrazellulären Matrix-(EZM)-Proteinen aufgebaut, die von basalen Keratinozyten und den darunterliegenden dermalen Fibroblasten zusammenwirkend sezerniert werden. Laminin-5 (Laminin $\alpha3\beta2\gamma2$ [Laminin-322]) wird als Hauptbestandteil der Basalmembran sezerniert und dient als Ligand für die Integrin-Rezeptoren $\alpha6\beta4$ und $\alpha3\beta1$, die auf basalen Keratinozyten exprimiert werden. Eine Besonderheit epidermaler Stammzellen ist ihre hohe $\beta1$ -Integrinexpression und die somit einhergehende starke Bindung an Komponenten der EZM [Jones und Watt, 1993]. Die Bedeutung der Integrine und ihrer Liganden wird in der genetisch-bedingten Hauterkrankung *Epidermolysis bullosa* verdeutlicht, in der Verluste der Integrinfunktion, die Abwesenheit von Lamininen oder die gestörte Bildung der Keratine 5 und 14 zu ernsthaften und massiven, großflächigen Ablösungen der Epidermis führen [Georges-Labousse et al., 1996; van der Neut et al., 1996; Homberg et al., 2015].

Die Epidermis ist ein Proliferationsgewebe, in dem epidermale Stammzellen durch ihre Fähigkeit der Regeneration und Differenzierung eine integrale Bedeutung haben. Die epidermale Stratifizierung wird durch Delamination und durch asymmetrisch-verlaufende Zellteilungen erreicht. Im Verlauf der Delamination verlieren basale Keratinozyten ihre Verknüpfung zur Basalmembran und werden nach distal befördert, wohingegen durch asymmetrisch-verlaufende Zellteilungen, die senkrecht zur Basalmembran stattfinden, eine determinierte, suprabasale Tochterzelle und eine proliferative Basalzelle generiert wird [Watt und Green, 1982; Potten und Morris, 1988; Jones und Watt, 1993; Lechler und Fuchs, 2005]. Die direkten Tochterzellen werden als transient amplifizierende Zellen (*transient amplifying cells*, TAC) bezeichnet und sind durch eine hohe Teilungsrate bei eingeschränktem, nach zwei bis fünf abgeschlossenen Zellzyklen erschöpftem Proliferationspotenzial charakterisiert [Potten und Morris, 1988; Jones und Watt, 1993].

Im Zuge epidermaler Stratifizierung unterliegen die Keratinozyten charakteristischen Veränderungen im Expressionsmuster distinkter Keratin- und Integrin-Moleküle [Sun et

al., 1983; Fuchs, 1990]. Während in basalen Keratinozyten überwiegend Keratin 5 und Keratin 14 (K5 und K14) exprimiert werden, sind Keratinozyten im *stratum spinosum* durch die Expression von Keratin 1, Keratin 10 und die zytosolische Synthese von Involucrin charakterisiert (Abbildung 1.2) [Eckert et al., 1993]. Die Ausbildung von strukturellen Tonofilamenten wird durch K1 und K10 ermöglicht und führt zu den spindelartigen Strukturen in der namensgebenden Stachelzellschicht [Eichner et al., 1986]. In diesem Differenzierungsprozess werden zudem interzelluläre Verknüpfungen durch Hemidesmosomen verstärkt [Green und Simpson, 2007].

Das *stratum basale* und *stratum spinosum* werden zusammenfassend als *stratum germinativum* (Keimschicht) bezeichnet. Im weiteren Verlauf der Stratifizierung erfahren differenzierende Keratinozyten einen markanten zellulären Umbau. Im *stratum granulosum* nehmen sie eine abgeflachte Zellform an und sind durch die Synthese von Vorläufersubstanzen des so genannten *cornified envelope* charakterisiert. Spezielle Enzyme, die Transglutaminasen, sind zur Ausbildung von quervernetzten Strukturen mittels Proteolyse aus den Vorläufersubstanzen wie Loricrin, Involucrin, kleinen Prolin-reichen Proteinen (small prolin-rich proteins, SPR) und Proelafin verantwortlich [Eckert et al., 2005]. Der vollständige Aufbau epidermaler Barrierefunktion im *stratum corneum* wird durch die Synthese einer fetthaltigen, wasserabweisenden Schicht, des so genannten *lipid envelope*, erreicht. In diesem terminalen Stadium sind die Keratinozyten metabolisch inaktiv, ohne nennenswerte Zellorganellen und vollständig ausdifferenziert. Das *stratum corneum* als Endpunkt terminaler Differenzierung unterliegt einer permanenten Desquamation, in der die äußersten Zellen durch das Nachkommen neuer Zellen abgetragen werden (müssen), um Hauterkrankungen wie Hyperkeratose zu verhindern.

1.1.3 Dermis und Subkutis

Die Basalmembran trennt die epidermalen Schichten vom Mesenchym und ist für die Integrität der Epidermis von zentraler Bedeutung. Die Dermis ist sowohl für die Verankerung der Epidermis als auch an ihrer Ernährung und Versorgung beteiligt und wird anatomisch in zwei Regionen unterteilt: das *stratum papillare* (Papillarschicht) und das *stratum reticulare* (Netzschicht). Trotz epidermaler Abstammung sind Hautdrüsen und Haarwurzeln überwiegend in der Dermis eingebettet. Das *stratum papillare* charakterisiert sich durch zahlreiche Blut- und Lymphgefäße, bündelt die meisten Sinnesrezeptoren der Haut und generiert durch papillare Strukturen eine große Kontaktfläche zur Epi-

dermis, durch die eine hohe Reißfestigkeit und eine erleichterte Abgabe von Nährstoffen ermöglicht wird. Die Interzellularräume (Interstitium) lassen eine freie Bewegung der in diesem Gewebe vorliegenden Immunzellen zu (Abbildung 1.1). Der bedeutendste Zelltyp dieses Hautkompartiments ist der Fibroblast. Neben der Synthese wichtiger EZM-Proteine und weiterer Strukturproteine, stehen Fibroblasten mit unterschiedlichen Zelltypen der Haut, besonders mit Keratinozyten, in enger Interaktion [Werner et al., 2007]. Fibroblasten produzieren Kollagen I, III und Elastine, und garantieren somit die Elastizität der Dermis, während extrafibrilläre Matrixkomponenten für zusätzliche Strukturfestigkeit sorgen und hauptsächlich aus Glykosaminoglykanen (vorwiegend Hyaluronan), Proteoglykanen und Glykoproteinen bestehen [Couchman, 1993; Chen und Abatangelo, 1999; Vigetti et al., 2014]. Das proximale *stratum reticulare* zeigt im Unterschied zum distalen *stratum papillare* eine wesentlich kompaktere Anordnung und höhere Anzahl von Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen, ist aber zellärmer.

Im subkutanen Gewebe finden sich zahlreiche Adipozyten (Abbildung 1.1). Die Subkutis dient vorwiegend zur Wärmeisolation und Stoßdämpfung und besteht größtenteils aus Blutgefäßen und lockerem Bindegewebe, das durch Sehnen mit den darunterliegenden Strukturen (Knochen, Faszien) verbunden wird.

1.2 Die akute Wundheilung der Haut

Die Wundheilung der Haut ist ein komplexer Vorgang, der nach Verletzung Regenerations- und Reparaturprozesse in Gang setzt und die Wiederherstellung der Integrität des Gewebes zum Ziel hat. Die Fähigkeit auf eine Verletzung zu reagieren ist eine fundamentale Eigenschaft multizellulärer Organismen, mit der Aufgabe, interne Flüssigkeiten innen und externe Pathogene außen zu halten [Gurtner et al., 2008].

Wir unterscheiden nach heutigem Wissenstand vier zeitlich und lokal überlappende, dynamische und interaktive Phasen der akuten Wundheilung: Hämostase, Inflammation, Reepithelialisierung und Ausbildung von Granulationsgewebe, sowie Wundkontraktion und Remodellierung (Abbildung 1.3) [Martin, 1997; Singer und Clark, 1999; Gurtner et al., 2008].

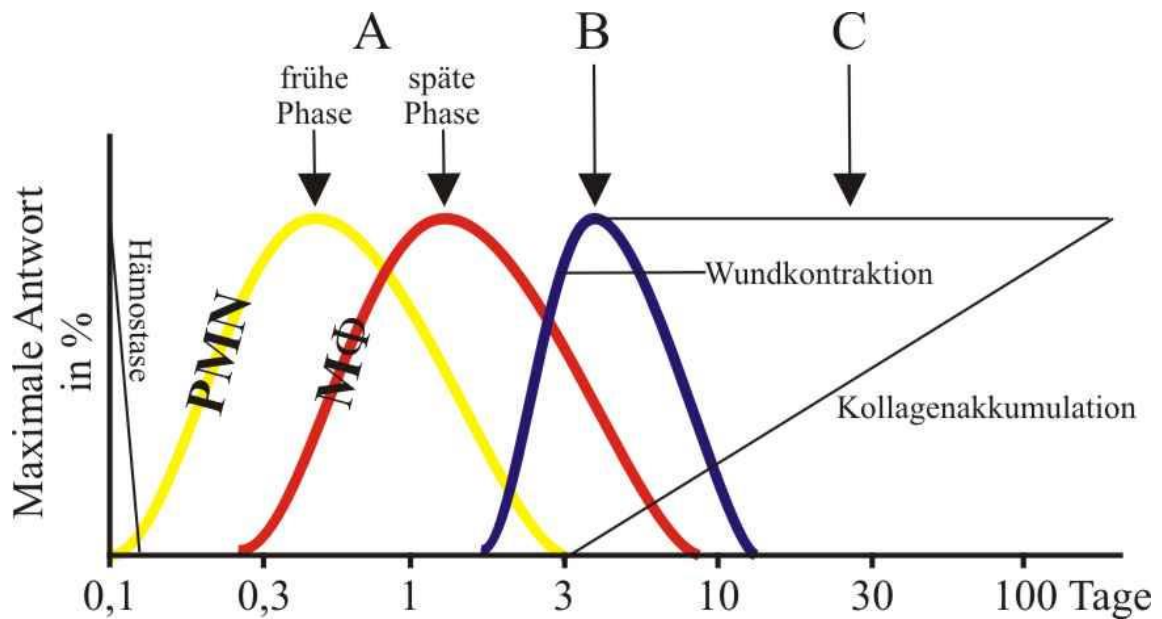


Abbildung 1.3 – Phasen kutaner Wundheilung

Der Wundheilungsprozess setzt sich aus folgenden Phasen zusammen: Hämostase; (A) frühe und späte Entzündungsphase; (B) Granulationsphase; (C) Remodellierungsphase. Der Zeitpunkt der Wundkontraktion ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Mit der Bildung des Granulationsgewebes setzt die Kollagenakkumulation ein. PMN: polymorphkernige neutrophile Granulozyten, MΦ: Makrophagen (modifiziert nach Clark, 1996)

1.2.1 Hämostase nach Gefäßverletzung

Die Hämostase führt zur Ausbildung temporärer Thrombozytenaggregate, die die Koagulationskaskade einleiten. Zentral sind die Bildung einer Fibrinmatrix (Fibringerüst) aus Fibrin- und EZM-Bestandteilen wie Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin [Davie et al., 1991; Martin, 1997]. Dabei ist die Aktivierung von Thrombin für die Hämostase von zentraler Bedeutung [Li et al., 2007]. Neben der Funktion als provisorische Migrationsmatrix verschiedener in der Wundheilung involvierter Zellen dient das entstehende Fibringerüst als Reservoir an Zytokinen und Wachstumsfaktoren [Clark et al., 1982; Martin, 1997; Greiling und Clark, 1997]. Zudem werden im Blutkreislauf zirkulierende Neutrophile im Fibringerüst eingeschlossen und ergänzen dort die Sekretion wichtiger Mediatoren. Mediatoren aus Thrombozyten sind: *platelet-derived growth factor* (PDGF), *insulin-like 1 growth factor* (IGF-1), *epidermal growth factor* (EGF) und *transforming growth factor-β* (TGF-β1 und β2). Diese Faktoren sind vasokonstriktorisch, aggregations- und adhäsionsfördernd und repräsentieren ein starkes Initiationssignal zur Einleitung der inflammatorischen Phase der Wundheilung [Martin, 1997; Singer und Clark, 1999].

1.2.2 Die Entzündungsreaktion nach Verletzung

1.2.2.1 Frühe Phase der Entzündung: Bedeutung der neutrophilen Granulozyten

Die endothelialen Adhäsionsproteine wie P- und E-Selektin, *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 und -2, sowie *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM)-1 vermitteln über die Interaktion mit leukozytären Integrinen (CD11/CD18-Cluster) die Transmigration von Neutrophilen und später von Monozyten in das Wundgewebe (Leukodiapedese). Darüber hinaus wird durch chemotaktische Signale wie bakterielle Peptide, Chemokine und Wachstumsfaktoren die Diapedese von Neutrophilen begünstigt [Engelhardt et al., 1998; Gillitzer und Goebeler, 2001]. Polymorphkernige Leukozyten (PMN) treffen innerhalb weniger Minuten in das Wundareal ein [Martin und Leibovich, 2005]. Die wesentlichste Funktion von PMN besteht in der Phagozytose und Eliminierung von Bakterien. Um diese Aufgabe zu erfüllen, setzen PMN u.a. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Proteasen wie Elastase, Cathepsin-G oder Proteinase-3 frei. Zusätzlich sekretieren PMN wichtige pro-inflammatorische Zytokine (Interleukin-1- β [IL-1 β] und Tumor-Nekrose-Faktor- α [TNF- α]), die die Aktivierung von Fibroblasten und Keratinozyten bewirken [Weiss, 1989; Hübner et al., 1996; Eming et al., 2007]. Zudem sekretieren PMN Chemokine und Wachstumsfaktoren, die an der Initiierung heilungsrelevanter Prozesse beteiligt sind [Martin, 1997; Gillitzer und Goebeler, 2001; Eming et al., 2007].

Dennoch wird die essentielle Funktion von PMN in der Wundheilung kontrovers diskutiert. Die Neutralisierung der PMN führte nicht zur Verschlechterung der Heilung [Simpson und Ross, 1972], vielmehr wurde sogar durch die Neutropenie eine wundheilungsförderliche Situation mit beschleunigter Reepithelialisierung erreicht [Dovi et al., 2003]. Allerdings wird das Verständnis für die Bedeutung von Neutrophilen in der Wundheilung durch die Beobachtung erschwert, dass aus akuten Wunden isolierte Neutrophile in der Lage sind, den Phänotyp und das Zytokinexpressionsmuster von Makrophagen (M Φ) zu modulieren und damit regulierend in die Immunantwort einzugreifen [Daley et al., 2005]. In CD18-depletierten Mäusen (Integrin β -2) wurde eine wichtige, direkte Interaktion von Neutrophilen mit Wund-M Φ gezeigt. Apoptotische Neutrophile sind ein wichtiger Faktor in der Aktivierung von M Φ zur Produktion und Sekretion anti-inflammatorischer Moleküle, von TGF- β 1 und Prostaglandin E2. Durch den Verlust des Integrin- β 2-Rezeptors sind Neutrophile nicht in der Lage, in das Wund-

areal zu emigrieren. In Konsequenz ist eine Aktivierung von Wund-M Φ verhindert und die Wundheilung dieser Tiere mit einem Mangel an Myofibroblasten und gestörter Wundkontraktion in Verbindung gebracht [Savill und Fadok, 2000; Peters et al., 2005].

1.2.2.2 Späte Phase der Entzündung: Rolle der Wundmakrophagen

Die Infiltration von PMN in die Wunde endet bei Abwesenheit einer Infektion nach 2 bis 3 Tagen vollständig [Martin, 1997; Singer und Clark, 1999]. Monozyten emigrieren – neben der Ausbildung von CD11/CD18-Komplexen und ICAM-1/-2-Expression – zusätzlich durch Interaktion des *very late antigen-4* (VLA-4; $\alpha 4\beta 1$ -Integrin) mit dem endothelialen *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) aus dem Blutkreislauf in die Wunde [Issekutz, 1995; Cotran und Mayadas-Norton, 1998].

Die Infiltration von Monozyten ist durch Gradienten unterschiedlicher, chemotaktischer Faktoren reguliert. Neben Wachstumsfaktoren und pro-inflammatorischen Zytokinen sind CC-Chemokine essentiell (CCL2 [*monocyte chemoattractant protein-1*/ MCP-1], CCL3 [*macrophage inflammatory protein-1 α* /MIP-1 α] und CCL5 [*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*/ RANTES]) [DiPietro et al., 1995; Frank et al., 2000; Wetzler et al., 2000]. Dabei steht insbesondere CCL2 (murines Homolog: MCP-1/JE) als eines der wichtigsten Chemokine zur Rekrutierung von Monozyten im Fokus [Baggiolini, 2001; Christopherson und Hromas, 2001]. MCP-1- *knock out*-Mäuse zeigen eine verzögerte Reepithelialisierung, Vaskularisierung, sowie eine reduzierte Kollagensynthese [DiPietro et al., 1995; Low et al., 2001]. Interessanterweise war die absolute Anzahl an Wundmakrophagen in diesen *knock out*-Tieren unverändert, so dass CCL2 einen Faktor für die Aktivierung von M Φ repräsentiert [Low et al., 2001]. Als hauptsächliche Quellen der genannten Faktoren wurden aggregierte Blutplättchen, dermale Fibroblasten, Endothelzellen, PMN und M Φ , sowie mitogene/ mitotische Wundrand-Keratinocyten identifiziert [Gibran et al., 1994; Engelhardt et al., 1998; Jackman et al., 2000].

Auf die grundlegende Bedeutung von M Φ in der Wundheilung wurde in Depletionsstudien schon in den 1970er Jahren hingewiesen. Diese Studie zeigte, dass durch M Φ -Depletion die Rekrutierung von Wundfibroblasten, sowie die Beseitigung von PMN, Erythrozyten und Wunddebris massiv beeinträchtigt waren [Leibovich und Ross, 1975].

In einer neueren Arbeit, in der durch lysM-Cre/DTR-System (Diphtheriatoxin-Rezeptor) eine konditionale Makrophagendepletion erreicht wurde, konnte diese frühe Beobachtung bestätigt werden [Goren et al., 2009]. In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass M Φ für die Neo-Vaskularisierung, die Ausbildung kontraktiler Myofibroblasten sowie die VEGF-Expression notwendig sind.

Die Infiltration in das Wundgewebe bewirkt eine Differenzierung von Monozyten zu aktivierten Wundmakrophagen. Dieser Aktivierungsprozess wird durch Mediatoren im Wundgewebe eingeleitet und ist entscheidend, um die vollständige Adaptation der aktivierten M Φ auf die Wundsituation zu erlauben [Gordon, 2003; Pinhal-Enfield et al., 2003; Eming et al., 2007]. Aktivierte M Φ können in drei Gruppen eingeteilt werden: klassisch aktivierte, pro-inflammatorische Makrophagen (M1); alternativ aktivierte, regenerative Makrophagen (M2) und regulatorische M Φ [Mosser und Edwards, 2008]. Die Stimulation mit IFN- γ und bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) begünstigt die Ausbildung klassisch aktivierter Makrophagen (M1), die zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-6 befähigt sind und in der Th-1-vermittelten Immunantwort eine bedeutende Rolle spielen [Mantovani et al., 2004]. Alternativ aktivierte, regenerative Makrophagen (M2) entstehen durch eine Stimulation mit IL-4 und IL-13 im Zuge einer Th2-vermittelten Immunantwort. Die Differenzierung kann durch eine verstärkte Expression des Mannoserezeptors (MR) und parallel einsetzender, erhöhter Aktivität des Arginase I-Enzyms identifiziert werden [Gordon, 2003; Mosser und Edwards, 2008; Gordon und Martinez, 2010]. Regulatorische Makrophagen sind zur Sekretion pro-inflammatorischer Moleküle und anti-inflammatorischer Mediatoren wie IL-10 befähigt und erfüllen u.a. eine tragende Rolle in der Termination der inflammatorischen Immunantwort, sowie in der Differenzierung von Endothelzellen und Keratinozyten. Durch die Produktion von Wachstumsfaktoren wie dem *heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF) beteiligen sie sich zudem direkt an Prozessen der Wundheilung und Angiogenese [Moore et al., 2001; Mosser und Zhang, 2008; Edwards et al., 2009; Fleming und Mosser, 2011].

M Φ wird eine zentrale Rolle in der Geweberegeneration zugesprochen. M Φ sezernieren eine große Anzahl potenter Wachstumsfaktoren wie *transforming growth factor- α* und β (TGF- α und TGF- β), *fibroblast growth factor* (FGF), *platelet derived growth*

factor (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und CXCL8. Diese Mediatoren stimulieren die Synthese von EZM und die Zellproliferation residenter Hautzellen [Koch et al., 1992; DiPietro und Polverini, 1993]. M Φ produzieren zudem Fibronectin, um die Migration von Fibroblasten und Endothelzellen in das Wundgewebe zu initiieren [Cheng et al., 1988; Brown et al., 1993]. M Φ sind die wichtigsten, regulatorischen Zellen in der inflammatorischen Immunantwort. Sie phagozytieren, lysieren und töten Pathogene. Sie bereinigen die Wunde von zellulären Trümmern (Debris) und eliminieren apoptotische und verbliebene PMN [Singer und Clark, 1999; Meszaros et al., 2000; Martin und Leibovich, 2005; Li et al., 2007]. Die phänotypische Aktivitätsänderung von pro-inflammatorischen zu regenerativen M Φ wird zum Teil der Phagozytose von Zelltrümmern und apoptotischer Zellen (insbesondere Neutrophile) zugesprochen [Daley et al., 2005; Novak und Koh, 2013]. Über eine Vielzahl an Oberflächenrezeptoren wie Toll-like-Rezeptoren (TLR), Komplement-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren und Scavenger-Rezeptoren interagieren M Φ mit ihrer Umgebung und stellen eine wichtige Funktion als Antigen-präsentierende Zelle dar [Peiser und Gordon, 2001; Gordon, 2003; Taylor et al., 2005].

Zusammenfassend wird heute den M Φ in der Wundheilung eine essentielle Rolle in dem Übergang der inflammatorischen in die regenerative Phase zugesprochen [Martin, 1997; Singer und Clark, 1999; Li et al., 2007; Gurtner et al., 2008]. M Φ stehen allerdings auch im Verdacht, an der pathophysiologischen Ursache chronischer Wunden beteiligt zu sein [Loots et al., 1998; Falanga, 2005]. Durch Untersuchungen in diabetischen Tiermodellen konnte ein interessanter Zusammenhang zwischen einer massiv verlängerten Immunantwort und überschießendem M Φ -Influx in das Wundgewebe aufgezeigt werden [Wetzler et al., 2000; Goren et al., 2003; Goren et al., 2007].

1.2.3 Die Granulationsphase: Interaktion von Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und M Φ

In der Granulationsphase wird die in der Hämostase gebildete provisorische Matrix durch ein strukturiertes Gewebe ersetzt. Zeitlich überlappend erfolgt der Übergang aus der inflammatorischen Phase in die Granulationsphase, die mit dem Wundschluss durch Migration und Proliferation von Keratinozyten, dem Matrixaufbau durch Fibroblasten und die Ausbildung von Blutgefäßen durch Endothelzellen gekennzeichnet ist. Im Mit-

telpunkt dieser Prozesse nehmen MΦ durch die Bereitstellung verschiedener Mediatoren (s.o.) eine zentrale Rolle ein [Coulombe, 2003; Li et al., 2007; Werner et al., 2007; Gurtner et al., 2008].

1.2.3.1 Migration und Proliferation von Keratinozyten

Die Reepithelialisierung führt zur Ausbildung einer Neo-Epidermis. Die Prozesse von Proliferation und Differenzierung sind für die Reepithelialisierung zentral und beinhalten die Migration und Proliferation von Keratinozyten, die Differenzierung des Neoepitheliums in die stratifizierte Epidermis sowie der Restrukturierung der Basalmembran. Die Migration der Keratinozyten ist ein frühes und wichtiges Ereignis in der Reepithelialisierung der Wunde (Li et al., 2007). Epidermale Stammzellen differenzieren und sichern so die kontinuierliche Verfügbarkeit des für einen raschen Wundschluss essentiellen Zelltyps ab [Ito et al., 2005; Mascré et al., 2012]. Die Migration der Keratinozyten wird durch die Expression von Wachstumsfaktoren wie *keratinocyte growth factor* (KGF-1/-2, [FGF-7/-10]), TGF- α und - β und *epidermal growth factor* (EGF), pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6 und TNF- α), Keratinen, Chemokinen und Matrixmetalloproteinasen moduliert. Als Konsequenz erfahren innerhalb weniger Stunden Keratinozyten aus der basalen und suprabasalen Zellschicht eine charakteristische, phänotypische Veränderung [Werner und Grose, 2003; Barrientos et al., 2008]. Um die Migration einzuleiten, werden zahlreiche Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte aufgelöst [Gabbiani et al., 1978; Goliger und Paul, 1995; Paladini et al., 1996; Singer und Clark, 1999; Coulombe, 2003]. Die Expression und Reorganisation diverser Integrin-Rezeptoren auf epidermalen Zellen ermöglicht die Interaktion mit Bestandteilen der provisorischen Matrix (Fibronectin und Vitronectin) und bewirkt, dass migrierende Keratinozyten einwandern können [Martin, 1997; Singer und Clark, 1999]. Die Degradation der provisorischen Matrix in Migrationsrichtung ist für die Migration der Keratinozyten notwendig und wird durch zahlreiche proteolytische Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) und gewebespezifische Plasminogenaktivatoren (t-PA und u-PA) ermöglicht [Martin, 1997; Madlener et al., 1998]. Gleichzeitig zur Migration der Keratinozyten in die Wundmitte erfolgt eine Ablagerung von Laminin-322, das einen wesentlichen Bestandteil der Basallamina ausmacht und die Neubildung der Basalmembran initiiert [Nguyen et al., 2000].

Epidermale Zellen am Wundrand durchlaufen einen Proliferationsschub und bilden das hyperproliferative Epithel (HE). Das HE ist Quelle der für die Migration notwendigen Keratinozyten, um die Ausbildung eines raschen Wundschlusses zu ermöglichen. Epidermale Wachstumsfaktoren wie EGF, HB-EGF und TGF- α aktivieren die Proliferation der Keratinozyten [Werner et al., 1994; Raja et al., 2007; Barrientos et al., 2008]. Von essentieller Bedeutung in der Aktivierung von Keratinozyten sind die Wachstumsfaktoren KGF-1 und KGF-2 (FGF-7 und FGF-10) [Werner et al., 1992; Guo et al., 1996]. Sie werden von Fibroblasten sekretiert und aktivieren parakrin den KGF-Rezeptor (FGF-2IIIB-Rezeptor), der ausschließlich auf Keratinozyten exprimiert wird [Werner et al., 1992; Ornitz et al., 1996; Emoto et al., 1997]. Der KGF-Rezeptor wird als einer der wichtigsten Rezeptoren in epidermalen Prozessen angesehen, da der *knock out* des KGF-Rezeptors u.a. mit einer deutlich verzögerten Reepithelialisierung assoziiert ist [Werner et al., 1994].

Der Aufbau der Basallamina beendet den erfolgten Wundschluss. Die Basalmembran wird von den Wundrändern hin zur Wundmitte aufgebaut und durch die Wiederherstellung hemidesmosomaler, Kollagen XVII-reicher Verknüpfungen auf Seiten der Basalkeratinozyten begleitet [Gipson et al., 1988]. Die dermale Verankerung wird durch die Ausbildung von Fibrillen ermöglicht, die hauptsächlich aus Kollagen IV aufgebaut sind [Powell et al., 2005; Hasegawa et al., 2007].

1.2.3.2 Matrixaufbau und Ausbildung des Granulationsgewebes

Die Wiederherstellung der Dermis erfolgt durch die Bildung von Granulationsgewebe mit einhergehender Ausbildung neuer Blutgefäße, der Akkumulation von Fibroblasten und Endothelzellen, sowie der Kollagen-haltigen EZM-Synthese [Martin, 1997; Singer und Clark, 1999; Li et al., 2007].

Die in der Hämostase gebildete provisorische Matrix hat eine zentrale Funktion in der Ausbildung des Granulationsgewebes. Sie stellt die Matrix für die Migration der M Φ , Fibroblasten und Endothelzellen. Die aktivierten M Φ (siehe 1.2.2.2) sezernieren zahlreiche Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF- β , EGF, FGF und stimulieren so die Migration und Proliferation von Fibroblasten. EZM-Komponenten und Bestandteile der Fibrinmatrix sind ebenfalls in der Lage, Fibroblasten zu aktivieren [Gray et al., 1995]. Eine wichtige Funktion in der Ausbildung des Granulationsgewebes und der Reepithelialisie-

Die Funktion von FGF-2 wird durch die Tatsache erfüllt, dass er nach Verletzung in hoher Konzentration im Wundgewebe vorliegt. Dabei wird FGF-2 in Basalkeratinozyten normaler und hyperproliferativer Epidermis exprimiert [Kurita et al., 1992; Ortega et al., 1998; Werner und Grose, 2003; Sogabe et al., 2006]. Die Migration von Fibroblasten in das Wundareal wird durch den Umbau von Adhäsionsproteinen begleitet und bewirkt, dass Fibroblasten ihre Integrinvermittelte Adhäsion an Kollagen-I (α 2-Integrine) durch Bindungsproteine für die provisorische Matrix (Fibronectin, Vitronectin) (α 3- und α 5-Integrine) ersetzen [Xu und Clark, 1996; Singer und Clark, 1999]. Der Migrationsprozess setzt erneut die Sekretion proteolytischer Kollagenasen, Gelatinasen und MMPs voraus [Vaalamo et al., 1997; Madlener et al., 1998].

Eine wichtige Aufgabe der Fibroblasten besteht in der Synthese einer neuen, kollagenreichen Matrix und erfolgt in etwa eine Woche nach Verletzung [McClain et al., 1996]. Zeitgleich erfahren Teile der Wundfibroblasten myofibroblastäre Differenzierung. Sie exprimieren zytoplasmatisches *a-smooth muscle actin* (α -SMA), *non-muscle myosin II* (NM2) und Desmin, und entwickeln starke kontraktile Kräfte, um die Wundoberfläche zu verkleinern [Hinz et al., 2007]. Diese Differenzierung wird hauptsächlich durch TGF- β 1 und PDGF, durch Spleißvarianten von Fibronectin und über veränderte mechanische Signale induziert [Grinnell, 1994; Desmouliere et al., 2005].

Als Antwort auf eine Verletzung erfolgt die Aktivierung von Endothelzellen und ihre Aussprossung in die Wunde [Martin, 1997; Potente et al., 2011]. Hypoxische Bedingungen am Wundareal gelten primär als auslösendes Moment für den vielschichten Prozess der Angiogenese [Carmeliet und Jain, 2011]. Neben Fibroblasten, Mastzellen und Keratinozyten stellen aktivierte Wundmakrophagen eine wichtige Quelle verschiedener Faktoren dar, die die Ausbildung neuer Blutgefäße einleiten [Goren et al., 2009]. Im Wesentlichen sind dabei die Wachstumsfaktoren FGF-1, FGF-2, HB-EGF, TGF- β , Angiogenin, Angiopoetin-1 und -2, VEGF und Trypsin, sowie Bestandteile der EZM in die Aktivierung von Endothelzellen involviert [Frank et al., 1996; Tonnesen, 2000; Kämpfer et al., 2001; Werner und Grose, 2003; Carmeliet und Jain, 2011].

1.2.4 Remodellierung und Narbengewebe

Die letzte Phase der Wundheilung beginnt nach Wundschluss und kann über einen längeren Zeitraum andauern [Levenson et al., 1965; Li et al., 2007]. Die überproportional aufgebaute Kapillar- und Zelldichte aus der Granulationsphase wird mittels Apoptose normalisiert [Desmouliere et al., 1995; Greenhalgh, 1998]. Eingewanderte, aktivierte MΦ verlassen größtenteils das Wundareal oder gehen in Apoptose, wobei einige MΦ im Wundareal verbleiben und der Überwachung dienen, wenn die Aktivierung TLR-vermittelter, anti-apoptotischer Signale induziert wurde [Haase et al., 2003]

Die apoptotischen und auswandernden Zellen hinterlassen eine azelluläre Wunde, die hauptsächlich aus einem Netzwerk von Kollagenen und EZM-Bestandteilen besteht. In der Remodellierungsphase wird die Kollagen-III-reiche Matrix in überwiegend aus Kollagen-I-bestehende Fibrillen umgebaut. Dieser Umbau wird durch MMPs *und tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) reguliert [Madlener et al., 1998], die von Fibroblasten, MΦ, Endothelzellen und Keratinozyten sezerniert werden. Der Umbau beendet den Geweberegenerationsprozess, der durch die fehlende Ausbildung epidermaler Strukturen wie Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen charakterisiert ist [Martin, 1997; Singer und Clark, 1999; Gurtner et al., 2008].

1.3 Die chronische Wundheilung

1.3.1 Die Pathophysiologie chronischer Wunden

In der akuten Wundheilung können Komplikationen auftreten. Gründe sind u.a. Infektionen, sowie systemische Grunderkrankungen wie Typ-2-Diabetes mellitus, die den Heilungserfolg massiv beeinträchtigen [Falanga, 2005].

Eine Wunde wird als chronisch bezeichnet, wenn nach 4-12 Wochen unter fachgerechter Therapie kein Heilungsprozess einsetzt. Die drei häufigsten chronischen Wundsituationen werden in vaskuläre Ulzera (venösen oder arteriellen Ursprungs), in Druckulzera (Dekubitalgeschwüre) und in Ulzerationen diabetischer Pathogenese (diabetisches Fußsyndrom, DFS) unterteilt [Menke et al., 2007]. Für chronische Heilungsstörungen sind fehlende Übergänge der Wunde oder Wundteilbereiche zur nächsten Heilungsphase charakteristisch, so dass sie in einen chronisch-entzündlichen Status verfallen [Loots et al., 1998; Falanga, 2005; Brem und Tomic-Canic, 2007].

Die Chronifizierung einer Wunde lässt sich auf zahlreiche Fehlregulationen zurückführen, die oft in Assoziation zu einer Grunderkrankung stehen [Falanga, 2005]. Eine massive, verlängerte inflammatorische Antwort wird als Grundbedingung chronischer Wunden angesehen und ist mit einer fortwährenden Infiltration der Wunde durch Neutrophile und M Φ begleitet [Fahey et al., 1991; Loots et al., 1998; Wetzler et al., 2000; Diegelmann, 2003]. Diese anhaltende Infiltration resultiert in der Synthese hoher Mengen pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β . Die hohe Zellzahl an PMN steht zudem im Zusammenhang mit einem Anstieg proteolytischer Enzymaktivität und der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale [Wysocki et al., 1993; Yager et al., 1996; Madlener et al., 1998; Lobmann et al., 2002; Menke et al., 2007]. Die hohe Expression pro-inflammatorischer Mediatoren verursacht einen vermehrten Influx aktivierter M Φ und bewirkt dazu die Inaktivierung verschiedener Proteinaseinhibitoren (TIMP) [Vaalamo et al., 1999, Barrick et al., 1999]. In Konsequenz dieser unkontrollierten Enzymaktivität erfolgt ein überproportionaler Abbau von EZM-Bestandteilen [Grinnell und Zhu, 1996]. Von fundamentaler Tragweite ist der proteolytische Abbau wichtiger Wachstumsfaktoren (PDGF und VEGF). Obwohl die Induktion und Produktion dieser Wachstumsfaktoren nach Verletzung in chronischen Wunden im Vergleich zu akuten Wunden erhöht sind [Frank et al., 1995; Lauer et al., 2000], zeigen Quantität und Bio-Verfügbarkeit signifikante Reduktionen auf [Pierce et al., 1995; Mast und Schultz, 1996; Beer et al., 1997].

Die anhaltende inflammatorische Phase wird von phänotypischen Veränderungen epithelialer und dermaler Zellen in chronischen Wunden begleitet. Fibroblasten aus chronischen Wunden zeigen ein abgeschwächtes mitogenes Potential [Bucalo et al., 1993; Agren et al., 1999; Loot et al., 2002], verminderte Produktion und Expression von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren [Vasquez et al., 2004] und eine verzögerte Migration [Lerman et al., 2003]. Der „chronische Phänotyp“ epidermaler Zellen heilungsdefizienter Wunden ist durch eine starke Ki67-Expression, eine ausgeprägte Überexpression Zellzyklus-assoziierte Gene wie CDC2 und CyclinB1, sowie durch eine erhöhte Aktivität des Wnt/ β -Catenin/c-myc-Signalweges charakterisiert [Stojadinovic et al., 2005] und deutet zusammenfassend auf einen hyperproliferativen Zellstatus hin, der in der Ausbildung Kallus-ähnlicher Strukturen am Wundrand resultiert und die Reepithelialisierung verhindert [Usui et al., 2008; Stojadinovic et al., 2008].

Zusätzlich zu den Veränderungen in MMP-Aktivität und dem abnormen Migrationsverhalten von Fibroblasten und Keratinozyten werden diese Störungen durch ein dysbalanciertes EZM-Mikromilieu amplifiziert und verhindern einen Übergang in die weiteren Wundheilungsphasen [Menke et al., 2007].

1.3.2 Das diabetische Fußsyndrom

Diabetische Fußulzera (Diabetisches Fußsyndrom, DFS) sind ein schwerwiegendes Problem für das Gesundheitswesen. DFS-assoziierte Komplikationen sind der hauptsächliche Grund für Krankenhauseinweisungen und Amputationen diabetischer Patienten [Steed et al., 2008]. Insgesamt werden in Deutschland jährlich circa 60000 Amputationen vorgenommen, von denen 70 % Diabetes mellitus-bedingt sind. Die Prävalenz einer DFS-Erkrankung liegt bei 2 bis 10 % aller diabetischen Patienten, die Neuerkrankungsrate beträgt 2 bis 6 % jährlich [Morbach et al., 2014]. DFS ist von großer ökonomischer Bedeutung. Da die diabetische Grunderkrankung und dadurch bedingte Amputationen vor allem in höheren Lebensalter auftreten, ist auch angesichts des demographischen Wandels davon auszugehen, dass sich die Zahl der DFS-Erkrankung und Amputationen der unteren Extremitäten erhöhen wird [Buchberger et al., 2010].

Das diabetische Fußsyndrom (DFS) basiert hauptsächlich auf neuropathischen Störungen in Assoziation mit Hyperglykämie und peripheren arteriellen, mikro- und makrovaskulären Erkrankungen [Boulton, 2004; Brem und Tomic-Canic, 2007]. Neuropathische Störungen in diabetischen Patienten sind in motorischen, autonomen und sensorischen Komponenten des Nervensystems manifestiert und treten zusammen in Polyneuropathien (PNP) auf, die die Behandlungssituation deutlich verschlechtern [Falanga, 2005]. Verluste motorischer Innervation führen zu Imbalancen zwischen muskulärer Flexion und Extension und verursachen anatomische Fußdeformationen. Neuropathien des autonomen Nervensystems bewirken eine verminderte Schweiß- und Talgdrüsenfunktion und resultieren in trockenen, rissigen und für Verletzungen/ Infektionen anfälligeren Füßen [Clayton und Elasy, 2009]. Durch den Verlust sensorischer Neuronen wird die Entwicklung von Ulzerationen begünstigt, weil Traumata an den betroffenen Stellen nicht wahrgenommen und somit nicht behandelt werden. In Konsequenz unterliegt der offene Wundbereich dauerhafter Belastung, der letztlich chronifiziert [Cavanagh et al., 2005; Dinh und Veves, 2005].

Die persistierende, fehlgesteuerte inflammatorische Antwort und die phänotypische Veränderung in der Zellaktivität von Fibroblasten und Keratinozyten (siehe 1.3.1) tragen in diabetischen Wunden ebenfalls zur Chronifizierung bei. Zudem ist der hyperglykämische Grundzustand mit einer Matrixglykolyse assoziiert, die die vorzeitige Zellseneszenz und Zellapoptose einleitet und zur Inhibition von Migrations- und Proliferationsereignissen, sowie zu gestörten Blutgefäßausprossungen führt [Vlassara, 2005; Reigle et al., 2008; Liao et al., 2009].

Die klinische Grundversorgung diabetischer Fußulzera besteht aus einer konservativen Lokalthherapie und beinhaltet das Debridement (Wundausschneidung) avitaler Gewebeteile durch chirurgische, enzymatische, biologische und autolytische Prozesse, die Reinigung der Wundoberfläche, eine wiederkehrende Infektionskontrolle und Druckentlassung des Ulcus [Doupis und Veves, 2008]. Zusätzlich zur Standardwundversorgung haben ergänzende Therapien mit Sauerstoff-Überdruck (*hyperbaric oxygen therapy*) oder Vakuum (*negative pressure wound therapy* NPWT) in die Behandlung von DFS Einzug gefunden, allerdings kann die aktuelle, klinische Evaluation weder einen ausreichenden Beleg der Wirksamkeit, noch eine adäquate Kosten-Nutzen-Wirkung erbringen [Alexiadou und Doupis, 2012].

In den vergangenen Jahren ist die Marktzulassung verschiedener Wachstumsfaktoren wie dem thrombozytären Faktorgemisch PDWGF (*platelet-derived wound healing formula*), und Einzelfaktoren wie PDGF, FGF-2 und EGF realisiert worden, die in der akuten Wundheilung von zentraler Bedeutung sind (siehe 1.2) [Falanga, 2005; Buchberger et al., 2010; Alexiadou und Doupis, 2012]. Als prominentester Vertreter dieser Therapeutika ist rekombinantes humanes PDGF-BB, das unter dem Handelsnamen Regranex® (Becaplermin) Marktzulassung in den USA und Europa erreicht hat. Zwar ist in den zulassungsrelevanten Studien auf einen positiven Effekt nach Becaplermin-Behandlung auf die Therapie von DFS hingewiesen worden [Steed, 1995; Wieman, 1998], doch in einer neuerlichen Datenüberprüfung konnte eine erhöhte Inzidenz von Hauttumoren festgestellt werden, so dass die Behandlung mit Becaplermin nur noch in Erwägung gezogen werden soll, wenn die Vorteile die Nachteile überwiegen [Papanas und Maltezos, 2010]. Die Erkenntnisse aus der Erforschung akuter und pathologischer Wundheilung haben bisher nicht zu substantiellen Vorteilen in der Patientenversorgung geführt. Die monotherapeutische Behandlung, also die Applikation einzelner Faktoren,

hat bislang nur einen marginalen heilungsförderlichen Effekt auf die gestörte Wundheilung gezeigt, was u.a. auf die erhebliche Plastizität und Redundanz der Komponenten im Wundheilungsprozess und die schnelle Degradation der Pharmaka in der hochproteolytischen Wunde zurückzuführen ist (siehe 1.3.1) [Gurtner et al., 2008; Lazic und Falanga, 2011, Alexiadou und Doupis, 2012]. Die Lösung therapeutischer Probleme in der Behandlung chronischer, schwer-heilender Wunden wird in der Anwendung zellulärer Pharmaka vermutet [Gurtner et al., 2008].

1.4 Entwicklung biotechnologischer Wundauflagen

Bis heute sind schon über 200000 Patienten mit biotechnologischen Wundauflagen (biologisch-aktive Wunddressings, BAWD) in verschiedenen klinischen Indikationen wie Brandwunden, chirurgischen (akuten) Verletzungen und chronischen Ulzerationen behandelt worden [Lazic und Falanga, 2011]. Diese biologisch-aktiven Substanzen funktionieren primär nicht als Haut- oder Zellersatz, sondern fungieren als temporärer Stimulus zur Aktivierung von Gewebereparatur [Lazic und Falanga, 2011].

Die Einteilung von BAWDs erfolgt anhand ihrer anatomischen Struktur (einschichtig: epidermal, dermal, gemischt; zweischichtig: dermoepidermal), die zeitliche Verfügbarkeit der Abdeckung (temporär, semipermanent, permanent), durch ihre Zusammensetzung (zellulär oder azellulär), sowie durch das Trägermaterial (biologisch oder synthetisch mit der Unterteilung in autolog, allogon, xenogen bzw. abbaubar und nicht abbaubar). In Tabelle 1.1 ist eine Zusammenstellung aktueller BAWD nach ihrer Struktur mit Charakteristika und Indikationen aufgeführt.

Der Einsatz und die Wirkung einer BAWD-Behandlung chronischer Wunden wird durch eine vorherige Wundbettvorbereitung maximiert, in der die Wunde von proteolytischen, BAWD-schädigenden Exsudaten, nekrotischen Geweben und Debris befreit wird [Falanga, 2000; Panuncialman, 2009]. Zudem wird durch die Wundbettvorbereitung die Population inerter Zellen, die nicht mehr in der Lage sind auf Stimulationssignale zu reagieren, aus der Wunde eliminiert [Loots et al., 1998; Brem und Tomic-Canic, 2007].

Tabelle 1.1: Zusammenstellung einzelner BAWD

Produkt	Charakteristik	Indikation	Hersteller	
epidermal	Celaderm	lebende, allogene Vorhaut-Keratinocyten; gefroren	partielle und Vollhaut- Brandwunden; venöse Ulzera	Celadon Science
	Epicel	kultivierte, autologe, lebende Keratinozy- ten auf einer Vaseline-haltigen Gauze	tiefe, dermale und Voll- haut-Brandwunden	Genzyme Corp
dermal	Alloderm	trocken-gefrorene, azelluläre, dermale Kadavermatrix	Brandwunden; akute/ chronische Vollhaut- Wunden,	LifeCell Corp
	Dermagraft	lebende, allogene neonatale Fibroblasten auf abbaubarer Polyglactin-Matrix	Epidermolysis bullosa; DFS,	Smith & Nephew
	Oasis	azelluläre, porcine Dünndarmsubmucosa	partielle und Vollhaut- Brandwunden; venöse und Dekubitalulzera, DFS	Cook Biotech
zweischichtig	Apligraf	Rinderkollagenmatrix mit allogenen, neonatalen Fibroblasten und Vorhautkera- tinozyten	Epidermolysis bullosa, Pyoderma gangrenosum; ven-öse und Debukitalul- zera, DFS	Organogenesis
	OrCel	quervernetzte Rinderkollagenmatrix mit allogenen Fibroblasten und Keratinozyten (entgegengesetztes Wachstum auf Matrix)	Epidermolysis bullosa; venöse Ulzera, DFS	Ortec International

In der Behandlung von venösen und diabetisch-neuropathischen Ulzerationen haben sich Apligraf und Dermagraft als effektiv gezeigt [Falanga et al., 1998; Falanga und Sabolinski, 1999; Marston, 2003]. Interessanterweise wurde in den behandelten Patienten eine verminderte Inzidenz von Osteomyelitis und Amputationen beobachtet, was auf die verbesserte Abheilung zurückzuführen war [Falanga und Sabolinski, 1999; Veves et al., 2001]. Apligraf wird für die Behandlung von venösen und diabetischen Ulzerationen, *Epidermolysis bullosa* und *Pyoderma gangrenosum* verwendet und besteht aus allogenen, neonatalen Fibroblasten und Keratinozyten (zweischichtige Struktur), die aus Vorhautproben isoliert sind, und in einer Rinderkollagen-Typ-1-Matrix kultiviert werden. Dermagraft besteht aus einer Polyglactin-Matrix, in der allogene, neonatale Fibroblasten kultiviert werden (einschichtige Struktur). Interessanterweise kann die Polyglactin-Matrix biologisch degradiert werden, dabei entstehen Metaboliten mit bakteriziden Eigenschaften, die für einen erfolgreichen Wundheilungsverlauf förderlich sein können [Marston et al., 2003]. Von erfolgreichen zulassungsüberschreitenden Anwendungen (so genannte Off-Label-Applikationen) wird sowohl für den Einsatz von Apligraf, als auch für die Verwendung von Dermagraft berichtet [Falabella et al., 2000; de Imus et al., 2001].

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Verwendung biologisch-aktiver Wunddressings (BAWD) hat bis heute in über 200000 Patienten mit verschiedenen Hautverletzungen wie Brandwunden, chirurgischen Wunden und chronischen Ulzerationen einen Behandlungserfolg erzielt [Lazic und Falanga, 2011]. Allerdings sind die zugrundeliegenden, heilungsfördernden Mechanismen einer BAWD-Behandlung bislang unklar [Lazic und Falanga, 2011]. Ergänzend zu den bisherigen BAWDs wurde von der Firma Boehringer Ingelheim ein Konstrukt aus epidermalen Zellen entwickelt, die in einer Hyaluronsäurematrix kultiviert werden und nach Kryokonservierung im klinischen Umfeld eingesetzt werden sollen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit sollten die Frage beantworten, inwiefern Keratinozyten-basierte, biologisch-aktive, humane Wundaufgaben in der Lage sind, den diabetisch-gestörten Wundheilungsprozess in adipösen, insulinresistenten diabetischen *db/db*-Mäusen zu verbessern. Dazu wurde die Interaktion molekularer und zellulärer Prozesse, die zwischen dem BAWD und der diabetischen Wunde stattfinden können, unter Verwendung eines bereits etablierten Wundmodells analysiert. Die Wirksamkeit dieses Therapeutikums sollte mittels Vollhaut-Exzisionswunden in tierexperimentellen Untersuchungen untersucht werden. Der Wundheilungsprozess dieser *db/db*-Tiere ist bereits gut charakterisiert und weist deutliche Parallelen zum Wundverlauf chronisch-diabetischer Ulzerationen beim Menschen auf, so dass Erkenntnisse dieser Analysen möglicherweise auf die Behandlung beim Menschen abzuleiten sind. Die experimentelle Verwendung genetisch-prädisponierter Diabetes mellitus-Typ-2 entwickelnder Mäuse (*db/db* und *ob/ob*) ist im weiteren Kontext von Wundheilungsstudien und anderen Fragestellungen zum diabetischen Phänotyp von großer Bedeutung [Frank et al., 1995; Wetzler et al., 2000; Goren et al., 2003; Goren et al., 2007; Wang et al., 2014].

Als erstes Ziel sollten Wunden dieser diabetischen Tiere zunächst über eine histologische Untersuchung bewertet werden. Im Anschluss sollte eine umfassende Whole-Genom-Sequenzierung behandelter und Kontroll-behandelter Wunden durchgeführt werden, um einen Überblick über differentiell regulierte Prozesse in der kutanen Wundheilung zu erhalten.

II Material und Methode

1 Material

1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden gängige Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Organische Lösungsmittel und Säuren sind über die Apotheke der Uniklinik angefordert worden.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-/Bisacrylamidlösungen	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Alizarinrot-S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Antigen Retrieval Solution 10x	DAKO; Hamburg
Aprotinin	BioTrend, Köln
Aquatex, wässrige Eindecklösung	Merck-Millipore, Darmstadt
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM (high glucose)	ThermoFisher Scientific, Dreieich
DNA-Molekulargewichtsstandard	ThermoFisher Scientific, Dreieich
Entellan	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glycerophosphat (beta-)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidinthiocyanat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Insulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leupeptin	BioTrend, Köln
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Mayers Hämatoxylin-Lösung	Applichem, Darmstadt
Propylenglykol	Roth, Karlsruhe
Protein-Molekulargewichtsstandard	ThermoFisher Scientific, Dreieich
Rosiglitazon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nukleotidtriphosphat (dNTP)	Roche, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oil-Red-O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Olikonukleotide	MWG, Ebersberg
Okadasäure	BioTrend, Köln
Phenol	Applichem, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein Block, Serum-Free	DAKO, Hamburg
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

1.2 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden in demineralisiertem Wasser (Ionenaustauscher; Millipore, Schwalbach) angesetzt.

Puffer	Herstellung	Puffer	Herstellung
10x PBS	139 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4	10x TAE	0,4 M Tris/ HCl 10 mM EDTA 3,5 % Essigsäure (v/v)
10x TBST	0,1 M Tris/HCl 1,5 M NaCl 0.5 % Tween20 (v/v)	10x TBE	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
10x Transferpuffer	1,92 M Glyzin 250 mM Tris	10x SDS Laufpuffer	10 g SDS 30 g Tris/HCl 144 g Glyzin

1.3 Kits und sonstige Materialien

ABC Staining Kit	Santa-Cruz Biotechnologies, Hamburg
BAS-MP 2040S-Phosphoimaging-Platte	Fuji, Straubenhardt
BCA Reagent Assay	ThermoFisher Scientific, Dreieich
DCS LabLine Antikörperverdünnungspuffer	DCS, Hamburg
Deckgläser (24mm x 60mm)	Roth, Karlsruhe
Enhanced Chemoluminescence Detection Kit	Amersham, Braunschweig
Fast Red Substrate-Chromogen System	Dako, Hamburg
Nitrozellulosemembran	Perkin Elmer, Rodgau
Medicons (sterile) 50µm	Becton Dickinson, San Jose USA
miScript SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
miScript II RT Kit	Qiagen, Hilden
Mouse BD Fc Block™	BD Pharmingen, Heidelberg
OPAL 5-color Kit	PerkinElmer, Rodgau
Permanent AP Red Kit	Zytomed Systems, Berlin
PerkinElmer AR6-Puffer	PerkinElmer, Rodgau
PerkinElmer AR9-Puffer	PerkinElmer, Rodgau
Polyvinylidenfluoridmembran	Millipore, Schwalbach
Promocell Keratinocyte Medium	Promocell, Heidelberg
Proteome Profiler, Cytokine Array, Panel A	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine® ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Maus-VEGF Human-VEGF	
Sigma FAST 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)- Tabletten	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SlowFade Antifade Kit	Invitrogen, Darmstadt
SuperFrost Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig
Taqman Fast Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt
Whatman 3MM-Papier	Millipore, Schwalbach

1.4 Enzyme

Collagenase A	Roche Diagnostics, Mannheim
RNasin Ribonukleaseinhibitor	Promega, Mannheim
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
GoTaq-DNA Polymerase	Promega, Mannheim

1.5 Antikörper

1.5.1 Primärantikörper

Antikörper	Ursprung	Hersteller
anti- α SMA	M (monoklonal)	Sigma Aldrich, St. Louis USA
anti-CD29	K (monoklonal)	abcam, Hamburg
anti-CD31	R (monoklonal)	PharMingen, Hamburg
anti-F4/80	R (monoklonal)	AbD Serotec, Hamburg
anti-GAPDH	K (polyklonal)	Trevigen, Gaithersburg USA
anti-GR1	R (monoklonal)	PharMingen, Hamburg
anti-Myh7	K (polyklonal)	Aviva Systems, San Diego USA
anti-PMN (Ly-6B.2)	R (monoklonal)	AbD Serotec, Hamburg
anti-Sca1 (Ly-6A/E)	R (monoklonal)	abcam, Hamburg
anti-TNFAIP6 (TSG-6)	K (polyklonal)	Acris Antibodies, Herford
anti-CD29 [APC]	R (monoklonal)	eBioscience, San Diego USA
anti-CD44 [FITC]	R (monoklonal)	eBioscience, San Diego USA
anti-CD45 [PerCP-Cy5.5]	R (monoklonal)	eBioscience, San Diego USA
anti-Sca1 [PE]	R (monoklonal)	eBioscience, San Diego USA

M... Maus K... Kaninchen R... Ratte

1.5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Ursprung	Konjugat	Hersteller
anti-goat IgG	K	HRP	Pierce Inc, Rockford, USA
anti-mouse IgG	K	HRP	Biorad, Hamburg
anti-rabbit IgG	Z	HRP	Biorad, Hamburg
anti-rat IgG	K	Biotin	DAKO, Hamburg
anti-rabbit IgG	Z	AlexaFluor@488	Life Technologies, Darmstadt
anti-rat IgG	Z	AlexaFluor@594	Life Technologies, Darmstadt

K... Kaninchen, Z... Ziege

1.6 Oligonukleotide

1.6.1 Primer für Taqman®

Die verwendeten Taqman® Primer wurden über die Firma Life Technologies aus Darmstadt bezogen.

Gen	Zugangsnummer	Gen	Zugangsnummer
human VEGF	Hs00900055_m1	FABP3	Mm02342495_m1
human CXCL-8 (IL-8)	Hs00174103_m1	FABP4	Mm00445878_m1
IL1b	Mm00434228_m1	MyoD1	Mm00440387_m1
TNF	Mm00443258_m1	MRF4 (Myf6)	Mm00435126_m1
CXCL1	Mm04207460_m1	Tnnt1	Mm00449089_m1
CXCL2	Mm00436450_m1	Tnni1	Mm00502426_m1
CCL2	Mm00441242_m1	Tnnc1	Mm00437115_g1
CCL3	Mm00441259_g1	Myh7	Mm00600555_m1
CXCR2	Mm99999117_s1	Sca1 (Ly-6A/E)	Mm00726565_s1
Lcn2	Mm01324470_m1	CD29 (Itgb1)	Mm01253230_m1
Emr1	Mm00802529_m1	CD44	Mm01277161_m1
TNFAIP6	Mm00493736_m1	CXCR4	Mm01996749_s1
CD31 (Pecam)	Mm01242576_m1	CXCR7 (Ackr3)	Mm02619632_s1
Tie2 (Tek)	Mm00443243_m1	CXCL12	Mm00445553_m1
VEGF	Mm01333330_m1		

1.6.2 Primer für miScript SYBR® Green

Die verwendeten Primer für die miScript SYBR® Green-Analyse wurden von Qiagen aus Hilden bezogen.

microRNA-133a	mmu-miR-133a-5p	MS00006027
microRNA-133b	mmu-miR-133b-5p	MS00024150
microRNA-206	mmu-miR-206-5p	MS00024528

1.7 Geräte

7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Axiovert 25-Mikroskop	Carl Zeiss, Göttingen
Biofuge fresco, Rotor 3324	ThermoFisher Scientific, Langenselbold
BD FACS Canto II Flowcytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Biofuge pico, Rotor 3325B	ThermoFisher Scientific, Langenselbold

II Material und Methode

BZ-8000K-Mikroskop	Keyence, Neu-Isenburg
Gel Dryer 583	Bio-Rad, München
GelDoc 1000	Bio-Rad, München
GeneAmp 2400/9600 Thermocycler	Applied Biosystems, Darmstadt
Heraeus Megafuge 1.0, Rotor 75750F	Heraeus, Hanau
Leica RM2235, Mikrotom	Leica, Nussbach
Medimachine	Becton Dickinson, East Rutherford USA
Midget-Elektrophoresekammern	Amersham, Braunschweig
Nanodrop-Spektralphotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Sunrise Mikrotiterplattenlesegerät	Tecan Trading AG; Schweiz
Trans-Blot SD Blotting-Kammer	Bio-Rad, München
Ultra Turrax T10 basic	IKA, Staufen
UV-vis Spektrophotometer UV mini-1240	Shimadzu, Duisburg

1.8 Computersoftware

Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS4 CorelDraw10 ImageJ
Statistik	GraphPad Prism
Online-Datenbanken	NCBI DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7)
Sequenzanalysen	EMBL-EBI
Textverarbeitung/ Tabellenkalkulation	Microsoft Office 2010

2 Methoden

2.1 Herstellung des biologisch-aktiven Wunddressings (BAWD)

Die Herstellung des BAWD wurde durch den Kooperationspartner Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach ausgeführt. Das in dieser Arbeit verwendete BAWD besteht aus zwei Komponenten:

- 1) allogene interfollikuläre Keratinozyten, die aus den epidermalen Anteilen einer menschlichen Vorhaut isoliert worden sind.

- 2) dem Trägermaterial Laserskin (eine Entwicklung der Firma Fidia, Verona, Italien); einer biologisch abbaubaren, veresterten Hyaluronsäurefolie (HYAFF), die sich von einer der wichtigen Grundsubstanzen des Bindegewebes, dem Polysaccharid Hyaluronsäure ableitet.

Die Effektoren der Wundheilungs-stimulierenden Wirkung sind die Keratinozyten. Bei der Wirkung allogener Zellen steht die Stimulation verschiedener Phasen der Wundheilung im Vordergrund.

2.1.1 Ausgangsmaterialien

Als Wirkkomponente werden Keratinozyten verwendet (KCBI 1). Bestrahlte Mausfibroblasten (3T3-B12) dienen als Feederzellen. Das Trägermaterial Laserskin als Substrat zur Förderung der Keratinozyten-Kultur wird von der Firma Fidia (Verona, Italien) vertrieben. Für die Herstellung und Zusammensetzung von Kulturmedien und Lösungen werden von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG folgende Materialien verwendet:

Material	Hersteller
DMEM mit Glutamin	Bio Whittaker
HAM's F12	Bio Whittaker
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natrium-Pyruvat	Gibco BRL
Apo-Transferrin	Intergen
Adenin Hemisulfat	Sigma
Forskolin	ICN Biomedicals

rh-Insulin	Eli Lilly
Hydrocortison	Sigma
Trijodothyronine	Sigma
EGF	Peptrotech
Phenolrot	Riedel de Haen
FCS (gammabestrahlt)	Sigma
DMSO	Bioscience
HAES (Hydroxyethylstärke)	Fresenius-Kabi
HEPES	Buffers Biochemicals
WFI	Boehringer Ingelheim
Kaliumchlorid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogencarbonat	Merck
Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat	Chemische Fabrik Budenheim
NaOH 40%	Herkommer & Bangerter
HCl konz.	Merck

2.1.2 Beschaffenheit und Rolle des Trägermaterials

Keratinocytenkulturen können prinzipiell auch ohne Trägermaterial angewendet werden. Sie werden mit Dispase von der Zellkulturschale abgelöst und an Vaselinegaze geheftet. Da diese Darreichungsform allerdings viele Nachteile hat, sind beim BAWD die Keratinocyten fest mit einem Trägermaterial verbunden. Sie werden auf diesem kultiviert und kryokonserviert. Das Trägermaterial sollte folgende Anforderungen erfüllen: Biokompatibilität, Förderung von Adhärenz und Proliferation, Konservierung des klonogenen Potentials und der Vitalität, Transparenz, Porosität, Eignung zur Kryokonservierung und Bioabbaubarkeit. Es können folgende Materialien als Träger für allogene Keratinocyten in Frage kommen: Polylactid-Caprolacton-Kopolymere, Kollagengele, Fibringele und veresterte Hyaluronsäurederivate (Laserskin).

2.1.3 Herstellverfahren

Zur Herstellung des BAWD werden KCBI 1-Zellen und 3T3-B12-Feederzellen aufgetaut und kultiviert (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 9 % CO₂). Der grundlegende Ablauf ist in Abbildung 2.1 dargestellt:

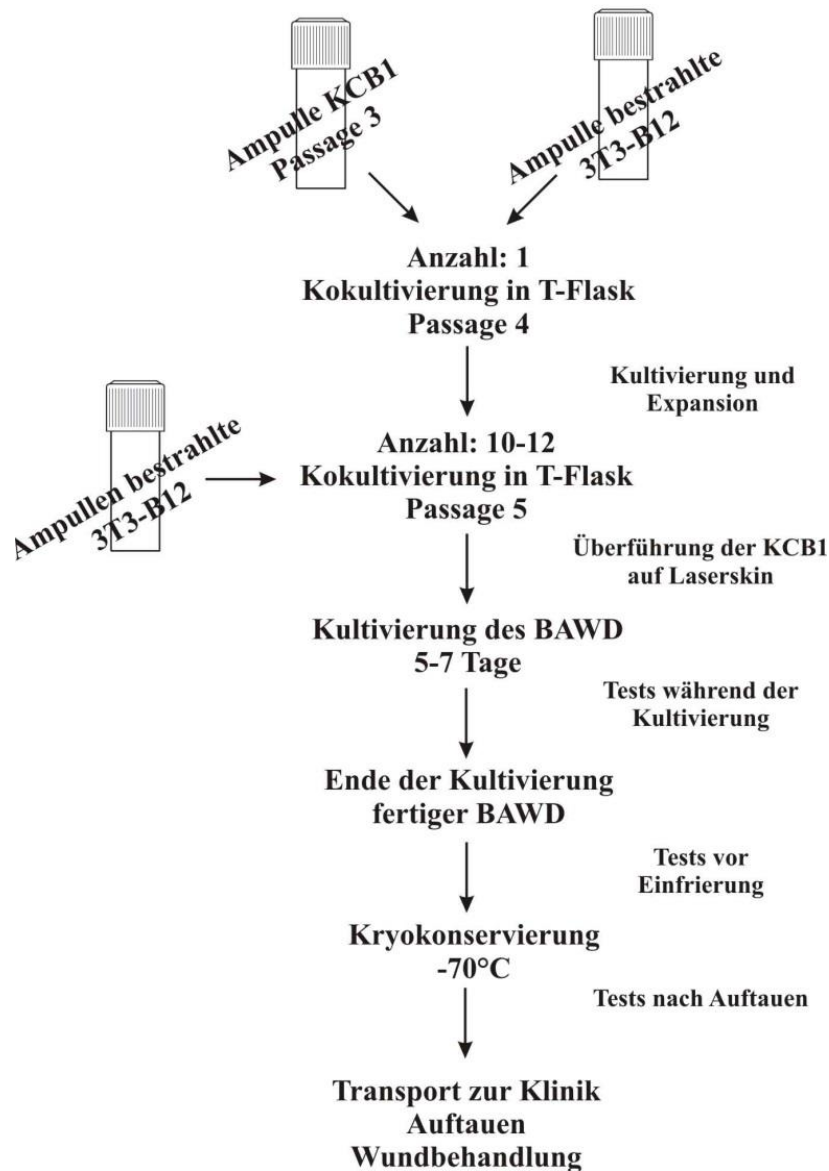


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses

Der Zellstamm KCBI 1 ist die zentrale Wirkkomponente des BAWD und besteht aus interfollikulären Keratinozyten. Die Herstellung sehr großer Mengen an BAWDs aus nur einem Spender ist sehr vorteilhaft und ermöglicht eine gute Charakterisierung des Zellstamms hinsichtlich sicherheitsrelevanter und qualitätsrelevanter Parameter, eine gute Standardisierbarkeit und die Möglichkeit einer Massenproduktion mit geringem Kostenaufwand. Die Verwendung von KCBI 1-Zellen für die Anwendung am Menschen wurde zum Patent angemeldet: WO 03/033686 A2 (24. April 2003).

Nach entsprechender Kokultivierung werden die KCBI 1-Zellen auf das Trägermaterial eingesät und bis zur vollständigen Konfluenz in Petrischalen bei 37 °C (Luftfeuchtigkeit 95 %, CO₂ 9 %) gehalten. Alle zwei Tage erfolgt ein kompletter Mediumwechsel, sowie

eine Beurteilung der Kultur (Bestimmung der Konfluenz und Morphologie). In Abbildung 2.2 ist eine zu 90 % konfluente KCBI 1-Kultur auf dem Trägermaterial (Laserskin) zu sehen.



Abbildung 2.2: Mikroskopische Aufnahme einer zu 90 % konfluenten KCBI-1-Kultur auf dem Trägermaterial (Laserskin)

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Proteinextraktion

Zur Herstellung eines Gesamtproteinlysates aus tiefgefrorenen, murinen Gewebestücken wurden sie zunächst unter Verwendung eines Homogenisators (Ultraturrax) in einem geeigneten Volumen Proteinlysispuffer homogenisiert und verbliebene Gewebereste durch Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen pro Minute (UpM) für 10 min bei 4 °C dissoziiert. Der Überstand wurde in frische Eppendorfgefäße überführt, der Proteingehalt quantifiziert und für weiterführende Analysen bis zur nächsten Verwendung bei -80°C gelagert.

Pufferbestandteile		Inhibitoren	
137 mN	NaCl	10 mM	NaF
20 mM	Tris/HCl pH 8,0	1 mM	PMSF
5 mM	EDTA pH 8,0	1 mM	DTT
10 % (v/v)	Glycerol	1 mM	Na3VO4
1 % (v/v)	Triton X-100	5 µg/µl	Leupeptin
ad 100 %	DDW	5 µg/µl	Aprotinin
		50 nM	Okadasäure

2.2.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration erfolgte über die Bicinchoninsäure (BCA)-Methode unter Verwendung des BCA Reagent Assay Kit. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu²⁺-Ionen zu einwertigen Cu¹⁺-Ionen in Anwesenheit von Proteinen. Die kalorimetrische Auswertung des violetten Komplexes einwertiger Cu-Ionen und BCA erfolgte bei 560 nm Wellenlänge. Die Lysate wurden zuvor mit DDW verdünnt (1:20; 1:40) und nach Anweisung des Herstellers unter Verwendung des Sunrise Analysegerätes vermessen.

2.2.3 Western Blot-Analyse

Die Auftrennung von Peptiden aus den Proteinlysaten wurde über eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erreicht, anschließend auf PVDF- bzw. Nitrozellulose-Membranen transferiert (so genanntes Blotting) und abschließend immunologisch mit spezifisch-bindenden Antikörpern detektiert. Die folgenden Pufferlösungen wurden dabei verwendet:

Pufferbestandteil	4x SDS-Ladepuffer	10x SDS-Laufpuffer	Sammelgel	Trenngel	Transferpuffer
Tris/HCl	0,25 mM (pH 6,8)	0,25 M (pH 8,3)	0,5 M (pH 6,8)	1,5 M (pH 8,8)	25 mM (pH 8,3)
SDS	8 % (m/v)	1 % (m/v)	0,1 % (m/v)		-
β-Mercaptoethanol	3 M	-	-	0,1 % (m/v)	-
Bromphenolblau	0,01 % (m/v)	-	-	-	-
Glycerco	40 % (v/v)	2,5 M	-	-	-
Glycin	-	-	-	-	192 mM
Methanol	-	-	-	-	20 % (v/v)
				-	

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart von SDS denaturiert und ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Verwendung von SDS ermöglicht, die Eigenladung der Proteine zu überdecken und trägt dazu bei, dass die Proteine eine einheitlich-negative Ladung ausbilden. Somit wird sichergestellt, dass die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden und nicht aufgrund ihrer tertiären Struktur. Geeignete Mengen an Proteinlysate (15 µg bis 50 µg) wurden mit 4x Ladebuffer verdünnt und nach Denaturierung (95 °C, 5 min) auf eine diskontinuierliche PAGE geeigneter Konzentration (6 %-15 %) aufgetragen. Die Separation erfolgte in Elektrophoresekammern bei anfänglich 100 V für eine Sammlung der Proteinproben im Sammelgel, später 140 V für über 1 bis 2 Stunden. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine wurden 2,5 µl des PageRuler™ Prestained Proteinmarkers mitgeführt.

2.2.3.2 Transfer (Blotting) und Immundetektion

Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer aufgetrennter Proteine auf eine PVDF- bzw. Nitrozellulose-Membran im so genannten *wet-* bzw. *semi-dry*-Verfahren. Die Überführung des Gels auf die Membran wurde in einer Trans-Blot SD Blottingkammer durchgeführt. Die Schichtung umfasste zwei Lagen Whatman-Papier, Membran (PVDF, Nitrozellulose), Gel und wiederum zwei Lagen Whatman-Papier. Bei Nutzung einer PVDF-Membran wurde diese vorab in Methanol benetzt und in Transferpuffer equilibriert. Die Transferierung erfolgte bei 70 mA/ Gel für 75 min. Die Färbung mittels Ponceau S erfolgte zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers.

Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden, wurden potentielle Proteinbindungsstellen nach Transfer für 1 h mit 2,5 %/5 % (m/v) Magermilchpulver in 1x TBST-Waschpuffer abgesättigt. Nach kurzen Waschschritten wurde die Inkubation mit dem Primärantikörper (bei entsprechender Verdünnung mit entsprechender Verdünnungslösung) bei RT für 1 h oder 4 °C für 16 h (über Nacht) durchgeführt. Nach erfolgreicher Primärantikörperbindung wurden ungebundene Antikörper durch 3-maliges TBST-Waschen (10 min) ausgeschieden und die Membran für eine Inkubation mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (1:10000 in 2,5 % (m/v) Magermilchpulver/TBST, 1 h, Raumtemperatur) vorbereitet worden. Nach Anweisung des Herstellers wurde die Membran nach erneutem TBST-Waschen mit einer ECL-Detektionslösung für 2 min inkubiert, auf einen Röntgenfilm exponiert und entwickelt.

2.2.3.3 Quantifizierung mittels ImageJ

ImageJ ist ein Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm zur Analyse medizinischer und wissenschaftlicher Bilder. Die Software ermöglicht die densitometrische Quantifizierung der Antikörper-Antigenbindung nach erfolgter SDS-PAGE und Transferierung.

Dazu wurde nach Abschluss der Immundetektion und Aufnahme der entwickelten Filme digitalisiert und mit der Software prozessiert. Im Ergebnis wurde die Densität bzw. Intensität der einzelnen Banden auf die Intensität der Marker-Bande (Haushaltsproteine wie β -Aktin oder GAPDH) normalisiert und die Werte der Softwareauswertung auf Signifikanzen analysiert.

2.2.4 Proteome Profiler™-Array

Der Proteome Profiler™-Array ermöglicht eine schnelle und sensitive, simultane Detektion unterschiedlicher Proteine aus einer Probe. Dazu sind ausgewählte Capture-Antikörper als Duplikate auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen.

Der Proteome Profiler™-Array wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Im Wesentlichen wurden dabei die Proteinlysate aus den isolierten Wundgewebeproben mit einem Array-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 1 ml verdünnt und mit 15 μ l eines Cocktails biotynilierter Detektionsantikörpern gemischt. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit dem Proben/Antikörpergemisch über Nacht bei 4 °C inkubiert und jeder Protein/ Detektions-antikörper-Komplex durch den Capture-Antikörper auf der Membran gebunden. Nach einem Waschschritt mit Waschpuffer wurde zur Detektion Streptavidin-Meerrettich-peroxidase (Streptavidin-HRP) und ein Chemiluminescent Detection-Reagenz addiert. Die Exponierung und Entwicklung erfolgte wie bei der Western Blot-Immundetektion. Zur Quantifizierung der gebundenen Antikörper wurde ImageJ genutzt.

2.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA beinhaltet ein antikörperbasiertes, sehr sensibles Nachweisverfahren zur Quantifizierung von Proteinkonzentrationen. Dabei wird ein nachzuweisendes Antigen durch den Erstantikörper (Capture-Antikörper) adsorptiv auf eine Mikrotiterplatte gebunden und angereichert und durch den Enzym-gekoppelten Zweitantikörper (Detekti-

onsantikörper) die Farbstoffreaktion ermöglicht. Je stärker der Farbumschlag des Substrates, desto größer ist die Anzahl der nachzuweisenden Antigene.

Die in dieser Arbeit genutzten ELISA wurden nach Herstelleranleitung durchgeführt. Die Quantifizierung/ Messung des Farbumschlags wurde mit dem Sunrise Mikrotiterplattenlesegerät analysiert.

2.2.6 Immunhistochemie

2.2.6.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Isolation der Wundgewebeproben wurde wie in Kap. 2.4.3 durchgeführt, die Wunden auf eine PVDF-Membran aufgelegt, um ein Zusammenfallen der Proben zu vermeiden, über den gesamten Querschnitt vertikal geteilt und für 3 h mit einer Zinkfixierlösung bzw. über Nacht in einer 4 %-igen PFA-Lösung bei 4 °C fixiert. Nach erfolgter Fixierung wurden die Präparate einer vollautomatischen Gewebeentwässerung unterzogen und in Paraffin eingebettet. Von den Paraffin-eingebetteten Proben wurden Gewebeschnitte von 4 µm Dicke am Mikrotom angefertigt, auf einen Objektträger in einem erwärmten Wasserbad aufgebracht und bei 37 °C über Nacht getrocknet.

2.2.6.2 Herstellung von Kryoschnitten

Zur Herstellung kryokonservierter Gewebeschnitte wurden die Gewebeproben direkt nach Isolation auf Trockeneis eingebettet (Tissue-Tek Gießförmchen). Die Kryoproben wurden mit einem Kryostat auf 8 µm Dicke geschnitten, mit Aceton vorfixiert (-20 °C, 10 min) und im Kühlschrank bei -80 °C gelagert.

2.2.6.3 Immunhistochemische Färbung

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung kann man Proteine oder andere Strukturen durch markierte Antikörper visualisieren und in Zellkompartimenten lokalisieren. Abhängig der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden unterschiedlich fixierte Gewebeproben für die immunhistochemische Färbung vorbereitet und verwendet.

In Tabelle 2.1 ist eine Zusammenstellung der einzelnen Schritte dargestellt und auf die unterschiedlich-fixierten Gewebeproben aufgeteilt.

Die grundlegenden Schritte umfassten eine Deparaffinisierung und Hydratisierung der Schnitte, im Falle einer Formalin-Fixierung ein Antigen Unmasking (*heat induced epitope retrieval*, HIER), eine funktionelle Inaktivierung endogener Peroxidasen, die Blockierung und Inkubation mit dem Primärantikörper, die Kopplung des biotynilierten Sekundärantikörpers, eine Signalamplifizierung durch den Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und die Chromogen-Reaktion. Diese wurde mittels des 3,3-Diaminobenzidind-Tetra-Hydrochlorid-(DAB)- bzw. „Fast Red“-Substrates ermöglicht. Im Anschluss der Chromogen-Reaktion wurde zur besseren Visualisierung eine Kern-gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt und die Gewebeschnitte abschließend in H₂O gewaschen und mit einer Eindecklösung (Aquatex) eingedeckt.

Tabelle 2.1: Tabellarische Zusammenfassung der Einzelschritte für die immunhistochemische Färbung

Lösung	Kryo-konservierung	Formalin/PFA	Zink	Reaktionsschritt
Xylol	-	4x10 min	4x10 min	Deparaffinisierung
Isopropanol	-	2x5 min	2x5 min	
96% EtOH	-	2x5 min	2x5 min	
70% EtOH	-	5 min	5 min	
H ₂ O/ PBS	-	2x10 min	2x10 min	
Antigenfreilegung	-	20 min	-	Antigen Unmaskierung
Abkühlung	-	20 min	-	
-20 °C Aceton	10 min	-	-	
PBS	3x5 min	5 min	5 min	Blockade der endogenen Peroxidase
3% H ₂ O ₂	10 min	15 min	15 min	
0,1 % Triton/PBS	-	4 min	4 min	
PBS	2x5 min	2x5 min	2x5 min	
Blockingpuffer	60 min	60 min	60 min	Blocking und 1.-Antikörper
Primärantikörper	über Nacht, 4 °C	über Nacht, 4 °C	über Nacht, 4 °C	
PBS	3x2 min	3x2 min	3x2 min	
Sekundärantikörper	60 min, RT	60 min, RT	60 min, RT	biotynlierter 2.-Antikörper
PBS	3x2 min	3x2 min	3x2 min	
AB-Komplex	30 min, RT	30 min, RT	30 min, RT	Signalamplifizierung
PBS	3x2 min	3x2 min	3x2 min	
Chromogen (DAB oder Fast Red)	5-10 min	5-10 min	5-10 min	Chromogen-Reaktion
H ₂ O	kurz	kurz	kurz	
Hämatoxylin	4 min	4 min	4 min	Kerngegenfärbung
Leitungswasser	10 min	10 min	10 min	
1% Ammoniaklösung	6 min	6 min	6 min	
H ₂ O	Abschluss	Abschluss	Abschluss	

2.2.6.4 Immunfluoreszenz-basierte Färbung

Die Immunfluoreszenz-Färbung wurde mit Formalin/PFA- und Zink-fixierten Gewebeschnitten durchgeführt. In beiden Fällen wurden die Proben deparaffiniert und hydratisiert. Die anschließende HIER für PFA-fixierte Wunden erfolgte mittels Antigen Retrieval Solution für 20 min. Die Schnitte wurde mit einer gebrauchsfertigen Blocking-

Lösung (Protein Block, Serum-free) für 15 min geblockt, für 45 min mit der DCS-Antikörperverdünnungslösung behandelt und der Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligen PBS-Waschen (5 min) wurden ungebundene Antikörper ausgewaschen und Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper und 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI; verwendete Verdünnung 1:5000) auf die entsprechenden Gewebeproben für 90 min bei RT hinzugegeben. Für eine verlängerte Haltbarkeit Fluoreszenz-markierter Proben wurden die Schnitte für 10 min mit einer Anti-Ausbleichlösung (SlowFade Antifade) behandelt und abschließend eingedeckelt (Aquatex).

2.2.6.5 Azan-Färbung

Die Azanfärbung (nach Heidenhain) ist eine Mehrfach- oder Trichrom-Färbung. Sie dient zur Differenzierung von extrazellulären Bindegewebsfasern, Geweben und Zellbestandteilen. Die verwendeten Farbstoffe sind Azokarmin, das überwiegend die rote Kernfärbung verursacht und Anilinblau-Orange-G, der zur Gegenfärbung genutzt wird.

Lösung	Herstellung
Azokarmin	0,1g Azokarmin G 100ml DDW aufkochen, abkühlen, filtrieren
Essigsaurer Alkohol	1ml Eisessig 100ml 96% EtOH
Phosphorwolframsäure 5%	5g Phosphorwolframsäure 100ml DDW
Anilinblau-Goldorange-Essigsäure	0,5g wasserlösliches Anilinblau 2g Goldorange G 100ml DDW 8ml Eisessig lösen, aufkochen, abkühlen, filtrieren

Für die Azanfärbung wurden die Schnitte entparaffiniert und für 10-15 min in die Azokarmin-Lösung gelegt. Anschließend wurde eine Differenzierung der Schnitte in 96 % EtOH durchgeführt, bis die Zellkerne deutlich erkennbar waren. Die Differenzierung wurde durch die Überführung in essigsauren Alkohol für 1 min unterbrochen. Durch die Verwendung von 5 %-iger Phosphorwolframsäure (20 min) wurde das kolla-

gene Bindegewebe entfärbt und gebeizt. Die Schnitte wurden anschließend in DDW gespült und abschließend in der Anilinblau-Goldorange-Essigsäure-Lösung (2-5 min) gegengefärbt, gespült und mit 96 % EtOH differenziert. Zur Eindeckung mit Entellan wurden die gefärbten Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (100 % EtOH, Isopropanol, Xylol) entwässert. Als Resultat dieser Färbung konnte man folgende Strukturen differenzieren:

Struktur	Farbe
Zellkerne	rot
Zytoplasma	rötlich
Bindegewebsfasern	
→ kollagene	blau
→ retikuläre	blau
→ elastische	ungefärbt/rötlich
Muskelgewebe	rot-orange

2.2.6.6 Opal™-Färbung

Die Opal™-Färbung ermöglicht die simultane Detektion verschiedener Biomarker in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben. Vergleichbar zur immunhistochemischen Färbung (siehe 2.2.6.3) wird in dieser Methode die Antigen-Antikörperbindung über HRP-gekoppelte Sekundärantikörper über eine Fluoropho-Reaktion detektiert. Der Vorteil dieser Methode basiert auf der Nutzung mehrerer Antikörper gleicher Spezies, da über eine Mikrowellenbehandlung Primär- und Sekundärantikörper entfernt werden. Die Fluorophor-Reaktion am Antigen wird nicht beeinträchtigt.

Zur Durchführung der Färbung wurden die Gewebeschnitte wie in den Herstellerangaben über eine Alkoholreihe entparaffiniert und hydratisiert, in der Mikrowelle zwecks Antigen-Demaskierung behandelt und anschließend mit FCS (10 % FCS in 0,5 % Triton/PBS) geblockt. Der Primärantikörper wurde zwecks entsprechender Verdünnung mit antibody diluent versetzt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objekte mit TBST gewaschen und danach mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach erneuten TBST-Waschschritten wurde die Opal Working Solution (Fluorophore Amplification Reagent in Amplification Diluent im Verhältnis 1:50) angesetzt und bei 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Entfernung der Primär-/Sekundärantikörperkonjugate erfolgte durch einen weiteren Mikrowellenschritt.

An diesem Punkt wurde der Versuch mit einem weiteren Antikörper fortgeführt (2.-4. Primärantikörper) oder eine Kernzellfärbung mittels DAPI durchgeführt und die Gewebeobjekte mit einem Einbettmedium (Fluoromount) zur Auswertung eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte über ein Vectra 3.0 Automated Quantitative Pathology Imaging System (PerkinElmer, Rodgau) mittels einer *multispectral fluorescent imaging* (FSMI)-Mikroskopie am Institut für Pathobiochemie, Frankfurt.

2.2.7 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die durchflusszytometrische Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) ermöglicht die Quantifizierung von Zellen im Wundgewebe nach erfolgter Anfärbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern.

FACS-Staining-Puffer	PBS (- MgCl ₂ , -CaCl ₂) 1-2 % FCS 0,1 % NaN ₃	FACS-Fixation-Puffer	PBS (- MgCl ₂ , -CaCl ₂) 1 % PFA
-----------------------------	--	-----------------------------	--

Die isolierten Gewebeproben wurden in 5 ml RPMI-Vollmedium auf Eis gesammelt. Die Homogenisierung erfolgte mit einer Medimachine (Becton Dickinson) für 10 min und das Homogenisat wurde bei 1600 UpM für 5 min sedimentiert. Die Erythrozytenlyse wurde durch die Zugabe von 0,83 % NH₄Cl Lysepuffer erreicht und durch die Zugabe von 5 ml RPMI-Vollmedium gestoppt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 1600 UpM für 5 min wurden das Zelllysat in 3 ml FACS-Staining-Puffer aufgenommen, gezählt, einer Fc-Blockierung für 30 min bei 4 °C unterzogen (Mouse BD Fc Block™, BD Pharmingen), mit Staining-Puffer gewaschen und in 96-Lochplatten mit einer Zelldichte von 4x10⁵ Zellen/Well ausplattiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Anfärbung der Zelloberflächenmarker mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern in einem Antikörper-Mastermix für eine Mehrfachfärbung (5 Antikörper in einem Ansatz) und in Einzelfärbung zur Kontrolle und Kalibrierung.

Die Inkubation (30 min, 4 °C, lichtgeschützt) wurde durch die Zugabe von Staining-Puffer abgestoppt, die Zellen in der 96-Lochplatte abzentrifugiert (300 g, 7 min, 4 °C) und der Vorgang 2x wiederholt, um die Zellen von ungebundenen Antikörpern auszu-

waschen. Das Zellpellet wurde in einer Fixation/Permeabilization-Lösung (BD Cytotfix/Cytoperm) resuspendiert und für 20 min bei 4 °C inkubiert, gewaschen und in 175 µl 1 % PFA/PBS Fixierlösung in Mikrotiterbehälter für die durchflusszytometrische Analyse am Analysegerät (FACS CantoII; BD Sciences) aufgenommen. Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mittels der FlowJo-Software.

2.3 Molekulargenetische Methoden

2.3.1 Isolation von RNA mit GSCN

Die Isolation von RNA aus Mauswundgewebe wurde durch einen stark denaturierenden Puffer (GSCN-Puffer: 50 % (m/v) Guanidinthiocyanat; 0,7 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,5 % (m/v) Natriumlaurylsarkosin; 15 mM Natriumcitrat pH 7,0), einer nachfolgenden Phenol-Chloroform-Extraktion und EtOH-Präzipitation erreicht. Dazu wurden die tiefgefrorenen Wundproben in 2 ml, 4 °C kalten GSCN-Puffer überführt und mit dem Ultraturax homogenisiert. Unter Zugabe von 1/1 Volumen sauren Phenols (2 ml), 1/10 Volumen 2 M NaOAc (pH 4,0) (200 µl), 3/10 Volumen Chloroform (600 µl) wurde das Homogenisat intensiv gemischt und anschließend zentrifugiert (4200 UpM, 4 °C, 30 min). Die RNA-haltige, obere Phase wurde in 2,5/1 Volumen vorgelegtes EtOH in neue 15 ml-Falconröhrchen überführt, vermengt und für 60 min bei -20°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde sedimentiert (4200 UpM, 4 °C, 30 min) in 1/1 Volumen DEPC-DDW resuspendiert, in basischem Phenol (22,5 ml Phenol, 22,5 ml Chloroform, 5 ml 1 M Tris/HCl pH 9,5) erneut extrahiert und abzentrifugiert (4200 UpM, 4 °C, 30 min). Das Zellpellet wurde in 2,5/1 Volumen EtOH überführt und mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) über Nacht bei -20°C präzipitiert. Abschließend wurde das Zellpellet in 70 % EtOH gewaschen, angetrocknet und in einer geeigneten Menge DEPC-DDW gelöst (65 °C, 5 min). Die Integrität der RNA wurde über ein 1,5 % Agarosegel (in 1x TAE-Puffer) überprüft und am NanoDrop in ihrer Konzentration bestimmt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.2 Isolation von RNA mit TRIzol

Die RNA-Isolation mit TRIzol® ist eine weiterentwickelte, einphasige Lösung mit GSCN-Phenolbestandteilen und kann in einer Stunde erfolgen. In der Probenaufbearbeitung durch die Verwendung von Homogenisatoren wird durch TRIzol die Integrität der RNA aufrechtgehalten, während Zellen aufgebrochen und Zellbestandteile aufgelöst

werden. Die Addition von Chloroform mit anschließender Zentrifugation separiert die Lösung in eine wässrige Phase und eine organische Phase, wobei die RNA in der wässrigen Phase verbleibt.

Zur Isolation der RNA aus der wässrigen Phase wurde Isopropanol in Eppendorfgefäße vorgelegt, die RNA-enhaltende Phase überführt, für 10 min bei RT mit mehrmaligem Durchmischen präzipitiert und anschließend für 15 min zentrifugiert (13000 UpM, 4 °C). Nachfolgend wurde der Überstand abgezogen und das Zellpellet 3x gewaschen (Zugabe von 70 % EtOH, Zentrifugation, Absaugen). Je nach Pelletgröße wurde die Menge des DEPC-Wassers bestimmt, um das getrocknete Pellet vollständig zu resuspendieren. Zum Abschluss wurde die Konzentration bestimmt und die RNA zur weiteren Verwendung bei -20 °C weggefroren.

2.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von RNA erfolgte photometrisch in wässriger Lösung am Nano-Drop Photospektrometer bei einer Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$. Eine Konzentration von 50 ng/ μl doppelsträngiger DNA bzw. 40 ng/ μl einzelsträngiger RNA entspricht hierbei einer Extinktion von 1. Zur Beurteilung erhöhter Proteinkontamination bzw. zur Reinheit der RNA wurde das Extinktionsverhältnis $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ genutzt. Der ideale Wert nahezu proteinfreier Lösungen sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von Nukleinsäuren über die Agarosegelelektrophorese wurde durch entsprechende Agarosegel-Konzentrationen (0,8 % bis 2,5 % (m/v)) in 1xTAE umgesetzt. Vor dem Beladen der Geltaschen wurden die Proben in 6x Probenpuffer verdünnt (0,25 % (m/v) Bromphenolblau; 0,25 % (m/v) Xylencyanol; 30 % (v/v) Glycerol; 60 % (v/v) 10x TAE). Zur Bandenvisualisierung wurde der aufgekochten Agaroselösung EtBr (Ethidiumbromid) als interkalierendes Agens zugefügt. Als Größenstandard diente 100bp-Ladder Plus.

2.3.5 Reverse Transkription von mRNA

Zur weiteren Verwendung muss die durch GSCN- oder Trizol-isolierte RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden. In diesem Fall werden RNA-abhängige DNA-Polymerasen (reverse Transkriptasen, RT) verwendet. Als Mat-

rize wurden 1 µg Gesamt-RNA (Gesamtvolumen durch DDW-Verdünnung 7 µl) vorgelegt, mit 1 µl Random-Hexamer-Primern ergänzt und durch nachfolgenden Ansatz auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl gebracht:

Substanz	Menge
MgCL2	4 µl
2,5 mM dNTPs	4 µl
10x Puffer	2 µl
MuLV Reverse Transkriptase	1 µl
RNasin	1 µl

Die Transkription erfolgte bei 42 °C für 30 min und wurde durch einen Inkubationsschritt bei 95 °C für 5 min terminiert. Die cDNA-Transkripte wurden anschließend 1/6 mit autoklaviertem DDW verdünnt und bei 4 °C gelagert.

2.3.6 Reverse Transkription von microRNA

Zur Identifikation von spezifischen miRNA in Wundgewebe wurde die Gesamt-RNA mittels miScript II Reverse Transkriptase umgeschrieben.

Substanz	Menge
5x miScript HiFlex Puffer	4 µl
10x Nucleics Mix	2 µl
miScript Reverse Transkriptase	2 µl
total-RNA	1 µl
RNase-freies DDW	12 µl-1 µg RNA

Der komplette Ansatz wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und bei 95 °C für 5 min erfolgte die Inaktivierung der miScript Reverse Transkriptase. Die unverdünnten Transkripte wurden bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht eine effiziente *in vitro*-Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen, die über zwei gegenläufig an die komplementären Stränge annelierten Oligonukleotide (Primer) definiert sind. Wesentliche Bestandteile der Reaktion sind thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerasen (Pfu-Polymerase aus *Py-*

rococcus furiosus und Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*). Die DNA-Polymerasen katalysieren die Synthese der DNA aus Desoxyribonucleotiden an einer Matrize (ssDNA oder cDNA). Die zyklischen Wiederholungen der PCR-Reaktion setzen sich aus Denaturierung, Annealing (Anlagerung) und Elongation (Verlängerung) zusammen und wurden in einem Thermocycler mit nachfolgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

Substanz	Menge/ Volumen
DNA	1 µl cDNA
Primer forward (10 pmol/µl)	1 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	1 µl
5x GoTaq-Puffer	5 µl
2,5 mM 4dNTPs	2 µl
GoTaq DNA-Polymerase	0,25 µl
DDW	14,75 µl

Die PCR-Reaktion wurde mit einer initialen Denaturierung bei 94 °C für 10 min gestartet und in nachfolgendem Zyklus 35fach wiederholt: Denaturierung 94 °C 1 min, Annealing 55,5 °C 1 min, Elongation 72 °C 2 min. Nach der finalen Elongation (72 °C, 2 min) wurde der Reaktionsansatz analytisch mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und am GelDoc (Bio-Rad, München) dokumentiert.

2.3.8 Real-Time Taqman®-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real time quantitative PCR*, qPCR) ist eine auf dem Prinzip der konventionellen PCR-Technik weiterentwickelte Vervielfältigungsmethode von Nucleinsäuren. Neben der Vervielfältigung (Amplifikation) der Nucleinsäuren wird eine Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Chemische Grundlagen dieser Reaktion umfassen Fluoreszenzfarbstoffe, die als Reporter-Fluoreszenzfarbstoffe (6-Carboxy-Fluorescein, FAM) und Quencher-Farbstoffe (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, TAMRA) bezeichnet werden. Der Quencher-Farbstoff (quenching; Fluoreszenzlöschung) ist in unmittelbarer Nähe zum Reporter-Farbstoff und inhibiert dessen Fluoreszenz. Die Taqman®-Sonden bestehen aus einem 5'-Reporterfarbstoff, 3'-Quencherfarbstoff und einer 3'-OH-blockierenden Phosphatgruppe. Während der PCR hybridisiert die Sonde an den Matrizenstrang und wird in der Extensionsphase durch die Taq-Polymerase verdrängt. Die entstehende Y-förmige Se-

kundärstruktur aktiviert die 5'3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase und schneidet die Taqman-Sonde. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und das Fluoreszenz-Signal wird messbar. Mit zunehmender PCR-Dauer akkumuliert die Amplifikatmenge und die Fluoreszenz des Reporters steigt entsprechend mit jedem PCR-Zyklus. Die Signalmessung und damit einhergehende Veränderungen der Fluoreszenzen werden mit Hilfe des ABI Prism 7500 Zyklus für Zyklus erfasst.

Der verwendete Fast Advanced Master Mix beinhaltet alle für eine PCR-benötigten Substanzen (AmpliTaq® Fast DNA-Polymerase, Uracil-N-Glykolyase (UNG), dNTPs, ROX-Farbstoff (als passive Referenz) und Pufferbestandteile). Die qPCR wurde mit nachfolgendem Reaktionsansatz und PCR-Protokoll (*thermal cycling profil*) durchgeführt:

Substanz	Menge/Volumen
cDNA (1:6-Verdünnung)	3 µl
Taqman®-Sonde 1	0,5 µl
Taqman®-Sonde GAPDH	0,5 µl
Fast Advanced Master Mix	5 µl
DDW	1 µl

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
UNG-Inkubation	120 sec	50 °C
Polymerase-Aktivierung	20 sec	95 °C
PCR-Zyklus	Denaturierung	3 sec
	Extension	30 sec
		60 °C

Die Messung der Amplifikation erfolgte durch die Sequence Detector Software, statistische Auswertungen wurden mit GraphPad Prism erfasst.

2.3.9 Illumina-Dye-Sequenzierung

Die Illumina-Dye-Sequenzierung ist eine Methode zur DNA-Sequenzierung und basiert auf der Anwendung reversibler Farbstoff-markierter DNA-Synthese-Terminatoren, die die Identifizierung einzelner in den DNA-Strang eingebauter Basen mittels Fluoreszenz ermöglichen. Die Illumina-Dye-Sequenzierung wird genutzt, um Ganz-Genom-Analysen,

sowie Regionsequenzierungen durchzuführen, aber auch um das Transkriptom, Metagenomik, small RNA-Discovery und genomweite Protein-Nukleinsäure-Interaktionen zu erforschen und auszuwerten.

Die zuvor fragmentierte Template-DNA wird kovalent über spezifische Adaptoren an einen Glasobjektträger (*flow cell surface*) gebunden, auf der die Sequenzierungsreaktion stattfindet. Dieser Schritt wird als *library preparation* bezeichnet und die Präsentation der DNA auf diese Weise erleichtert den Zugang von Enzymen, erwirkt eine hohe Stabilität der Oberflächen-gebundenen DNA-Matrize und eine geringe nicht-spezifische Bindung fluoreszierender Nukleotide. Die anschließende Festphasenamplifikation (*solid-phase amplification*) über eine so genannte *bridge amplification PCR* generiert bis zu 1000 identische Kopien einzelner Moleküle in nächster Nähe zu doppelsträngiger DNA. Ein denaturierender Schritt führt zur Ausbildung kovalent an die *flow cell surface* gebundener einzelsträngiger DNA-Template. Durch diese Methodik wird eine Dichte von Millionen Einzelmolekülclustern pro Quadratzentimeter erreicht. Die nachfolgende Sequenzierung durch Synthese (*sequencing by synthesis, SBS*)-Technologie nutzt vier fluoreszenz-markierte Nukleotide um die Millionen Cluster auf der Durchflusszelloberfläche parallel zu sequenzieren.

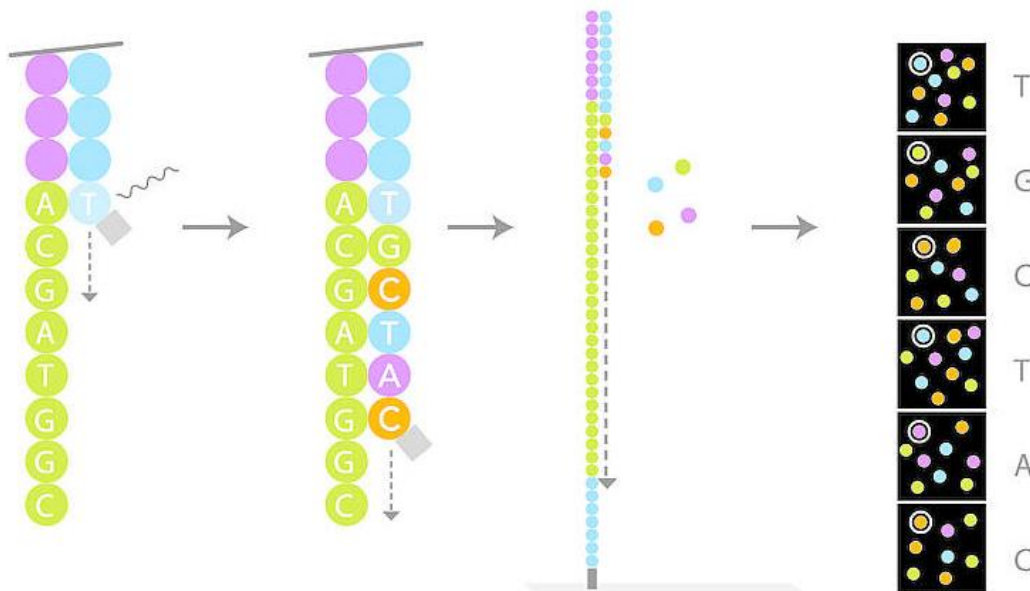


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der SBS (Sequencing by Synthesis)-Methodik: Einbau der komplementären Fluoreszenz-markierten Nukleotide; Abspaltung der Terminatorgruppe und zyklusbasierte Sequenzierung (Abbildung von Illumina Inc., San Diego)

Während jedes einzelnen Sequenzierungszyklus, wird ein markiertes Desoxyribonukleotid (dNTP) zu der Nukleinsäurekette addiert. Dieses Nukleotid dient als Terminator der Polymerisation, so dass nach jeder dNTP-Inkorporation, die Fluoreszenz-Färbung bildlich festgehalten wird und die Base identifiziert werden kann. Enzymatische Spaltung des Terminators erlaubt die Anbindung weiterer Nukleotide. Die vier reversiblen Terminator-gebundenen dNTPs sind als einzelne, separate Moleküle gleichzeitig in der Lösung vorhanden, so dass die natürliche Konkurrenz um die Bindungsstelle unerwünschte Verbindungen verhindert.

Die Identifizierung einzelner Basen wird direkt mit Signalintensitätsmessungen in jedem Zyklus gemacht, was die Lesefehler (*raw error rate*) stark reduziert. Das Endresultat der Illumina-Dye-Sequenzierung ist eine hoch-akkurate Basen/Basen-Sequenzierung, die Sequenz-Kontext spezifische Fehler eliminiert und robuste Basenidentifizierung ermöglicht.

Die nachfolgende Sequenzierung und Datenanalyse wurde bei Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG in Biberach durchgeführt, dabei wurde die differenzielle Expressionsanalyse von mRNA durch die Nutzung des TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc, San Diego, USA) vorbereitet. In diesem Schritt werden poly-A-enhaltende mRNA-Moleküle durch poly-T-Oligo-angehängte, magnetische Beads aufgereinigt, anschließend durch zweiwertige Kationen und erhöhte Temperatur fragmentiert und durch Reverse Transkriptase und Random Primer in Erststrang-cDNA umgeschrieben. Die Synthese des Folgestrangs wird durch DNA Polymerase I und RNase H bewirkt. Endreparaturprozesse, Addition einzelner Adenosin-Basen und die Ligation an die Adaptern beschließen die Vorbereitung, so dass die Produkte abschließend aufgereinigt und vervielfältigt werden können. Die Sequenzierung erfolgte auf dem Genome Analyzer IIx und beinhaltete eine Sequenzierungsbreite von 9 bis 13 Millionen Auswertungen pro Probe (*reads per sample*).

Die Auswertungen wurden sowohl durch die Nutzung der Genomatix Mining Station, als auch an die Ensembl-Datenbank *artificial splice junctions* (Version 62, April 13, 2011) an das murine Genom mittels des Bowtie-Mapping Algorithmus abgebildet. Die differenzielle Expressionsanalyse wurde durch das Bioconductor DESeq-Programm durchgeführt und anhand der gewonnenen Daten eine Ingenuity Pathway-Analyse voll-

zogen, um betroffene biologische Prozesse zu identifizieren. Die Auswertung und Klassifizierung einzelner Gene wurde durch die DAVID-Datenbank (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*) ermittelt.

2.4 Tierexperimentelle Methoden

Die Planung und Durchführung aller Tierexperimente wurde in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzrichtlinien durchgeführt und sind in ihrer Ausführung vom Regierungspräsidium (Darmstadt) des Bundeslandes Hessen genehmigt worden (Akt.Z: V54-19c20/15-F143-33 und V54-19c20/15-F143/68).

2.4.1 Haltung der Tiere

Die Haltung der Versuchstiere fand unter definierten Bedingungen ($22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, *ad libitum*-Fütterung und Wasser, 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus, 4-6 Tiere pro Käfig) in den Räumlichkeiten der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) des Klinikums statt.

2.4.2 Mauslinien

Tierstamm	Geschlecht	Zucht	Alter	Gewicht
C57Bl/6J	weiblich	Harlan, Rossdorf	8-12 Wochen	20 g \pm 2 g
BKS.Cg-m +/+ Lepr ^{db} /J	weiblich	Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA	12 Wochen	45 g \pm 2 g

2.4.3 Wundheilungsstudien, allgemeiner Ablauf

In den Tierversuchen wurden ausschließlich adulte weibliche Tiere im Alter von 8-12 Wochen und einem Gewicht von 20 g \pm 2 g (C57Bl/6J) und 45 g \pm 2 g (BKS.Cg-m +/+ Lepr^{db}/J) verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere anästhesiert (Ketamin 80 mg/kg, Xylazin 10 mg/kg Körpergewicht in PBS) und im Rückenbereich vollständig rasiert. Zum Entfernen abrasierter Haare und zur Desinfektion wurden die Tiere am Rücken mit 70 % EtOH abgesprüht. Die Tiere sind anschließend mit 6 Vollhautexzisionswunden (mit Ausschneiden des *panniculus carnosus*) in symmetrischer Anordnung verwundet worden (Wunddurchmesser: 5-6 mm, Wundabstand: 4-5 mm). Zu festgelegten Zeitpunkten (1, 3, 5, 7, 10 und 13 Tage nach Verletzung) wurden die Wunden einschließlich des Schorfes, der Wundränder, des unterliegenden Granulationsgewebes und angrenzender Fettschichten isoliert.

Die isolierten Gewebeproben wurden pro Tier zusammengelegt und zur Extraktion von RNA und Protein in flüssigem Stickstoff zur weiteren Probenaufbearbeitung tiefgefroren. Zur Anfertigung histologischer Präparate wurde mindestens eine Wunde pro Tier in Formalin- bzw. Zink-Lösung fixiert und anschließend eingebettet. Zur statistischen Auswertung wurden für C57Bl/6J-Tiere 3 individuelle Wundserien á 4 Tiere pro Isolationstag generiert.

2.4.4 Besonderheiten bei Applikation des BAWD

Ergänzend zu den allgemeinen Abläufen der Wundheilungsstudien wurden BKS.Cg-m^{+/+} Lepr^{db}/J vor Versuchsbeginn (16 h zuvor) gehungert. Die Tiere wurden nach der Rückenrasur nicht mit 70 % EtOH, sondern mit einer EtOH-freien Hautdesinfektion abgesprüht, um die Wirkstoffkomponente des BAWD (Keratinozyten) nicht zu zerstören. Der Blutzuckerspiegel wurde während der Wundverletzung bestimmt und protokolliert.

Nach Wundverletzung wurden die ausgeschnittenen Wundareale mit ausgestanztem BAWD (6 mm Durchmesser) mit der Effektorseite (Keratinozyten) nach oben bedeckt. Die Applikate wurden mit Gaze verschlossen und der Mause Rücken mit Tegaderm zur Fixierung abgeklebt.

Es wurden zwei Versuchsreihen angefertigt. In der ersten Versuchsdurchführung wurden 14 Tiere mit 6 Exzisionalwunden verwundet und mit BAWD, Laserskin bzw. ohne Wirkkomponente (nur Gaze) für 3 bzw. 10 Tage behandelt. Die Isolation von Proben für histologische Untersuchungen und RNA wurde an Tag 3 (n=7 Tiere, n=14 Wunden/Behandlung) und Tag 10 (n=7 Tiere, n=14 Wunden/Behandlung) durchgeführt. In der zweiten Versuchsdurchführung wurden 6 Tiere verletzt und links- bzw. rechtsseitig mit BAWD bzw. Laserskin abgedeckt. Die Isolation von Proben erfolgte für histologische Analysen, RNA und Protein an Tag 1, Tag 7 und Tag 10 (jeweils n=3 Tiere, n=9 Wunden/Behandlung). Zum Versuchsende wurde der Blutzuckerspiegel erneut bestimmt und entsprechend protokolliert.

2.5 Zellkulturexperimente

2.5.1 Isolation und Zellkultur von mesenchymalen Stammzellen

In dieser Arbeit wurden mesenchymale Stammzellen (MSC) aus inguinalem Fettgewebe isoliert. Mesenchymale Stammzellen charakterisieren sich dadurch aus, dass sie fähig sind, auf Plastik adhärend kultiviert zu werden, durch die Zugabe von definierten Medien in Zellen mesenchymalen Ursprungs (bspw. Adipozyten oder Osteozyten) differenzieren können und die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (Sca-1, CD29, CD44) aufzeigen.

Zur Gewinnung des inguinalen Fettgewebes wurden die Mäuse getötet und am Abdomen mit sterilen Scheren aufgeschnitten. Die Präparation des freigelegten Fettgewebes erfolgte mit sterilem Operationsbesteck. Das präparierte Gewebe wurde in vorbereitete, mit PBS-gefüllte Falcon-Gefäße (50 ml) überführt und zur weiteren Behandlung auf Eis gelagert. Insgesamt wurden drei verschiedene Isolationen aus jeweils sechs Tieren durchgeführt.

Die Isolation der MSC wurde innerhalb von 30 Minuten nach Gewebextraktion begonnen. Das Fettgewebe wurde unter der Laminar Flow (LF) mit sterilen Scheren zerkleinert, mit PBS gespült und in neue Falcon-Gefäße überführt. Eine äquivalente Menge (1:1 zur Menge an PBS) an Collagenase-Lösung wurde addiert und die Zellsuspension für 90 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde die nunmehr trübe Lösung zentrifugiert (5 Minuten, 1200 UpM). Dabei wurde eine Auftrennung in fettiges Öl (obere Phase); Primäradipozyten (mittlere Phase) und die *stromal vascular fraction* (SVF; untere Phase) erreicht. Die SVF war als dunkelrotes Zellpellet am Gefäßboden auszumachen. Das fettige Öl und die Primäradipozyten wurden vorsichtig abgesaut. Eine Menge von 10 ml der Collagenase-Lösung wurde auf der SVF gelassen, mit 10 ml vorgewärmter 1 %-BSA-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 Minuten, 1200 UpM).

Der zentrifugierte Überstand wurde vorsichtig abgezogen, das Zellpellet erneut mit 1 %-BSA-Lösung resuspendiert und durch einen sterilen 40 µM-Filter pipettiert. Nach einer abschließenden Zentrifugation (5 Minuten, 1200 UpM) wurde das gewonnene Zellpellet

in Zellkulturmedium (DMEM, 10 % FCS, 1 % P/S) aufgenommen und in Zellkulturgefäßen zur weiteren Kultivierung ausplattiert.

Das Wachstum der MSC wurde täglich kontrolliert. Sobald ein zu 80 %- 90 % konfluenter Zellwuchs vorlag, wurde die Kultur passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaut, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die abgelösten Zellen vereinzelt und die Reaktion mittels DMEM-Vollmedium gestoppt. Zur Passagierung wurde eine zur Wachstumsfläche der Zellkulturflasche entsprechende Zellzahl ausgelegt.

2.5.2 Zellkultur von Kerationzyten und Gewinnung konditionalen Überstandes

Zur Gewinnung von konditioniertem Medium wurden adulte, humane HaCaT-Keratinocyten, sowie die von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellten KCBI-Keratinocyten verwendet.

Die Zellkultur der KCBI-Keratinocyten erfolgte mit Promocell-Medium. HaCaT-Keratinocyten wurden mit DMEM-Medium kultiviert. Die Zellen wurden bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert, mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden Zellmedium versorgt. Der Zellkulturüberstand wurde nach einer 7-tägigen Inkubation isoliert, in Falcon-Röhrchen gesammelt und mittels einem 0,22 µm-Filter steril filtriert. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Überstand bei – 20° C gelagert.

2.5.3 Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Adipozyten und Osteozyten

Aus dem inguinalen Fettgewebe gewonnene MSCs wurden zur Differenzierung in Adipozyten und Osteozyten in 35mm-Zellkulturschalen mit 10^4 Zellen/ cm² ausplattiert. Zur Differenzierung der MSCs wurde am nächsten Tag das Medium abgezogen und durch definiertes Differenzierungsmedium ausgewechselt (Adipozyten: 0,5 µM Hydrocortison, 0,2 µM IBMX, 5 µg/ml Insulin; Osteozyten: 5 µg/ml Ascorbinsäure, 10 mM β-Glycerophosphat, 0,25 µM Dexamethason). Das Differenzierungsmedium wurde 2x/ Woche gewechselt.

Die Differenzierung von MSCs in Adipozyten wurde nach 14 Tagen über eine Oil-Red-O-Färbung bestimmt. Dazu wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und in einer 10 %-igen Formalin/ PBS-Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Das Formalin wurde durch 4-maliges Waschen mit destilliertem Wasser ausgespült und die Zellen für 2x 5 Minuten in Propylenglykol inkubiert und anschließend abgezogen. Die auf 60 °C vorgewärmte Oil-Red-O-Lösung wurde hinzugefügt und für weitere 7 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die Färbung wurde durch 2-maliges Waschen mit einer 85 %-Propylenglykol-Lösung gestoppt und abschließend mehrmals mit Wasser vorsichtig gespült. Im Anschluss zu der Färbung wurde zur besseren Visualisierung eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt und die gefärbten Zellen abschließend in PBS gewaschen. Das Resultat der Oil-Red-O-Färbung wurde am BZ-8000K-Mikroskop fotodokumentiert.

Die Differenzierung von MSCs in Osteozyten wurde nach 21 Tagen mittels einer Alizarinrot S (1,2-Dihydroxy-anthrachinon)-Färbung nachgewiesen. Osteozytäre, Kalzium-einlagernde Zellen lassen sich durch Alizarinrot S über eine Chelat-Verbindung intensiv rötlich darstellen. Für die Färbung wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und in einer 10 %-igen Formalin/PBS-Lösung fixiert (15 Minuten, Raumtemperatur). Durch mehrmaliges Waschen mit Wasser wurde das Formalin ausgespült und die Zellen mit Alizarinrot S-Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Färbemittel wurde mit PBS ausgewaschen und die Zellen am BZ-8000K-Mikroskop fotodokumentiert.

2.5.4 FACS-basierte Detektion MSC-assoziierter Oberflächenmoleküle

Zur Detektion MSC-assoziierter Oberflächenmoleküle (Sca1, CD29 und CD44) über die FACS-Methode wurden die MSCs in 175 cm²-Zellkulturflaschen ausplattiert und bis zur 90 %-igen Konfluenz kultiviert. Um die Oberflächenmoleküle nicht zu zerstören, wurden die Zellen nicht wie sonst für die Passagierung üblich mit Trypsin/EDTA behandelt, sondern mit Accutase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) abgelöst. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die gelösten Zellen vereinzelt und die Zellzahl bestimmt. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben.

2.5.5 Stimulation der MSCs mit konditioniertem Kerationzyten-Überstand

Um den Einfluss von Kerationzyten auf die Differenzierung von MSCs zu untersuchen, wurden aus 3 verschiedenen Isolationen gewonnene MSCs mit Keratinozyten-konditioniertem Überstand stimuliert. Die MSCs wurden dazu in 35 mm-Zellkulturschalen in einer Dichte von 10^4 Zellen/ cm^2 ausplattiert. Nach einer Ruhephase von 24 Stunden nach Aussaat wurden die MSCs mit konditioniertem Medium stimuliert. Das Medium wurde wie in Kapitel 2.5.2 isoliert und vor dem Einsatz auf 37 °C erwärmt. Das konditionierte Medium wurde mit frischem MSC-Medium vermischt (konditioniertes HaCaT-Medium 50 %: 50 % mit frischem Medium; konditioniertes KCBI-Medium 25 %: 75 % mit frischem Medium). Ein Mediumwechsel erfolgte 2x/ Woche.

Unstimulierte, in normalem Kulturmedium kultivierte MSCs wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Isolation der stimulierten bzw. Kontrollzellen erfolgte nach 3, 7 und 10 Tagen mittels TRIzol (siehe 2.3.2). Die Ausführung der RT-PCR-Analysen wurde durchgeführt wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben.

2.6 Übersicht der Experimente

a) in vitro	KCBI-1-Zellen		Mesenchymale Stammzellen	
Zeitpunkt	3h + 24h		versch. Passagen	Tag 3, Tag 7, Tag 10
Isolation	mRNA		Zellen	mRNA
Untersuchung	Genomsequenzierung		Histologie, FACS	qRT-PCR
Abbildung	3.2 + Tab. 3.1		3.29 – 3.34	3.35 + 3.36

b) in vivo	db/db-Mäuse				C57/Bl6
Zeitpunkt	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 10	Tag 1 – Tag 13
Isolation	Protein	mRNA, Wunde	Protein	mRNA, Blut, Wunde	Protein, Wunde, mRNA
Untersuchung	ELISA	qRT-PCR	Western Blot, ELISA, ProteomProfiler	Blutzucker, Größe, Histologie, qRT-PCR, Genomsequenzierung	Western Blot, ProteomProfiler, qRT-PCR, Histologie, FACS
Abbildung	3.6	3.6, 3.7, 3.9, 3.12, 3.13, 3.15, 3.16, 3.19, 3.20, 3.24	3.8, 3.11, 3.13, 3.16, 3.20	3.4 – 3.6, 3.7, 3.9 + 3.10, 3.12 – 3.20, 3.24 + Tabelle 3.2	3.7 – 3.13, 3.15, 3.21 + 3.22, 3.25 – 3.28

III Ergebnisse

3.1 BAWD als zelluläres Therapeutikum zur Behandlung diabetischer Wunden

Das biologisch-aktive Wund dressing (BAWD) der Firma Boehringer Ingelheim kann nach Tabelle 1.1 in die Gruppe der epidermalen Therapeutika zur Behandlung diabetischer Wunden klassifiziert werden. Der Zellträger besteht aus einer semipermeablen, biologisch abbaubaren, hyaluronhaltigen Matrix (Laserskin) und wird mit lebenden, allogenen, interfollikulären Keratinozyten (KCBI 1) besiedelt, bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und für eine spätere Anwendung kryokonserviert (Abbildung 3.1).

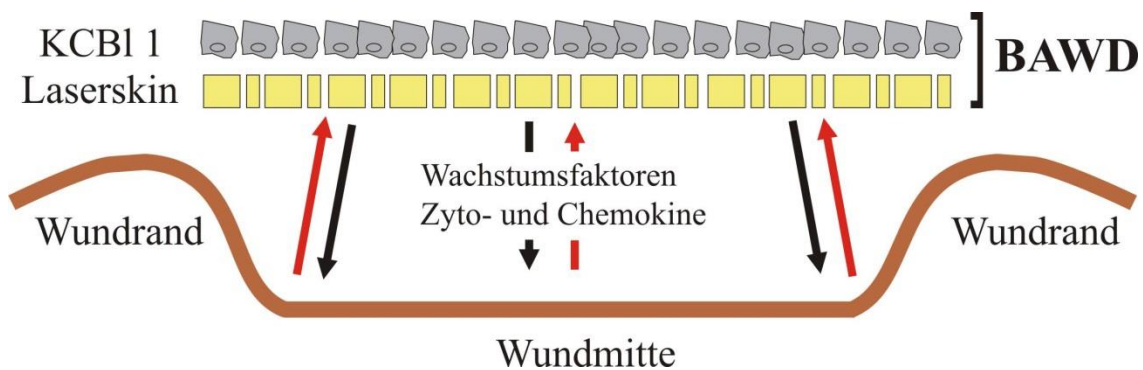


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des BAWD

Keratinozyten (KCBI1) werden auf einer hyaluronhaltigen Trägermembran (Laserskin) kultiviert und nach vollständiger Konfluenz auf die heilende Wunde aufgelegt. Das BAWD interagiert (rote und schwarze Pfeile) mit der Wunde durch die Aufnahme und Freisetzung wichtiger Wachstumsfaktoren, Zyto- und Chemokine.

Ein wesentlicher Vorteil der Behandlung mit BAWD besteht in der Tatsache, dass eine Interaktion nach Exposition lebender Zellen mit dem individuellen Wundgewebe erreicht werden kann. Anders als inerte Wundverbände, die lediglich das heilende Gewebe bedecken, soll mit der Applikation von BAWD eine dynamische Wundheilung erreicht werden, in der das biologisch-aktive Wund dressing kontext-abhängig mit den spezifischen Wundmediatoren reagiert [Lazic und Falanga, 2011].

In der vorliegenden Arbeit sollte die Antwort des BAWD auf wundrelevante Mediatoren *in vitro* untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Chargen (n=3) kultivierten BAWDs (siehe 2.1.3) in unabhängigen Versuchsdurchführungen (n=2) mit 20 ng/ml IL-

1 β und 50 ng/ml TNF- α für 3 und 24 Stunden stimuliert, um eine Genexpression zu induzieren. Die differentielle Genexpressionsanalyse erfolgte mittels der Illumina-Dye-Sequenzierung (siehe 2.2.9).

Nach den *in vitro*-Analysen des BAWD sollte die Funktionalität und Wirksamkeit des BAWD in tierexperimentellen Untersuchungen an diabetischen *db/db*-Mäusen *in vivo* getestet werden. *db/db*-Mäuse, die homozygot für die Punktmutation am Leptin-Rezeptor (*Lep^r^{db}*) sind, werden 3 bis 4 Wochen nach Geburt übergewichtig und zeigen schon früh stark erhöhte Plasmainsulin- und Blutzuckerwerte. Die Verwendung dieser Tiere als Tiermodell wird u.a. durch die Diabetes-bedingte gestörte Wundheilung begründet [Wetzler et al., 2000; Chatzigeorgiou et al., 2009; Seitz et al., 2010; Wang et al., 2014].

Für die *in vivo*-Untersuchung wurden *db/db*-Tiere an der Rückenhaut mit Exzisionswunden verletzt und die Wundaufgaben aufgebracht. Dabei wurden die Wunden entweder mit Gaze (Cuticerin), mit Laserskin (Matrix+Cuticerin) oder mit BAWD (Cuticerin+Matrix +Keratinocyten) bedeckt. Die Behandlung mit Laserskin diente als Behandlungskontrolle. Um den kompletten Verlauf der Geweberegeneration nach Verletzung zu untersuchen, wurden die Tiere nach 1, 3, 7 und 10 Tagen getötet und die Wunden mit Wundrand und Granulationsgewebe für weitere Analysen isoliert. Die Haut unverletzter Tiere wurde als Kontrolle entnommen.

3.1.1 Differentielle Genexpression als Antwort auf *in vitro*-Stimulation des BAWD mit wundrelevanten Mediatoren

Nach *in vitro*-Stimulation des kultivierten BAWDs mit IL-1 β und TNF- α konnten 66 Gene als reguliert identifiziert werden (Abbildung 3.2, 3h). Nach einer 24-stündigen Stimulation wurde eine deutliche Zunahme induzierter Transkripte identifiziert. (Abbildung 3.2, 24h). Die vollständige Auflistung ist in Anhang 7.4.1 zu sehen.

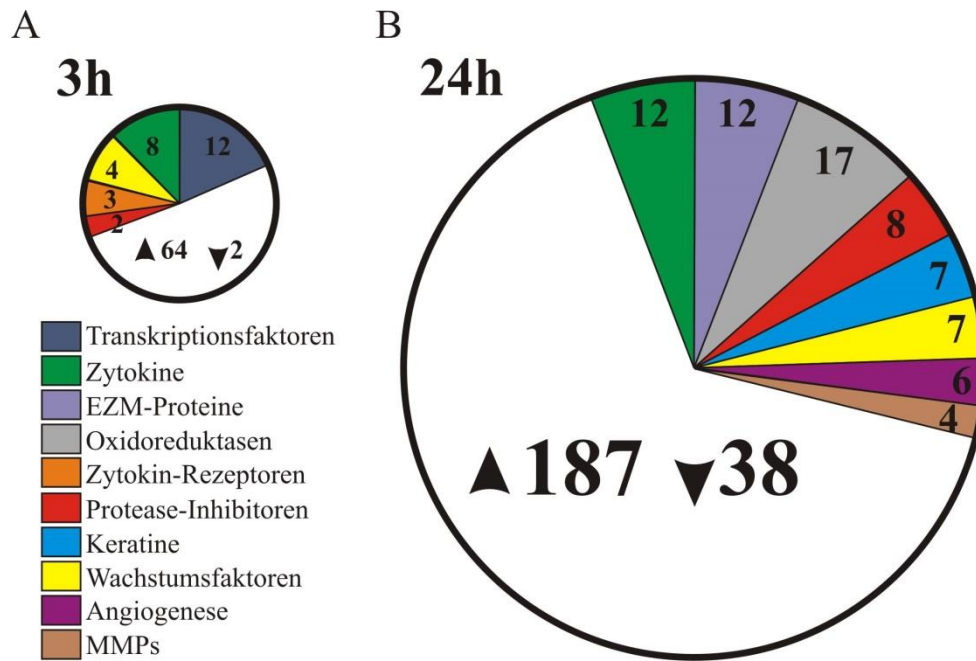


Abbildung 3.2 – Differentielle Genexpression des BAWD nach *in vitro*-Stimulation mit IL-1 β und TNF- α

Vollständig konfluente, auf der Trägermembran (Laserskin) kultivierte Keratinozyten (n= 3 Chargen) wurden in unabhängigen Versuchen (n=2) mit 20 ng/ml IL-1 β und 50 ng/ml TNF- α für 3h und 24h stimuliert. Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels der Illumina-Dye-Sequenzierung. (A) Eine 3-stündige Stimulation resultierte in der differentiellen Expression von insgesamt 66 Genen, die größtenteils nach Stimulation hochreguliert waren. (B) 225 Gene waren nach einer 24-stündigen Stimulation differentiell exprimiert. Die Genexpression von 38 Genen war im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen reduziert, 187 Gene zeigten eine induzierte Genexpression.

In der Analyse nach einer 24-stündigen Stimulation wurden 38 Gene bestimmt, deren Expression herunterreguliert war, während Transkripte von 187 Genen erhöht vorlagen (Abbildung 3.2, 24h). Das Genbank-Alignment mit der DAVID-Datenbank (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*, DAVID) ermöglichte unter diesen Transkripten die Identifizierung von 12 EZM-Molekülen, 12 Zytokinen und 7 Wachstumsfaktoren, die diverse wundheilungsrelevante Aufgaben übernehmen und unterschiedliche funktionale Eigenschaften aufweisen.

Der Vergleich der Genexpressionsmuster nach 3- und 24-stündiger Inkubation zeigte, dass die Wirkstoffkomponente des BAWD, die lebenden Keratinozyten, zu Beginn der Stimulation verstärkt Transkriptionsfaktoren (*Interferon regulatory factor 1/-2* [IRF1 und IRF2] und *mothers against decapentaplegic homolog 3* [SMAD3]) sowie Zyto- und Chemokine (CXCL1, CXCL2, CXCL8) exprimieren (Abbildung 3.2 und Anhang 7.4 [Tabelle 7.1]).

III Ergebnisse

Die 24-stündige Stimulation der BAWD-Keratinocyten induzierte die Expression von Wachstumsfaktoren wie FGF2, HB-EGF und TGF- β 3 (Tabelle 3.1). Darüber hinaus lag das mRNA-Niveau pro-angiogener Faktoren wie FGF2, Thymidinphosphorylase (TYMP), Ananyl-Aminopeptidase (ANPEP) und TNF- α -induziertes Protein-(TNFAIP)-2 erhöht vor. Interessanterweise zeigte das BAWD zudem durch die Expression einer Vielzahl von Zyto- und Chemokinen eine mögliche, immunmodulatorische Funktion, so dass auch in Kombination mit der deutlichen erhöhten Expression extrazellulärer Matrixkomponenten und Zelladhäsionsmolekülen wie Kollagen Typ XII und XXIII, Fibronectin, Laminin-322, ICAM1 und der Hyaluronsynthase-2 (HAS2) die Befunde auf einen potentiellen, wundheilungsmodulierenden Effekt des BAWD hindeuteten (Tabelle 3.1). Aufgrund der Stimulation war die Expression distinkter Keratine (Keratin 1,4, 9, 10 und 13) sowie von Loricrin im Vergleich zu unstimulierten Keratinocyten herabgesetzt und wies auf eine Inhibition der epidermalen Enddifferenzierung hin (Tabelle 3.1)

Tabelle 3.1: Übersicht differenziell-exprimierter Gene nach 24-stündiger Stimulation

	Gene	log2 der x-fachen Änderung		Gene	log2 der x-fachen Änderung
Wachstumsfaktor	FGF2	+2,10 \pm 0,84	Extrazelluläre Matrix	Kollagen Typ XII	+1,26 \pm 0,29
	HBEGF	+1,85 \pm 0,24		Kollagen Typ XXII	+1,96 \pm 0,11
	TGF- β 3	+1,37 \pm 0,35		Fibronectin	+2,52 \pm 0,36
pro-angiogene Faktoren	ANPEP	+1,65 \pm 0,13		Laminin-322	+1,59 \pm 0,10
	TNFAIP-2	+1,50 \pm 0,68		HAS2	+2,46 \pm 0,24
	TYMP	+1,73 \pm 0,03		ICAM1	+2,15 \pm 0,53
Zyto- und Chemokine	CCL20	+2,53 \pm 1,30		epidermale Enddifferenzierung	Keratin 1
	CXCL1	+2,06 \pm 1,12	Keratin 4		-1,97 \pm 0,45
	CXCL3	+2,11 \pm 0,34	Keratin 9		-2,96 \pm 0,76
	CXCL8 [IL-8]	+2,48 \pm 0,61	Keratin 10		-1,70 \pm 0,17
	IL-1 α	+1,26 \pm 0,12	Keratin 13		-1,54 \pm 0,07
	IL-1 β	+1,18 \pm 0,12	Loricrin		-2,39 \pm 0,21

3.1.2 BAWD-vermittelter Aufbau von Granulationsgewebe

Die *in vitro*-Stimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF- α hat eindrucksvoll die mRNA-Expression wundrelevanter Faktoren durch die Keratinozyten stimuliert. Dabei wurde die Expression von Mediatoren gezeigt, die in unterschiedlichen Phasen der Wundheilung eine wichtige Funktion übernehmen. Da die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α in der frühen Phase der kutanen Wundheilung exprimiert werden (Hübner et al., 1996), sollte im Nachfolgenden geklärt werden, ob die BAWD-Keratinozyten im Kontext gestörter Wundheilung in der Lage sein würden, eine Defektsituation zu verbessern. In diesem Zusammenhang wurde das diabetische *db/db*-Mausmodell verwendet und die Wundheilung in diabetischen Wunden unter BAWD-Behandlung untersucht. Im Kontext zu Fragestellungen diabetischer Wundheilung ist die experimentelle Verwendung von genetisch-prädisponierten Diabetes mellitus-Typ-2-entwickelnden Mäusen (*ob/ob* und *db/db*) von großer Bedeutung [Frank et al., 1995; Wetzler et al., 2000; Goren et al., 2003; Goren et al., 2007; Chatzigeorgiou et al., 2009; Seitz et al., 2010; Wang et al., 2014].

3.1.2.1 Makro-und mikroskopische Wundevaluation nach BAWD-Behandlung

Um eine Interaktion von BAWD mit dem Wundgewebe zu gewährleisten, war die Fixierung der Wundaufgabe auf das Wundgewebe wichtig. Dabei wurden die Wunden entweder mit Gaze (Cuticerin), mit Laserskin (Matrix+Gaze) oder mit BAWD (Gaze+Matrix+Keratinozyten) bedeckt (Abbildung 3.3, A). Die verschiedenen Wundaufgaben wurden abschließend mit einem atmungsaktiven Verband fixiert, so dass ein vorzeitiges Ablösen verhindert werden konnte.

Nach 10-tägiger Behandlung zeigten BAWD-behandelte Wunden diabetischer Tiere im Vergleich zu Laserskin eine deutlich verbesserte Reepithelialisierung, die auf Grundlage der Wundfotos (Abbildung 3.3, B, Aufsicht) und histologischer Schnitte evaluiert wurde (Abbildung 3.4 B). Der Übergang migrierender Keratinozyten vom Wundrand in die Wundmitte stellt im Zuge der Reepithelialisierung für den Erfolg einer Heilung einen wesentlichen Prozess dar, der u.a. die Heilungschancen nach einer Applikation mit biologisch-aktiven Wunddressings verdeutlicht [Philipps und Gilchrest, 1990; Lasic und Falanga, 2011]. Darüber hinaus konnten erste Anzeichen für eine verbesserte Angiogenese gewonnen werden, da BAWD-behandelte Wunden makroskopisch eine deutliche Zunahme von Blutgefäßen zeigten (Abbildung 3.3, B, Rückansicht).

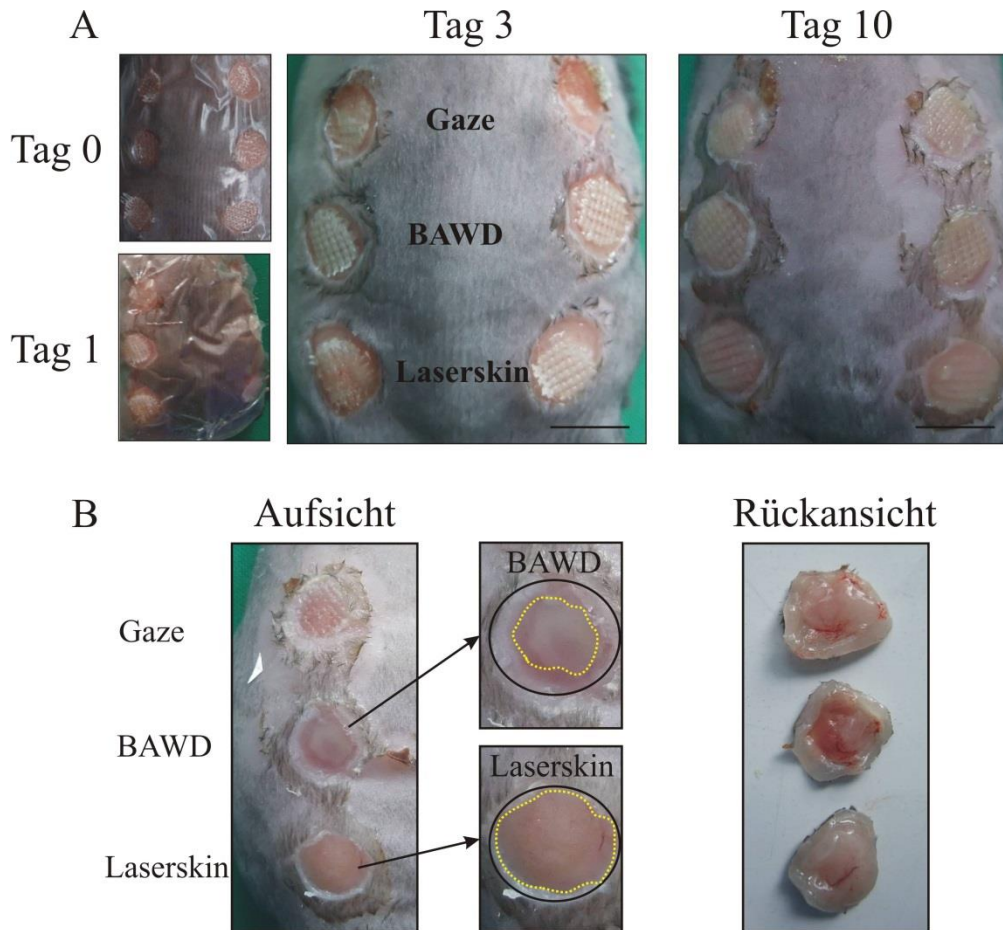


Abbildung 3.3 – Tierexperimentelle Applikation von BAWD

Die Fixierung der Wundauflage war über den kompletten Heilungsverlauf wichtig. (A) Die Wunden verletzter Tiere wurden dazu mit BAWD, einer Gaze (Cuticerin) und mit Laserskin bedeckt und mit einem atmungsaktiven Fixierverband (Tegaderm) fixiert. (B) Nach Versuchsende (Tag 10) wurde nach BAWD - Behandlung eine verbesserte Wundheilung mit ausgeprägter Reepithelialisierung (*Kreis und gelbgestrichelte Linie*) und deutlich verbesserter Ausbildung vaskulärer Strukturen festgestellt werden. Messbalken: 5mm

Nachfolgende histologische Untersuchungen bestätigten die makroskopischen Befunde der verbesserten Reepithelialisierung. Die BAWD-behandelten Wunden wiesen dabei eine starke Reepithelialisierung auf (Abbildung 3.4, B). Nach Auswertung der histologischen Wundschnitte (Tag 10) war der offene Wundbereich von 4,8 mm ($\pm 0,4$ mm) bei Laserskin-behandelten Wunden aufgrund der BAWD-Applikation auf 3,3 mm ($\pm 0,2$ mm) um ca. 30 % reduziert (Abbildung 3.4, B).

Über die Blutzuckermessung an Tag 0 und am Ende des Versuchszeitraums an Tag 10 konnte keine Senkung der Blutglukose festgestellt werden (Abbildung 3.4, A). Der Glukosespiegel betrug am Versuchsbeginn 529 mg/dL ± 20 mg/dL und blieb bis Tag 10 nach Verwundung (489 mg/dL ± 27 mg/dL) unwesentlich verändert. Die Wirkungswei-

III Ergebnisse

se einer BAWD-Applikation ist somit auf die lokale Wunde begrenzt und alle zu beobachtenden Effekte erfolgten in den *db/db*-Mäusen in der Situation des pathologisch erhöhten Blutzuckers und Insulinresistenz.

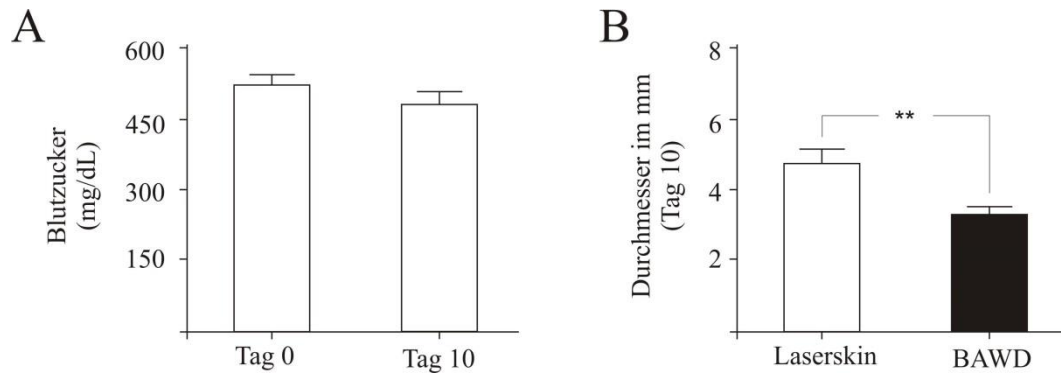


Abbildung 3.4 – Blutzuckerspiegel und Reepithelialisierung

(A) Die Blutzuckermessung erfolgte an Tag 0 (Versuchsbeginn) und an Tag 10 (Versuchsende). Das Futter wurde 16h vor Messung entzogen, um die Nüchtern-Glukosespiegel zu bestimmen. (unpaired-Students-t-Test: nicht signifikant; n=5 Tiere). (B) Der offene Wundbereich an Tag 10 (unpaired-Students-t-Test: ** p<0,01; n=7).

Die BAWD-Anwendung bewirkte eine deutliche Ausbildung von Granulationsgewebe. Dabei induzierte das BAWD ein robustes, ausgeprägtes Granulationsgewebe, das in der Azan-Färbung als kollagen-reich identifiziert wurde (Abbildung 3.5). Die Azan-Färbung ermöglicht die histologische Differenzierung von extrazellulären Bindegewebsfasern, Geweben und Zellbestandteilen. Dabei werden kollagenhaltige Bindegewebsfasern bläulich, das Zytoplasma und Zellkerne rötlich und muskuläres Gewebe orange-rötlich gefärbt. In der histologischen Beurteilung war zudem auffällig, dass unter dem Auflagebereich des BAWD deutlich weniger Fettzellen und eine stärkere Ausbildung von Muskeln beobachtet werden konnte (Abbildung 3.5, unten).

III Ergebnisse

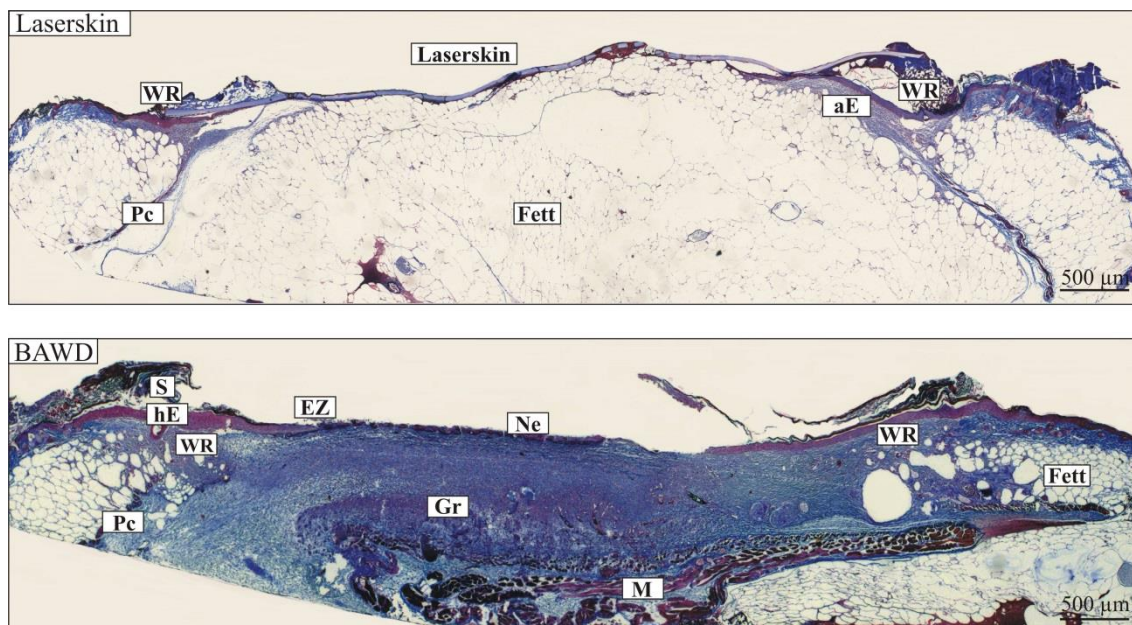


Abbildung 3.5 – BAWD-vermittelte Ausbildung von Granulationsgewebe

Die histologische Differenzierung von extrazellulären Bindegewebsfasern, Geweben und Zellbestandteilen wurde durch die Azan-Färbung ermöglicht. Dazu wurden BAWD- und Laserskin-behandelte *db/db*-Tiere 10 Tage nach Verwundung getötet, der Wundbereich isoliert, mit Zink-Lösung fixiert und geschnitten (4 µm Paraffinschnitte). Die Azan-Färbemethode färbt kollagenhaltige Bindegewebsfasern bläulich, das Zytoplasma und Zellkerne rötlich und muskuläres Gewebe orange-rötlich. WR: Wundrand, Pc: Panniculus carnosus, aE: atrophisches Wundrandepithel, S: Schorf, hE: hyperproliferatives Epithel, EZ: epitheliale Zunge, Ne: Neo-Epithel, Gr: Granulationsgewebe, M: Muskelgewebe

Die Wundbehandlung mit Laserskin (Hyaluronsäurematrix ohne Keratinozyten) zeigte keinen Effekt (Abbildung 3.5, oben). Interessanterweise waren in BAWD-behandelten Wunden die für eine schnelle Reepithelialisierung notwendigen hyperproliferativen Epithelzellen (klare rötliche Färbung an den Wundrändern) besonders gut abzugrenzen und die rötlich-gefärbten Bereiche im Vergleich zur Laserskin-Behandlung vergrößert. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit der histologischen Evaluation der Wunddurchmesser und verdeutlichen, dass, trotz des massiven hyperglykämischen Zustandes, die Anwendung von BAWD zu einer deutlich verbesserten Wundheilung führen kann.

3.1.2.2 BAWD-Interaktion mit murinem Wundgewebe

Wie in Abbildung 3.2 gezeigt, induzierte die *in vitro*-Stimulation mit wundrelevanten Mediatoren (IL-1 β und TNF- α) Gene mit potentiell wundheilungsrelevanter Funktion. Im Zuge der *in vivo*-Applikation bewirkte eine BAWD-Behandlung auf murinen Wunden eine Induktion und Neubildung von Granulationsgewebe (Abbildung 3.5). In

III Ergebnisse

diesem Zusammenhang war es wichtig, die Frage zu klären, ob das BAWD und das murine Wundgewebe miteinander kommunizieren. Dies ist notwendig, da BAWD humanen Ursprungs ist. Dazu wurde die Viabilität und Responsivität des Konstruktes nach Applikation im Heilungsverlauf durch die Evaluation von Keratinozyten-spezifischen humanen Transkripten von VEGF-A (hsVEGF) und CXCL-8 (IL-8) analysiert.

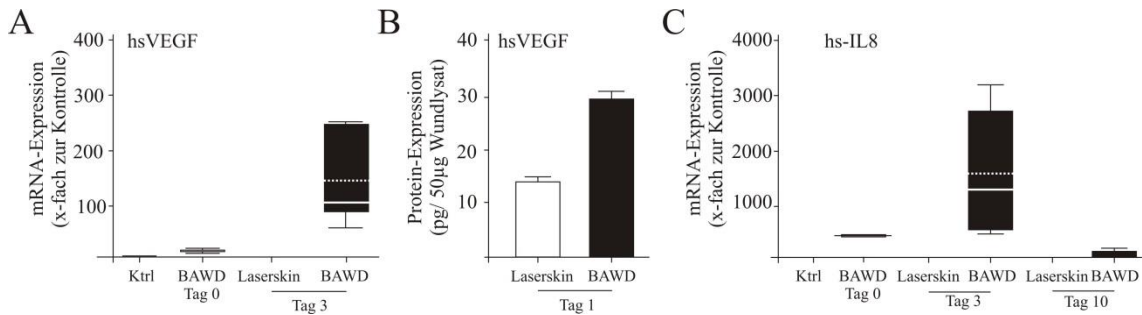


Abbildung 3.6 - Keratinozyten-Interaktion mit murinen Wundmediatoren

qRT-PCR zur Analyse von mRNA-Transkripten von hsVEGF (A) und hsIL-8 (C). Die Wunden (n=2) wurden aus *db/db*-Tieren (n=7) zu definierten Zeitpunkten (Tag 3 und Tag 10) isoliert. BAWD aus der Kultur diente als Kontrolle. Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fache-Induktion im Vergleich zu unverletzter Kontrollhaut und als Boxplot (Median: durchgezogene Linie; Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt. (B) 50µg Gesamtwundlysat wurde zur Bestimmung des hsVEGF-Proteins über ELISA eingesetzt. Dargestellt sind die Boxplots (Median: durchgezogene Linie; Mittelwert: gestrichelte Linie) von Wunden (n=3) aus individuellen Tieren (n=2).

Interessanterweise induzierte murines Wundgewebe die Genexpression von humanem VEGF und IL-8 und deutete auf eine Interaktion zwischen den humanen Keratinozyten des BAWD und murinen Wundmediatoren hin (Abbildung 3.6, A+C). Im Vergleich zu unstimuliertem BAWD aus der Kultur war eine deutliche mRNA-Induktion von hsVEGF und IL-8 nach Wundaufgabe festzustellen. Wie zu erwarten, war in diabetischer Kontrollhaut (Ktrl) und in Laserskin-behandelten Wunden (Laserskin) keine Expression von hsVEGF und IL-8-mRNA nachzuweisen (Abbildung 3.6, A+C).

Eine anschließende Proteinquantifizierung konnte die Anwesenheit von humanem VEGF-Protein aufzeigen (Abbildung 3.6, B), das aufgrund der Spezifität des ELISAs nur auf die Keratinozyten des BAWD als Quelle zurückzuführen sein kann. Die über den Versuchszeitraum andauernde IL-8-mRNA-Expression verdeutlicht, dass humane Keratinozyten auch noch nach 10 Tagen in der Wunde bzw. der Wundaufgabe vorhanden sind und zeigt so das Überleben dieser Zellen in der murinen Wundumgebung (Abbildung 3.6, C).

3.2 Auswirkung der BAWD-Behandlung auf inflammatorische Prozesse

Für einen erfolgreichen Heilungsprozess ist die Kontrolle von Entzündungsreaktionen von großer Bedeutung. Gestörte Entzündungsreaktionen sind die Ursache für Wundheilungsstörungen [Falanga, 2005; Martin und Leibovich, 2005]. Ein wesentlicher Faktor der gestörten Entzündungsreaktion besteht in einer verstärkten Infiltration von PMN und Makrophagen (M Φ) [Fahey et al., 1991; Loots et al., 1998; Frank et al., 2000; Wetzler et al., 2000; Diegelmann et al., 2003]. In zahlreichen Studien ist auf die Bedeutung von PMN und M Φ für den Ausgang einer erfolgreichen Wundheilung hingewiesen worden (siehe 1.2.2.1 und 1.2.2.2).

In unseren Versuchen führte die Behandlung diabetischer Tiere mit BAWD zu einer Induktion und Neubildung von Granulationsgewebe mit induzierter Genexpression in der gestörten Wunde. Es wurde gezeigt, dass das BAWD in der Lage war, auf die gestörte Wundsituation zu reagieren. In diesem Kontext sollte die Auswirkung einer BAWD-Behandlung auf die inflammatorischen Prozesse der Wundheilung untersucht werden. Dazu wurde das Expressionsprofil pro-inflammatorischer Zytokine und chemotaktischer Mediatoren, sowie die Infiltration heilungsrelevanter Immunzellen (PMN und M Φ) untersucht.

3.2.1 Expression pro-inflammatorischer Zytokine

Nach Verletzung wird eine hohe Menge pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β synthetisiert. In der frühen Wundheilung sind PMN und M Φ die zelluläre Quelle dieser pro-inflammatorischen Zytokine [Hübner et al., 1996; Grellner et al., 2000].

Die Ermittlung der mRNA-Spiegel der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α sollte zur Beurteilung der Entzündungsreaktion durchgeführt werden und ist in Abbildung 3.7 aufgeführt.

Die Expression von IL-1 β und TNF- α war in der frühen Phase der Wundheilung diabetischer db/db-Tiere im Vergleich zu unverletzter Kontrollhaut stark induziert und im weiteren Wundheilungsverlauf andauernd (Abbildung 3.7, A+C). Die Anwendung mit BAWD führte nicht zu einer Reduktion der IL-1 β und TNF- α -Expression. Im Vergleich

III Ergebnisse

zum Expressionsprofil von IL-1 β und TNF- α in der normalen Wundheilung war die Expression in der diabetischen Wunde erhöht und in Übereinstimmung mit bereits publizierten Studien (Abbildung 3.7, B+D) [Hübner et al., 1996; Wetzler et al., 2000]. Anders als in der diabetischen Wundheilung war in der akuten Entzündungsreaktion in gesunden Mäusen eine Entzündungsresolution (nach Tag 7) zu beobachten, so dass zum Ende des Beobachtungszeitraums von 13 Tage in der Wunde normal heilender Tiere keine mRNA-Expression beider Zytokine detektiert wurde (Abbildung 3.7, B+D).

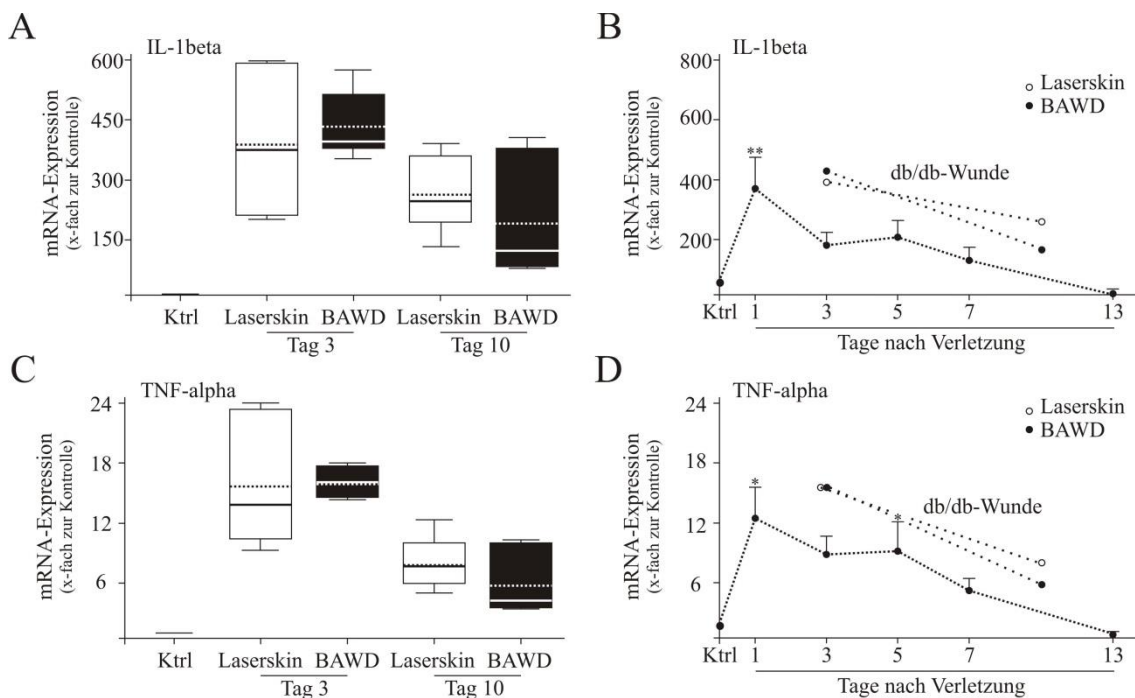


Abbildung 3.7 – mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von IL-1 β und TNF α in diabetischen *db/db*-Mäusen (A+C) und gesunden C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen (B+D). Wunden (n=2) diabetischer Tiere (n=7) wurden zu definierten Zeitpunkten (Tag 3 und Tag 10) isoliert (A+C). Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut und als Boxplot (Median: durchgezogene Linie; Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt. In der akuten Wundheilung ist die mRNA-Expressionskinetik im Wundheilungsverlauf gezeigt (B+D). Die entsprechenden Zeitwerte zeigen Mittelwerte \pm SEM von Wunden (n=36) aus C57BL/6-Tieren (n= 12 Tiere/ Zeitwert aus 3 unabhängigen Versuchsserien). * p<0,05; ** p<0,01 (1way-ANOVA mit Dunnett's Multiple Comparison Test)

Die Proteinexpression von IL-1 β und TNF- α folgte der mRNA-Kinetik und bestätigte die Ergebnisse der mRNA-Analysen (Abbildung 3.8, A+B). Im Vergleich zur normalheilenden Wundsituation war die Zytokinexpression von IL-1 α und IL-1 β in den chronischen Wunden der *db/db*-Mäuse erhöht [Hübner et al., 1996; Wetzler et al., 2000].

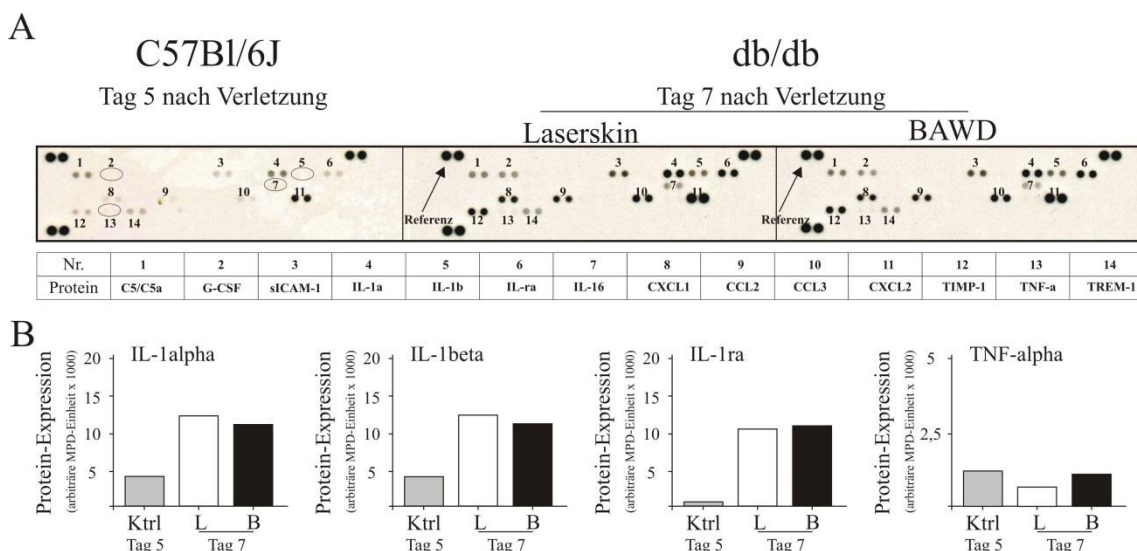


Abbildung 3.8 – Proteinexpression pro-inflammatorischer Zytokine

Zur Bestimmung der Proteinexpression verschiedener Zytokine wurde der Proteome Prolifer™ Array verwendet. (A) 3x50µg (Gesamtmenge: 150µg) Gesamtproteinlysate akuter Tag 5-Wunden (n=24; 2 Wunden á 4 Tiere x 3 Serien) wurde vereinigt. Zur Detektion der Proteinexpression in Laserskin- und BAWD-behandelten Wunden (n=3) diabetischer Tiere (n=3) wurden die Lysate ebenfalls behandlungentsprechend vereinigt und in gleicher Menge (150µg Gesamtprotein) eingesetzt. (B) Quantifizierung der detektierten Immunospots mittels der Software Image J. L= Laserskin, B= BAWD

3.2.2 Chemokine

Die Quantifizierung prototypischer Chemokine kann zur Bewertung initialer und später Entzündungsreaktionen im Wundgewebe herangezogen werden [Wetzler et al., 2000] und wurde in dieser Arbeit zur weiteren Charakterisierung der BAWD-vermittelten Bildung neuen Granulationsgewebes durchgeführt.

Die Expression von GRO α /CXCL1 ist räumlich und zeitlich mit der PMN-Infiltration verbunden und korreliert mit Keratinozytenmigration und Neo-Vaskularisierung [Engelhardt et al., 1998; Werner und Grose, 2003]. Über die quantitative PCR wurde in der gestörten Wunde von *db/db*-Mäusen eine stark erhöhte Expression von CXCL1 und CXCL2 im Vergleich zur akuten Wundheilung in gesunden Tieren detektiert (Abbildung 3.9). Ein Effekt auf die Expression der chemotaktischen Mediatoren nach BAWD-Behandlung wurde aufgrund unveränderter mRNA-Expressionsspiegel ausgeschlossen. Lediglich an Tag 3 nach Verletzung war eine leicht erhöhte CXCL1-Expression nach BAWD vorzufinden, die jedoch in der statistischen Analyse keine Signifikanz aufwies (Abbildung 3.9, A). In der Wundheilung diabetischer *db/db*-Tiere war eine Reduktion der mRNA-Expression im Heilungsverlauf zu beobachten, dennoch waren die Expressionsspiegel im Vergleich zur Wundheilung gesunder Wildtyp-Tiere deutlich erhöht

III Ergebnisse

(Abbildung 3.9, B+D). In der Heilung gesunder Wildtyp-Tiere zeigte die Expressionskinetik von GRO α /CXCL1 eine verstärkte Induktion zu Beginn der Entzündungsreaktion und der Granulationsphase, im Übergang zur Remodellierungsphase (ab Tag 13) war die mRNA jedoch nicht mehr nachweisbar (Abbildung 3.9, B). Interessanterweise zeigte die mRNA-Expression von MIP-2/CXCL2 eine unterschiedliche Kinetik (Abbildung 3.9, D). Dabei war die stärkste Induktion der mRNA in der späten Phase der Entzündung bzw. mit Beginn der Granulationsphase zu ermitteln und konnte in Übereinstimmung mit bereits publizierten Studien gestellt werden [Wetzler et al., 2000].

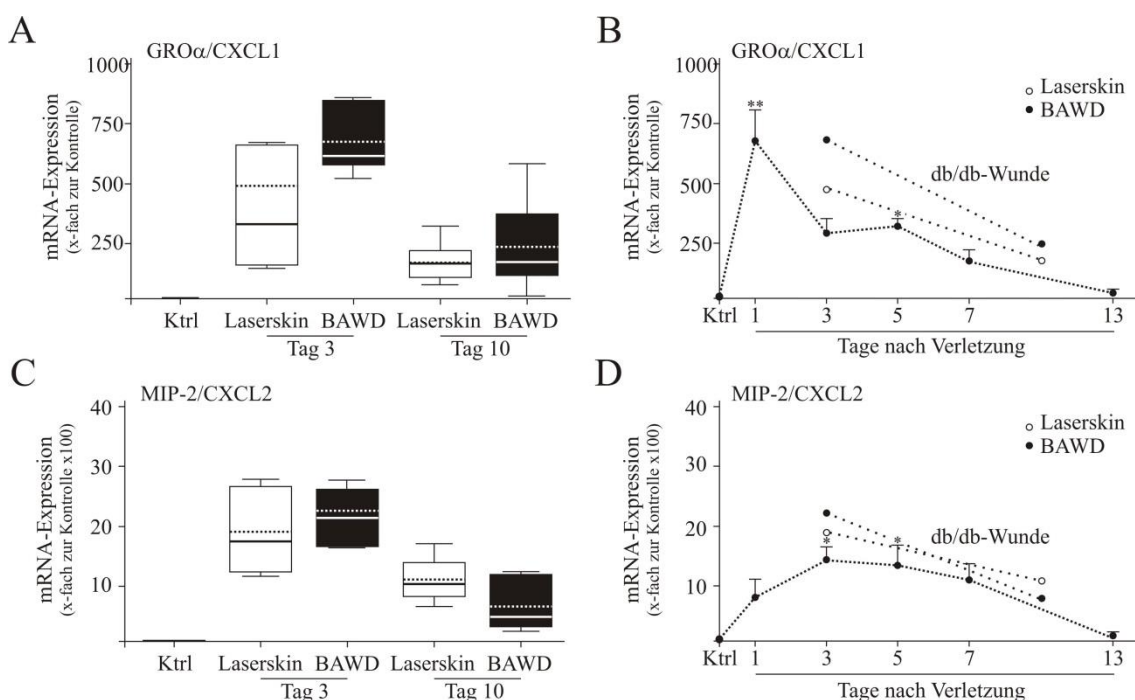


Abbildung 3.9 – mRNA-Expression von CXC-Chemokinen

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von GRO α /CXCL1 und MIP-2/CXCL2 in diabetischen *db/db*-Mäusen (A+C) und gesunden C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen (B+D). Wunden (n=2) diabetischer Tiere (n=7) wurden zu definierten Zeitpunkten (Tag 3 und Tag 10) isoliert (A+C). Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut und als Boxplot (Median: durchgezogene Linie; Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt. In der akuten Wundheilung ist die mRNA-Expressionskinetik im Wundheilungsverlauf gezeigt (B+D). Die entsprechenden Zeitwerte zeigen Mittelwerte \pm SEM von Wunden (n=36) aus C57Bl/6-Tieren (n= 12 Tiere/ Zeitwert aus 3 unabhängigen Versuchsserien). * p<0,05; ** p<0,01 (1way-ANOVA mit Dunnett's Multiple Comparison Test)

Die Evaluation der mRNA von CC-Chemokinen konnte eine starke Induktion von MCP-1/CCL2 in der frühen und späten inflammatorischen Phase in Wunden gesunder Wildtyp-Tiere aufzeigen (Abbildung 3.10, B). Die Expressionskinetik von MIP 1 α /CCL3 korrelierte wie auch die Expression von MCP-1/CCL2 mit der Infiltration von M Φ und zeigte ein transientes Expressionsprofil während der späten

III Ergebnisse

Entzündungsphase (Tag 3 bis Tag 7). Mit dem Ausklingen der inflammatorischen Reaktion ging die CCL2- und CCL3-Expression auf das Basalniveau zurück (Abbildung 3.10, B+D).

In Wunden diabetischer *db/db*-Tiere wurde eine verlängerte und deutlich verstärkte Expression beider CC-Chemokine detektiert. Eine BAWD-modulierte Expression war wie schon für die Expression der CXC-Chemokine nicht festzustellen (Abbildung 3.10, A+C).

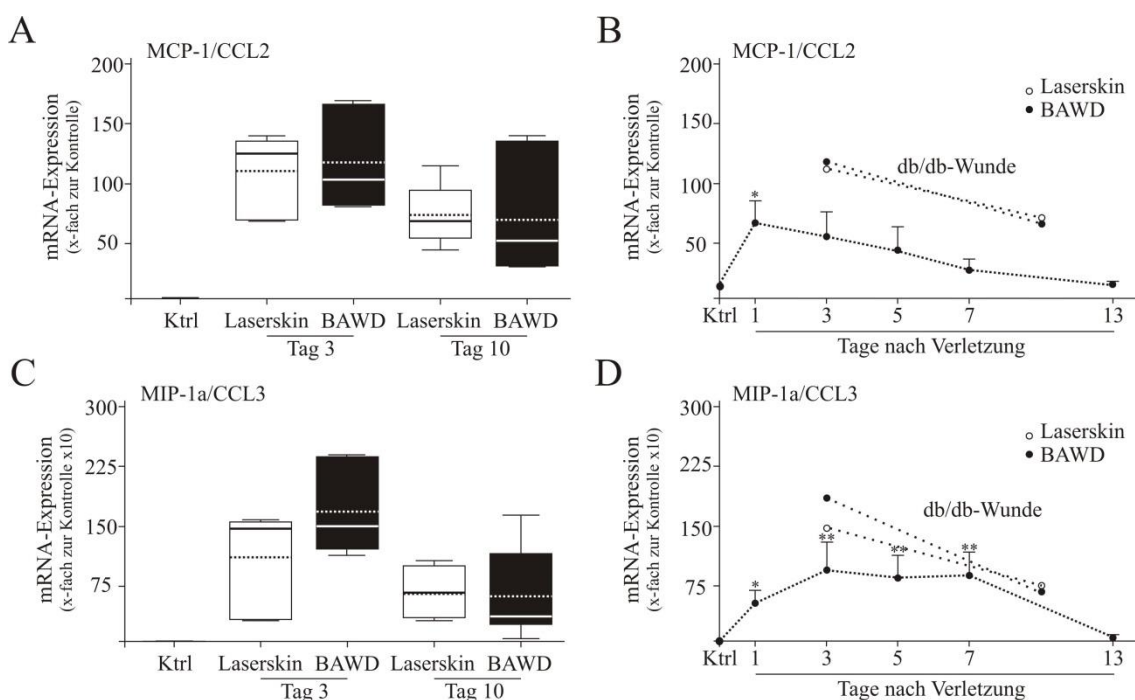


Abbildung 3.10 – mRNA-Expression von CC-Chemokinen

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von MCP-1/CCL2 und MIP-1α/CCL3 in diabetischen *db/db*-Mäusen (A+C) und gesunden C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen (B+D). Wunden (n=2) diabetischer Tiere (n=7) wurden zu definierten Zeitpunkten (Tag 3 und Tag 10) isoliert (A+C). Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut und als Boxplot (Median: durchgezogene Linie; Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt. In der akuten Wundheilung ist die mRNA-Expressionskinetik im Wundheilungsverlauf gezeigt (B+D). Die entsprechenden Zeitwerte zeigen Mittelwerte \pm SEM von Wunden (n=36) aus C57Bl/6-Tieren (n= 12 Tiere/ Zeitwert aus 3 unabhängigen Versuchsserien). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (1way-ANOVA mit Dunnett's Multiple Comparison Test)

Die Auswertung der Proteinexpression der CXC- und CC-Chemokine (CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL3) konnte die mRNA-Analysen verifizieren und bestätigte die stark erhöhte Expression in diabetischer Wundheilung und den ausbleibenden, modulierenden Effekt einer BAWD-Behandlung (Abbildung 3.11, A+B).

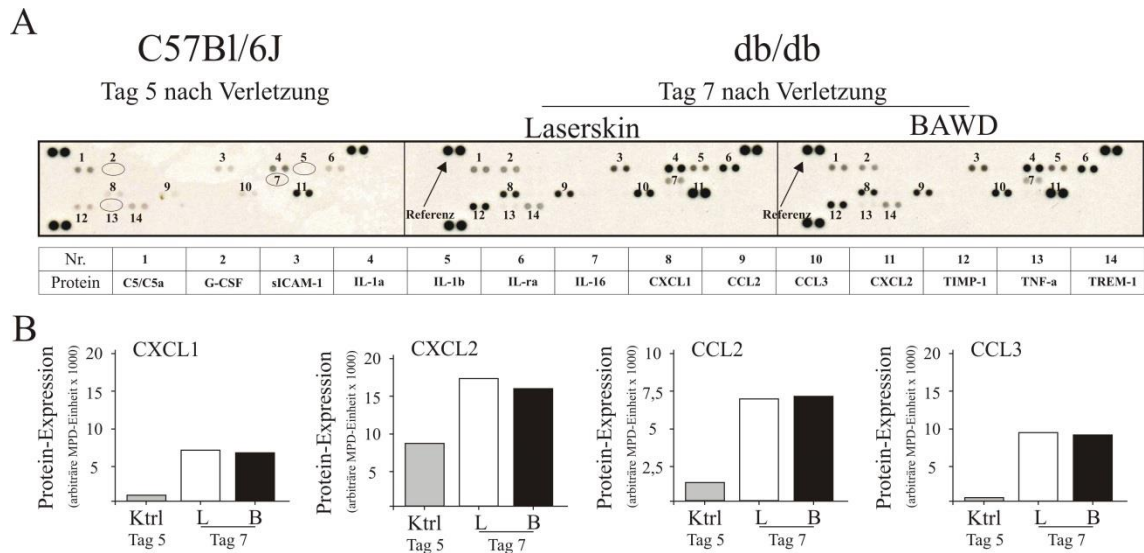


Abbildung 3.11 – Proteinexpression von CC- und CXC-Chemokinen

Zur Bestimmung der Proteinexpression verschiedener Zytokine wurde der Proteome Prolifer™ Array verwendet. (A) 3x50µg (Gesamtmenge: 150µg) Gesamtproteinlysate akuter Tag 5-Wunden (n=24; 2 Wunden á 4 Tiere x 3 Serien) wurde vereinigt. Zur Detektion der Proteinexpression in Laserskin- und BAWD-behandelten Wunden (n=3) diabetischer Tiere (n=3) wurden die Lysate ebenfalls behandlungsentsprechend vereinigt und in gleicher Menge (150µg Gesamtprotein) eingesetzt. (B) Quantifizierung der detektierten Immunospots mittels der Software Image J. L= Laserskin, B= BAWD

Zum Abschluss der Chemokin-Analysen wurde die CXCR-2-Expression untersucht. Der CXCR-2-Rezeptor wird auf Keratinozyten, Endothelzellen im Granulationsgewebe und Neutrophilen exprimiert und wird im Wesentlichen durch die Liganden CXCL1 und CXCL2 aktiviert. In *knock out*-Studien ist auf eine maßgebliche Funktion in der Regulation residenter Wundzellen hingewiesen worden [Devalaraja et al., 2000]. CXCR2-*knock out*-Mäuse zeigen nach Verletzung eine gestörte Rekrutierung von PMN, eine verminderte Neovaskularisierung und verzögerte Epithelialisierung.

Die CXCR-2 mRNA-Expression zeigte in Wunden diabetischer Tiere an Tag 3 eine der normalen Wunden gesunder Tiere entsprechende mRNA-Induktion nach Verletzung (Abbildung 3.12). Die mRNA-Expression war jedoch im weiteren Heilungsverlauf entgegen der normalen Wundsituation anhaltend und deutlich induziert (Abbildung 3.12, A+B). Die unveränderte Expression nach Behandlung war mit den bisherigen Ergebnissen zur Analyse der Chemokinexpression in Verbindung zu bringen. Die mRNA-Expressionskinetik zeigte in der akuten Wundheilung eine deutlich erhöhte mRNA-Induktion in der Entzündungs- und Granulationsphase (Abbildung 3.12, B). Dabei war das Expressionsmaximum zum Zeitpunkt der Granulation (Tag 3 und Tag 5) höher als während der Infiltration von PMN (Tag 1) und zeigt möglicherweise eine weitere Funk-

III Ergebnisse

tion des Rezeptors in Keratinozyten und Endothelzellen im Zuge akuter Wundheilung auf (Abbildung 3.12, B).

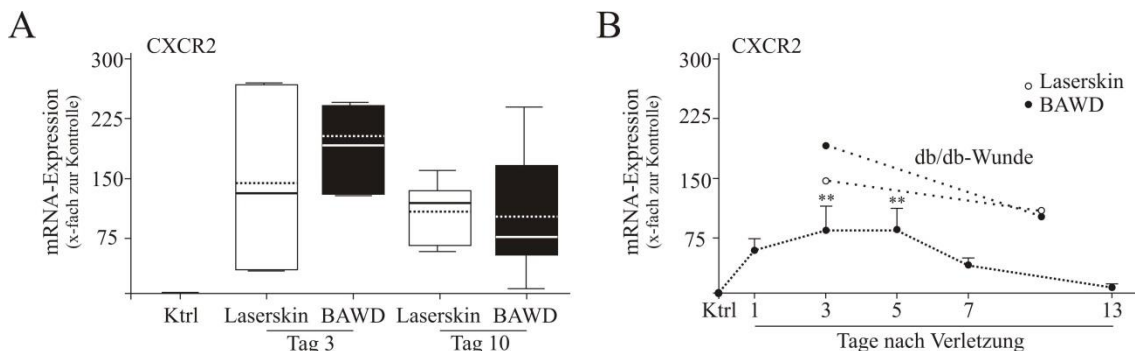


Abbildung 3.12 – mRNA-Expression des Chemokinrezeptors CXCR2

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von CXCR2 in diabetischen *db/db*-Mäusen (A) und gesunden C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen (B). Wunden ($n=2$) diabetischer Tiere ($n=7$) wurden zu definierten Zeitpunkten (Tag 3 und Tag 10) isoliert (A). Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut und als Boxplot (Median: durchgezogene Linie; Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt. In der akuten Wundheilung ist die mRNA-Expressionskinetik im Wundheilungsverlauf gezeigt (B). Die entsprechenden Zeitwerte zeigen Mittelwerte \pm SEM von Wunden ($n=36$) aus C57BL/6-Tieren ($n=12$ Tiere/ Zeitwert aus 3 unabhängigen Versuchsserien). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ (1way-ANOVA mit Dunnett's Multiple Comparison Test)

3.2.3 Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen

Die chemotaktischen Eigenschaften der CC- und CXC-Proteine auf PMN und $M\Phi$ sind für Wundheilungsprozesse im murinen und humanen Organismus vielfach beschrieben [DiPietro et al., 1995; Engelhardt et al., 1998, Wetzler et al., 2000]. Da das BAWD nicht in der Lage war, das Expressionsmuster der inflammatorischen Mediatoren zu verändern, wurde als Folge eine unveränderte Immunzell-Infiltration angenommen. Zur Ermittlung der für die Wundheilung wichtigen Immunzellen wurde die Bestimmung der Expression PMN-spezifischer (Lipocalin [Lcn-2] und GR-1) und $M\Phi$ -spezifischer Marker (Emr1 und F4/80) durchgeführt [Austyn und Gordon, 1981; Cowland und Borregaard, 1997]. Aufgrund der konstitutiven Expression der Immunzell-spezifischen Marker kann deren Expressionsspiegel als Maß für die Anzahl von Immunzellen genutzt werden [Wetzler et al., 2000; Goren et al., 2009]. Immunhistochemische Färbungen zur Lokalisierung der Immunzellen im diabetischen Wundgewebe sollten Aufschluss auf die Zellverteilung im Wundgewebe geben.

III Ergebnisse

Die Untersuchung zeigte für die *Lcn2*- und *Emr1*-mRNA stark induzierte Expressionsspiegel in den Wunden normal-heilender Tiere (Abbildung 3.13, C+D) und stellt so die Infiltrationskinetik der PMN und M Φ während der frühen bzw. späten Entzündungsreaktion dar (siehe 1.2).

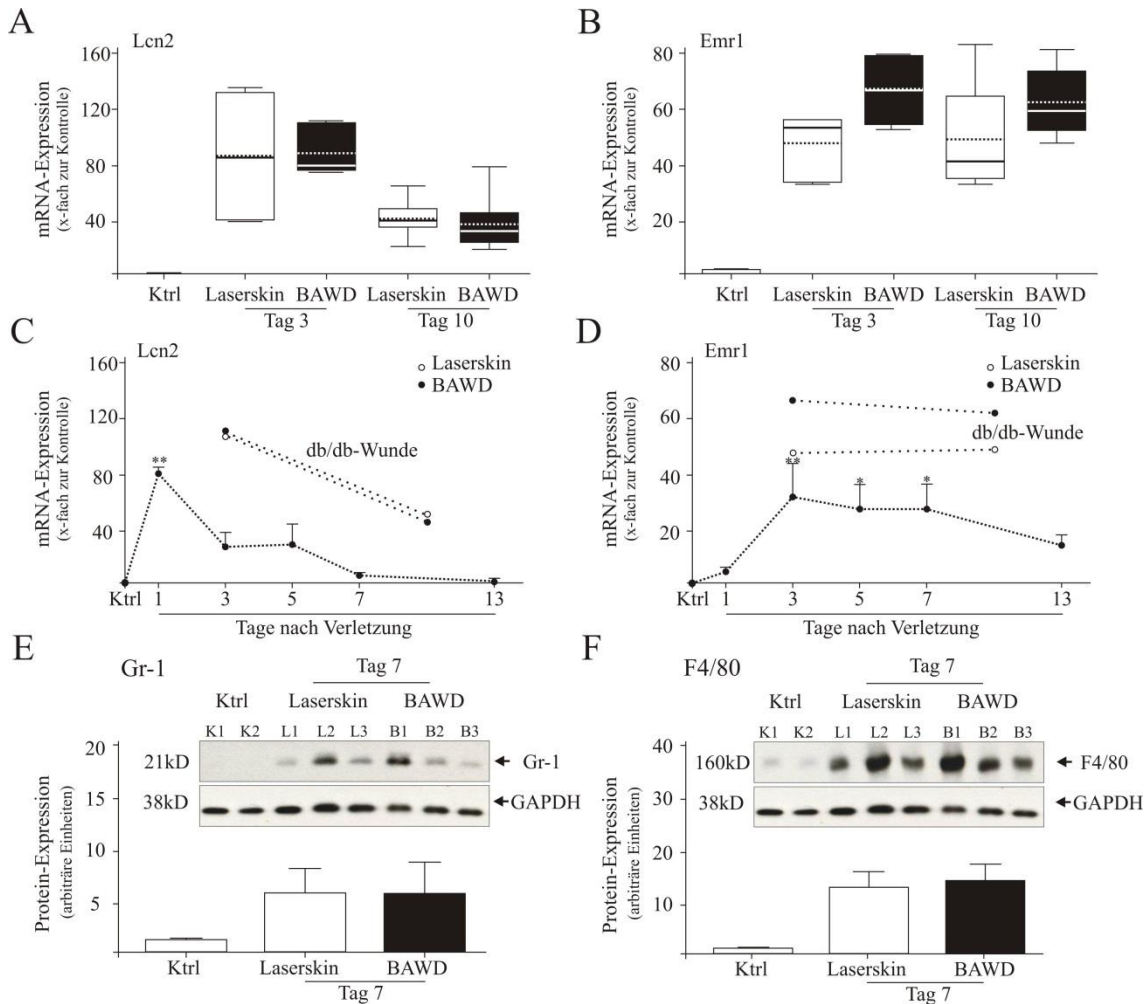


Abbildung 3.13 – Molekulare Analysen zur Infiltration von PMN und M Φ

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von *Lcn2* und *Emr1* in diabetischen *db/db*-Mäusen (A+C) und gesunden C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen (B+D). Wunden (n=2) diabetischer Tiere (n=7) wurden zu definierten Zeitpunkten (Tag 3 und Tag 10) isoliert (A+C). Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut und als Boxplot (Median: durchgezogene Linie; Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt. In der akuten Wundheilung ist die mRNA-Expressionskinetik im Wundheilungsverlauf gezeigt (B+D). Die entsprechenden Zeitwerte zeigen Mittelwerte \pm SEM von Wunden (n=36) aus C57BL/6-Tieren (n= 12 Tiere/ Zeitwert aus 3 unabhängigen Versuchsserien). * p<0,05; ** p<0,01 (1way-ANOVA mit Dunnett's Multiple Comparison Test) Zur Bestimmung der Gr1- (E) und F4/80- (F)-Proteinmenge wurde 50 μ g Gesamtproteinlysat aus Tag-7-Wunden (n=3) diabetischer Tiere (n=3) eingesetzt. Die dargestellten Banden (K1,K2; L1-L3; B1-B3) repräsentieren die individuelle Expression einzelner Versuchstiere. Die Werte wurden quantifiziert und auf die Expression von GAPDH normiert und gemittelt (Mittelwerte \pm SEM).

In der Wundheilung diabetischer Tiere war die mRNA-Expression der spezifischen Marker *Lcn-2* und *Emr1* stark erhöht und über den Wundheilungsverlauf persistierend.

III Ergebnisse

In Korrelation zu den Analysen der Expression pro-inflammatorischer und chemotaktischer Mediatoren war nach BAWD-Behandlung wiederum kein Effekt auf die Expression der Immunzellmarker identifizierbar (Abbildung 3.13, A+B). Die fehlenden Expressionsunterschiede von *Lcn2* und *Emr1* deuteten auf eine unveränderte Infiltration der Immunzellen hin. Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die Oberflächenantigene Ly-6G (Gr-1) für die Detektion von PMN und F4/80 zur Untersuchung der M Φ in der Western Blot-Analyse wurde diese Beobachtung auch auf Proteinebene bestätigt (Abbildung 3.13, E+F). Zusammengenommen zeigten die Beobachtungen eine anhaltende Präsenz von PMN und M Φ , die für die diabetisch-gestörte Heilungssituation charakteristisch ist [Wetzler et al., 2000; Goren et al., 2003].

In Übereinstimmung zu den nach BAWD-Behandlung unveränderten Ergebnissen der mRNA- und Proteinexpression wurde immunhistochemisch eine unveränderte Anzahl von PMN und M Φ in Relation zur Granulationsfläche identifiziert (Abbildung 3.14, C+D). Interessanterweise zeigte die immunhistochemische Färbung der PMN- und M Φ -spezifischen Marker jedoch eine veränderte Immunzellverteilung auf (Abbildung 3.14, A+B). Es scheint so, dass die BAWD-Applikation zwar die Expression inflammatorischer Mediatoren und als Folge die Infiltration der wundheilungsrelevanten Immunzellen nicht verändert, wohl aber eine differentielle Lokalisation dieser Zellen im Wundgewebe bewirkt, in deren Folge eine verbesserte Wundheilung zu beobachten ist.

Die Ausbildung von strukturiertem Granulationsgewebe nach BAWD-Anwendung resultierte möglicherweise in einer differenzierten Verteilung der PMN (Abbildung 3.14, A). So waren PMN am offenen Wundbereich unter dem Wundschorf, sowie unterhalb der neo-epithelialen Zellen zu lokalisieren und in ihrer Ausbreitung im Wundgewebe eng begrenzt (gelbe Linie). In Laserskin-behandelten Wunden hingegen waren aufgrund der fehlenden Ausbildung ausgeprägter Granulationsstrukturen die PMN über den offenen Wundbereich diffus verteilt (Abbildung 3.14, A). Ebenso wie für die PMN-Infiltration war eine veränderte M Φ -Verteilung im BAWD-behandelten Wundgewebe zu beobachten (Abbildung 3.14, B). Der Einstrom von M Φ fand aus den Wundrandbereich in das Granulationsgewebe statt und die Lokalisierung der M Φ war nach BAWD-Behandlung deutlich von der PMN-Infiltration abzugrenzen (Abbildung 3.14, B unten,

III Ergebnisse

gelbe Linie), während in Laserskin-behandelten Wunden eine Verteilung der MΦ über den kompletten, offenen Wundbereich zu beobachten war (Abbildung 3.14, B oben).

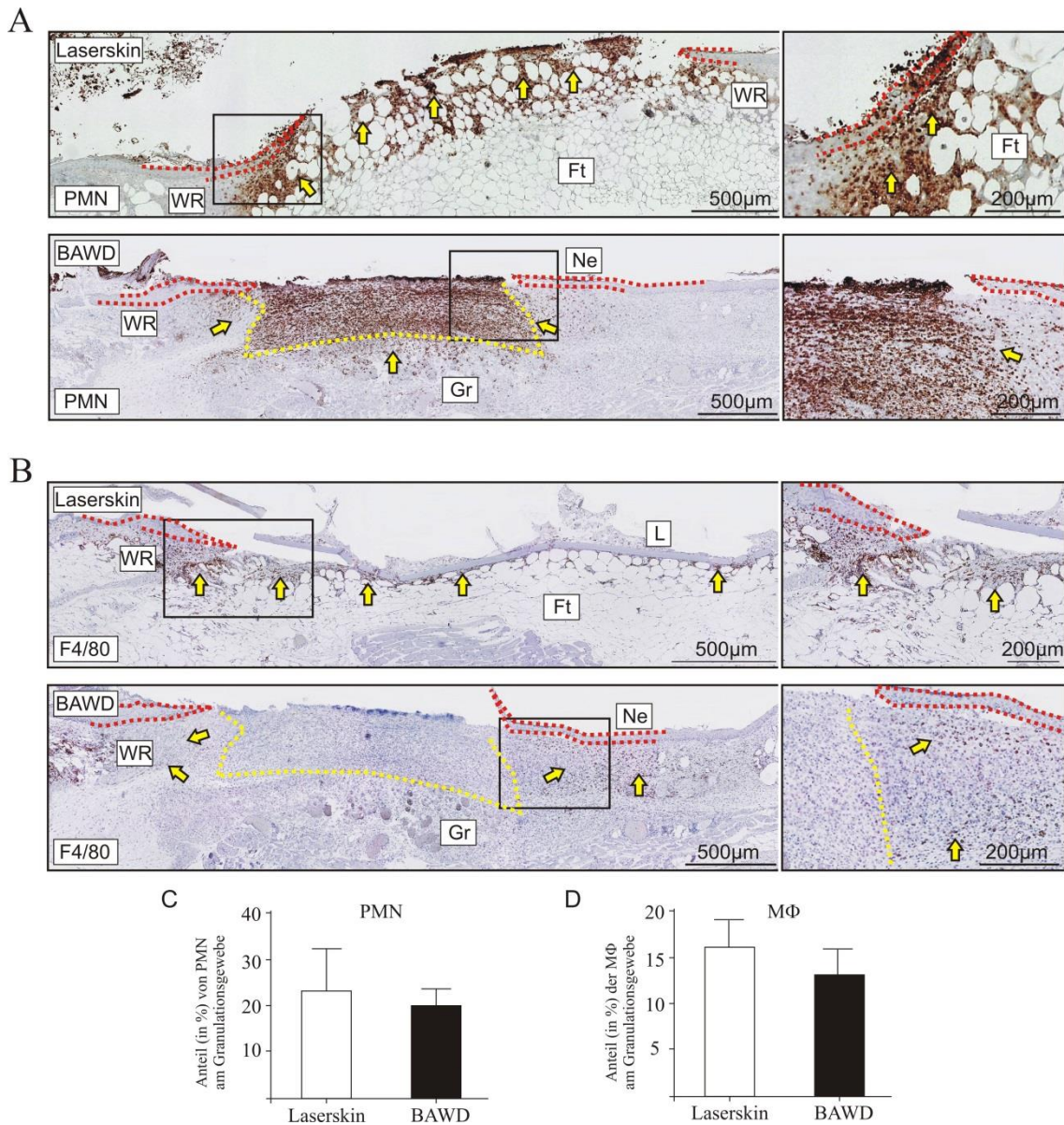


Abbildung 3.14 – Lokalisierung der PMN- und MΦ-Infiltrate

Diabetische Wunden wurden geschnitten und mit spezifischen Antikörpern gegen PMN (**A**) und F4/80 (**B**) gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Präparate von Tag 10-Wunden, in denen starke immunpositive Signale mit gelben Pfeilen markiert sind. Der in (**A**) gelb-gestrichelte PMN-Infiltrationsbereich ist in (**B**) zur besseren Illustration angezeigt. Die Ausbildung neo-epithelialer Strukturen ist rot-gestrichelt umrandet. Die vergrößerten Ausschnitte sind im Übersichtsbild gekennzeichnet. (**C+D**) Das Verhältnis aus Immunzellen/Granulationsgewebe wurde durch die Analyse PMN- bzw. F4/80-gefärbter Schnitte (n=4) mittels der Software Hybrid Cell Count BZ-H2C ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. WR: Wundrand, Ft: Fett, Gr: Granulationsgewebe, Ne: Neopithel, L: Laserskin

3.2.4 BAWD-vermittelte immunmodulatorische Effekte

Die Entzündungsphase wird im Wundheilungsprozess in ihrem Ausmaß reguliert und zeitlich terminiert [Martin, 1997; Werner und Grose, 2003]. Als Antwort auf die Aktivität von TNF- α und IL-1 wird TNFAIP6 (TNF- α -induziertes Protein 6; TSG-6) in Epithelzellen, Fibroblasten und mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*) exprimiert und ist sowohl in inflammatorischen als auch in gewebesaufbauenden Prozessen involviert [Milner und Day, 2003]. TNFAIP6 ist ein multi-funktionales Molekül mit einem komplexen und eng regulierten Expressionsprofil. TNFAIP6 ist in zahlreichen pathologischen und physiologischen Prozessen hochreguliert [Milner et al., 2006].

Die mRNA-Expressionsanalyse für TNFAIP6 in der normal-heilenden Wunde gesunder Wildtyp-Tiere zeigte eine zeitliche Übereinstimmung zu der Expression von TNF- α und IL-1 β (Abbildung 3.15, B, vgl. Abbildung 3.7), für die das Expressionsmaximum zu Beginn der inflammatorischen Phase nachweisbar war. Interessanterweise wurde immunhistochemisch eine Ko-Lokalisation der TNFAIP6-Expression mit der Präsenz von PMN identifiziert (Abbildung 3.15, D) und deutete auf eine immunregulatorische Eigenschaft des TNFAIP6-Proteins hin. Nach dem Expressionsmaximum an Tag 1 war im weiteren Wundheilungsverlauf eine im Vergleich zu unverletzter Haut erhöhte TNFAIP6-mRNA-Expression zu beobachten, die eine Beteiligung des TNFAIP6 in Prozesse der Remodellierung aufzeigt.

In der Wunde normal-heilender Tiere konnte eine zeitliche Korrelation der Expression von TNFAIP6 zu der Expression der pro-inflammatorischer Zytokine IL-1 β und TNF- α gezeigt werden. Aufgrund unveränderter Expressionsspiegel von TNF- α und IL-1 β in den diabetischen Wunden (siehe Abbildung 3.7) wurde eine unveränderte Expression von TNFAIP6 erwartet. Entgegen der Erwartung wurde interessanterweise eine BAWD-vermittelte Induktion der TNFAIP6-mRNA beobachtet (Abbildung 3.15, A), die sowohl zu Beginn der Wundheilung an Tag 3 als auch an Tag 10 im Vergleich zu Laserskin-behandelten Wunden deutlich induziert war. Die BAWD-vermittelte Induktion des TNFAIP6 deutete demnach auf eine zusätzliche Aktivierung der Expression hin, die unabhängig der Expression pro-inflammatorischer Moleküle stattfindet.

III Ergebnisse

In Übereinstimmung zu den mRNA-Daten war nach immunhistochemischer Färbung Laserskin- und BAWD-behandelter Wunden mit TNFAIP6-spezifischen Antikörpern eine deutlich verstärkte Proteinexpression nach BAWD-Behandlung festzustellen (Abbildung 3.15, C). Zwar war das TNFAIP6-Protein in den Wundrandbereichen beider Behandlungsgruppen zu lokalisieren, allerdings zeigten lediglich BAWD-behandelte Wunden eine starke Induktion des TNFAIP6 im zum Applikationsbereich angrenzenden Granulationsgewebe (Abbildung 3,15, C unten).

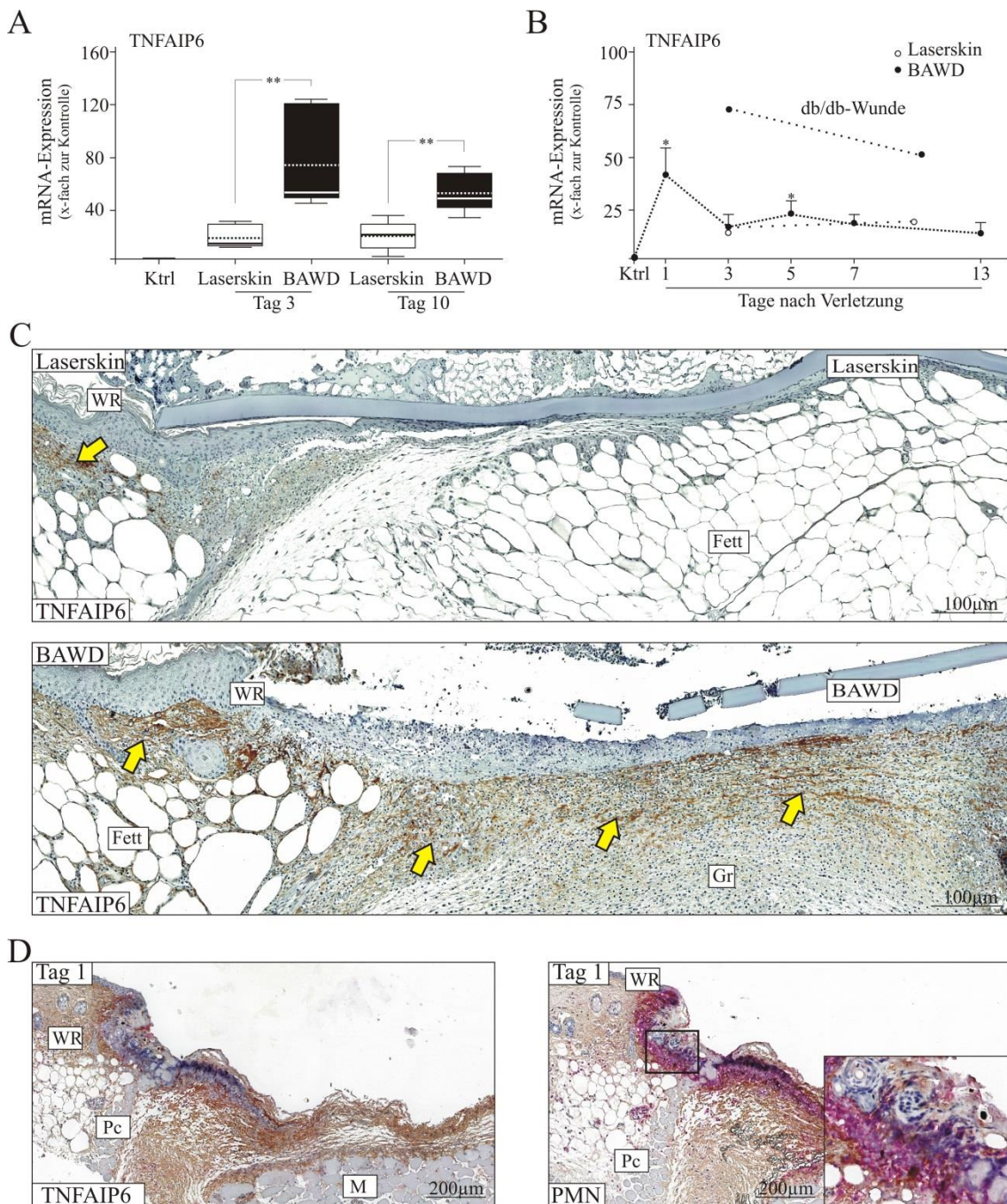


Abbildung 3.15 –Expression des TNF- α -induzierten Proteins 6 (TNFAIP6)

III Ergebnisse

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von TNFAIP6 in diabetischen db/db-Mäusen (**A**) und gesunden C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen (**B**). Wunden (n=2) diabetischer Tiere (n=7) wurden zu definierten Zeitpunkten (Tag 3 und Tag 10) isoliert (A+C). Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut und als Boxplot (Median: durchgezogene Linie; Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt. In der akuten Wundheilung ist die mRNA-Expressionskinetik im Wundheilungsverlauf gezeigt (B+D). Die entsprechenden Zeitwerte zeigen Mittelwerte \pm SEM von Wunden (n=36) aus C57BL/6-Tieren (n= 12 Tiere/ Zeitwert aus 3 unabhängigen Versuchsserien). * p<0,05; ** p<0,01 (1way-ANOVA mit Dunnett's Multiple Comparison Test). (**C+D**) Laserskin- und BAWD-behandelte Tag-10-Wunden (C) sowie Tag-1-Wunden gesunder Tiere (D) wurden mittels spezifischer Antikörper gegen TNFAIP6 gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Präparate, in denen starke immunpositive Signale mit gelben Pfeilfen markiert sind mit Einzel- (links, braun) und Ko-Färbung mit PMN (rot, rechts). M: Muskel; Gr: Granulationsgewebe, WR: Wundrand; Pc: Panniculus carnosus

3.3 BAWD induziert die Ausbildung eines funktionalen Granulationsgewebes

Die Ausbildung funktionalen Granulationsgewebes hängt maßgeblich von der Aktivität der M Φ ab [Martin, 1997; Singer und Clark, 1999; Werner und Grose, 2003]. Neben Fibroblasten, Mastzellen und Keratinozyten sezernieren die aktivierten M Φ zahlreiche Wachstumsfaktoren wie FGF-1/-2, HB-EGF, TGF- β und VEGF und führen zur Aktivierung von Fibroblasten und Endothelzellen [Frank et al., 1996; Carmeliet und Jain, 2011].

Um den Prozess der Angiogenese in diabetischen, BAWD-behandelten Wunden zu bewerten, wurden immunhistochemische Analysen gegen den endothelialen Oberflächenmarker CD31 (PECAM) durchgeführt, sowie mRNA- und Proteinspiegel von CD31, Tie-2 und VEGF ermittelt (Abbildung 3.16). Zur Quantifizierung von Endothelzellen kann die molekulare mRNA-Evaluation spezifischer endothelialer Oberflächenmarker wie CD31 (PECAM) und Tie2 (Angiopoetin-Rezeptor) herangezogen werden [DeLisser et al., 1993; Kämpfer et al., 2001].

In der immunhistochemischen CD31-Evaluation wurde eine auffällig starke, BAWD-vermittelte Ausbildung neuer Blutgefäße detektiert, wohingegen in der Behandlung mit Laserskin keine derartig ausgeprägte Blutgefäßbildung im diabetischen Wundgewebe lokalisiert werden konnte (Abbildung 3.16, A).

Dem Unterschied in der Ausbildung strukturierter Gefäße (Abbildung 3.16, B) stand eine geringfügig veränderte mRNA- und Proteinexpression von CD31, Tie2 und VEGF gegenüber (Abbildung 3.16, C-F). Die gleichen Expressionsspiegel der endothelialen Oberflächenmarker sprechen für eine gleiche Anzahl potentiell angiogener Zellen im

III Ergebnisse

Granulationsgewebe. Dies deutet darauf hin, dass die Bereitstellung von Keratinozyten maßgeblich die Ausbildung und Organisation von Blutgefäßen reguliert und stimuliert (Abbildung 3.16, E+F).

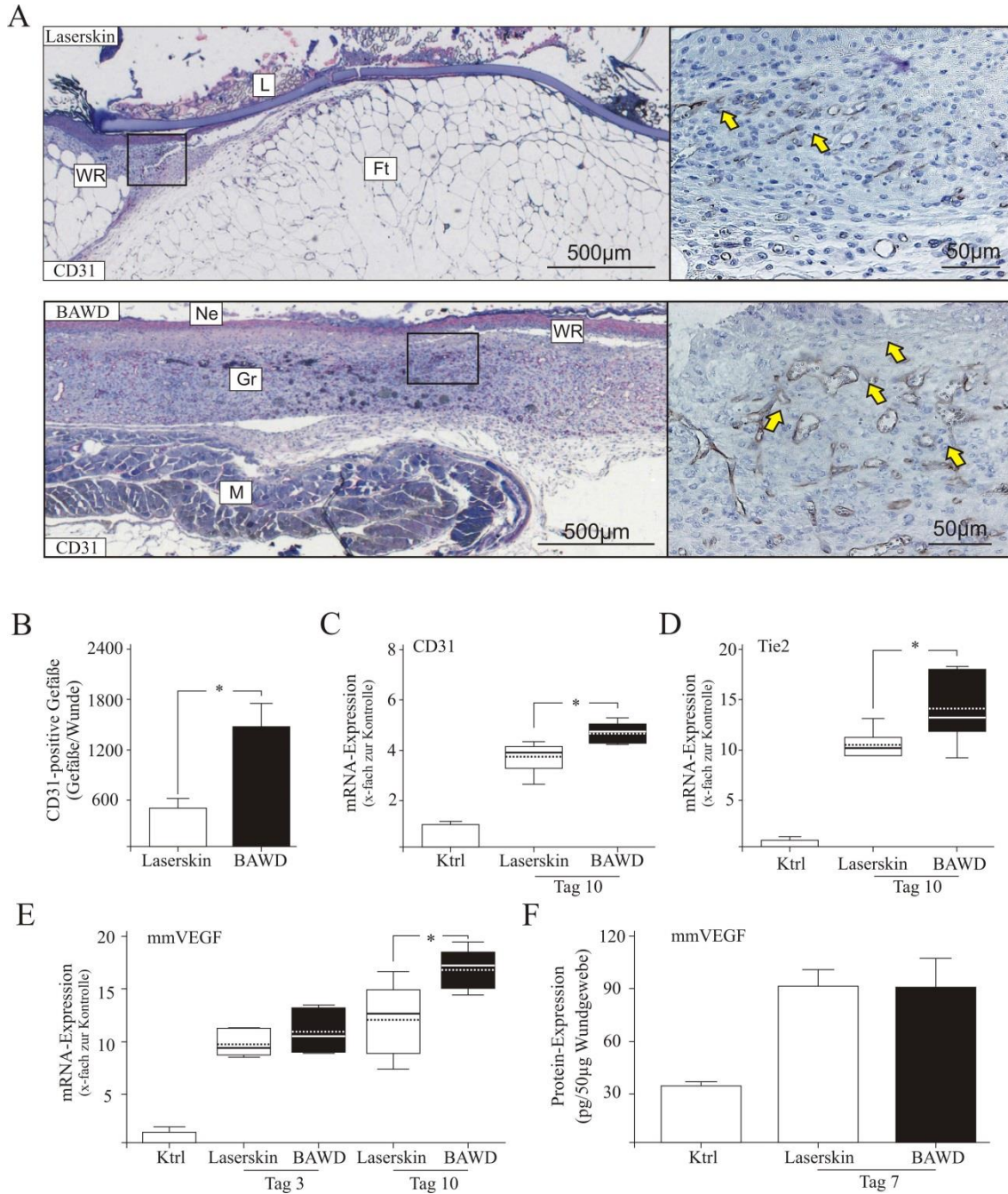


Abbildung 3.16 – BAWD-vermittelte Induktion funktionalen Granulationsgewebes

Diabetische Wunden wurden geschnitten und mit spezifischen Antikörpern gegen den endothelialen Oberflächenmarker CD31 (PECAM) (A) gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Präparate von Tag-10-Wunden, in denen starke immunpositive Signale mit gelben Pfeilen markiert sind. Die vergrößerten Ausschnitte sind im Übersichtsbild gekennzeichnet. (B) Die Auszählung der Blutgefäßdichte (CD31-positive Gefäße) pro Wunde (n=5) wurde mittels der Software Hybrid Cell Count BZ-H2C ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Analyse \pm SEM; * $p < 0,05$ (unpaired Students-t-Test). qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression der endothelialen Oberflächenmarker CD31 (C), Tie2 (D) und murinem VEGF (E). Wunden (n=2) diabetischer Tiere (n=7) wurden zu definierten Zeitpunkten (Tag 3 und Tag

10) isoliert. Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut und als Boxplot (Median: durchgezogene Linie, Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (unpaired Students-t-Test). (F) Der Wundproteingehalt an mmVEGF wurde über einen ELISA bestimmt. Dazu wurde 50 μg Gesamtwundlysate aus Wunden ($n=3$) aus individuellen Tieren ($n=3$) eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. L: Laserskin; WR: Wundrand; Ft: Fettgewebe; Ne: Neoepithel; Gr: Granulationsgewebe; M: Muskelgewebe

3.4 BAWD-vermittelte muskelspezifische Genexpression

3.4.1 Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Mit dem Ziel der Identifizierung von Genen und Proteinen, die aufgrund einer BAWD-Behandlung induziert wurden, wurde eine Whole-Genom-Genexpressionsanalyse durchgeführt. Diese Expressionsanalyse war wichtig, weil das BAWD trotz hyperglykämischer und pro-inflammatorischer Bedingungen den Wundgewebeaufbau einleiten und fördern konnte. Für die Genexpressionsanalyse wurden Laserskin- und BAWD-behandelte Wunden ($n=2$) aus diabetischen Tieren ($n=7$) für die Illumina-Dye-Sequenzierung vorbereitet (siehe 2.2.9).

Die Behandlung mit BAWD resultierte in einer differentiellen Expression von 297 Genen mit einer mindestens 2x-fachen Induktion im Vergleich zur Kontrollbehandlung nach einer Behandlungsdauer von 10 Tagen (Abbildung 3.17). Eine detailliertere Auflistung ist in Anhang 7.4 in Tabelle 7.3 aufgeführt. Im Vergleich zur Kontrollbehandlung war dabei die Expression von 71 Genen herunter- und von 226 Genen hochreguliert (Abbildung 3.17, A). Ein Gen-Datenbank-Alignment (DAVID-Datenbank) zeigte eine Unterteilung in Fett- (Anzahl: 15) und Muskel-assoziierte (Anzahl: 118) Genfunktionen (Abbildung 3.17, B). Dabei war eine differentielle Regulation innerhalb dieser Gengruppen zu beobachten, in der Fett-spezifische Gene herabgesetzt und Muskel-assoziierte Gene hochreguliert waren (Abbildung 3.17, C). So war die Genexpression von Perlipin-1 (Plin1), das in Adipozyten bei der Einlagerung von Lipiden eine wesentliche Rolle einnimmt, aufgrund der BAWD-Behandlung herabgesetzt (-2,18 x-fache Reduktion). Interessanterweise war eine Vielzahl an Muskel-assoziierten Genen hochreguliert, die funktionell in Skelettmuskel und Herzmuskelentwicklung und Muskeldifferenzierung beschrieben sind (Abbildung 3.17, C). Diese Befunde sind äußerst interessant, zumal in kutaner Wundheilung eine Beteiligung muskulärer Gene und Proteine bislang unbekannt ist.

III Ergebnisse

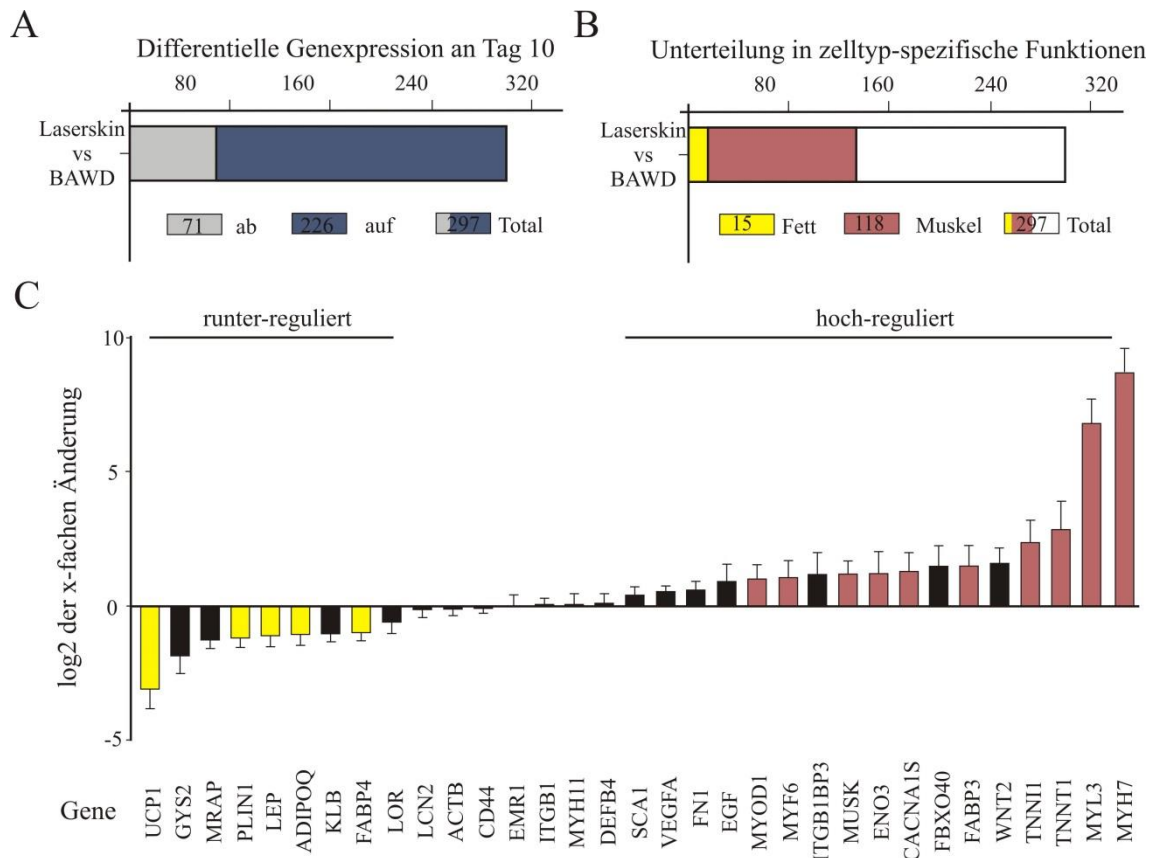


Abbildung 3.17 – Identifizierung differentiell exprimierter Gene nach BAWD-Behandlung

Die Sequenzierung wurde mittels dem Genome Analyzer Iix durchgeführt und hatte eine Sequenzierungstiefe von 9 bis 13 Millionen Auswertungen pro Probe (*reads per sample*). Die Daten wurden mit der Genomatix Mining Station und der Ensembl-Datenbank (*artificial splice junctions*) ausgewertet und mit dem Biocondutor DESeq-Programm prozessiert. (A+B) Die Unterteilung in hoch- oder herunterregulierte Gene bzw. in Muskel- und Fett-spezifische Gene wurde durch die Auswertung der Daten aus der Expressionsanalyse mittels der DAVID-Datenbank ermittelt. (C) Die Expression muskulärer Gene (rot) war nach BAWD-Behandlung induziert, wohingegen Fett-spezifische Gene (gelb) herunterreguliert waren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der log₂-Werte der x-fachen Änderung.

Des Weiteren zeigte das BAWD nach Auswertung der Genexpressionsanalyse eine erhöhte Induktion von Genen, deren Funktion mit der phänotypischen Aktivitätsänderung von inflammatorischen M Φ (M1) hin zu regenerativen M Φ (M2-ähnlich) im Wundgewebe eng assoziiert ist. In Tabelle 3.2 sind BAWD-induzierte Gene aufgeführt, die auf eine M2-ähnliche Polarisierung der M Φ hindeuten [Murray et al., 2014].

Tabelle 3.2: Induktion von Markergenen polarisierter MΦ (M2-ähnlich) nach BAWD

Gen	x-fache Änderung im Vergleich zu Kontrollbehandlung	Referenz
ALOX15 (Arachidonate 15-lipoxygenase)	+ 2,34	Wuest et al., 2012
MGL2 (Macrophage galactose N-acetyl- galactosamine specific lectin 2)	+2,13	Raes et al. 2005
Arg1 (Arginase 1, liver)	+1,60	Raes et al. 2005
Chi3l3 (Chitinase 3-like 3)	+1,77	Raes et al. 2005
Mrc1 (CD206, Mannose-Rezeptor 1)	+1,34	Stein et al. 1992
CD163 (Scavenger-Rezeptor)	+1,65	Buechler et al., 2000
IL-4Rα (IL4-Rezeptor alpha)	+1,25	Lawrence und Natoli, 2011
PTX3 (Pentraxin-3)	+2,56	Sun et al., 2015
IRF4 (Interferon regulatory factor 4)	+1,32	Satoh et al., 2010

In Relation zu dem BAWD-vermittelten Aufbau von Granulationsgewebe, scheint die Exposition von Keratinozyten auf die gestörte diabetische Wundheilung einen positiven Effekt hervorzurufen, der in einer Induktion immunmodulatorischer Faktoren (siehe Abbildung 3.15), einer möglichen Polarisierung gewebsregenerativer MΦ (Tabelle 3.2), sowie einer deutlichen Expression muskelspezifischer Gene resultiert. Im Nachfolgenden sollte die bislang in der kutanen Wundheilung unbekannte Expression muskelspezifischer Faktoren weiter untersucht werden.

3.4.2 Expression Fett- und Muskel-spezifischer Gene

FABPs (*fatty acid binding protein*) gehören zur Familie der Lipid-bindenden Proteine (LBP) und bestehen aus 9 verschiedenen Mitgliedern, die Gewebe-spezifisch exprimiert werden [Chmurzynska et al., 2006]. Die Expression von FABP3 ist auf Herz- und Muskelgewebe begrenzt, während FABP4 spezifisch in Adipozyten vorzufinden ist. Daher eignen sich diese Gene als molekulare Marker zur Bestimmung der Differenzierungs- ausrichtung von Fett- und Muskelgewebe und wurden in dieser Arbeit über eine mRNA-Analyse bestimmt.

In Übereinstimmung mit dem adipösen Phänotyp der *db/db*-Mäuse war das FABP4 deutlich exprimiert (Abbildung 3.18, B). Die Behandlung mit BAWD vermittelte eine signifikante Reduktion der FABP4-Expression in der Wundregion. Gegensätzlich zu der Fett-spezifischen FABP4-Expression war die Muskel-spezifische FABP3-mRNA im Vergleich zu Kontrollhaut und Laserskin-behandelten Wunden in Folge von BAWD deutlich erhöht (Abbildung 3.18, A). Das BAWD veränderte offensichtlich die Balance zwischen FABP3- und FABP4-exprimierenden Zellen. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse der histologischen Befunde, in denen auf eine Reduktion des Fettgewebes hingewiesen worden ist (siehe Abbildung 3.5).

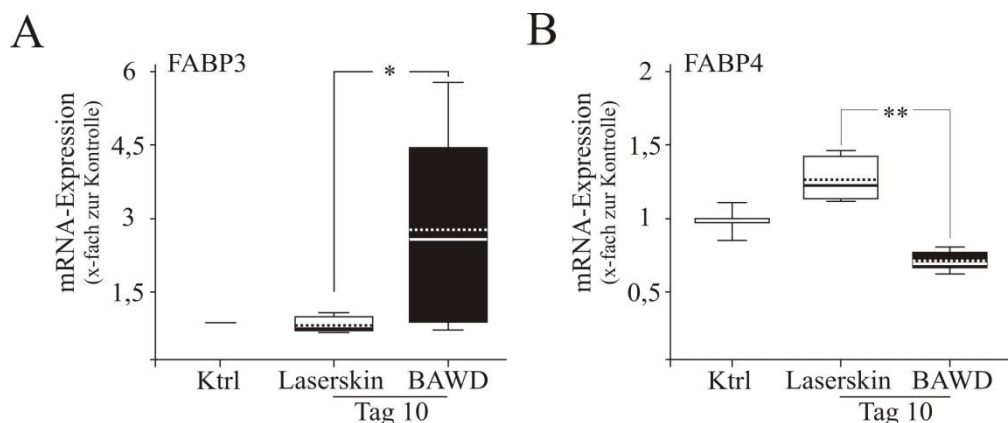


Abbildung 3.18 – Behandlungsabhängige Verschiebung muskulärer und adipöser Entwicklung

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression der Fettsäure-bindenden Proteine FABP3 und FABP4 in der Wundheilung diabetischer *db/db*-Tiere. Wunden (n=2) diabetischer Tiere (n=7) wurden zu einem definierten Zeitpunkt (Tag 10) isoliert. Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut dargestellt. Die entsprechenden Zeitwerte sind als Boxplot (Median: durchgezogene Linie, Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt, * p<0,05; ** p<0,01 (unpaired Student's t-Test).

3.4.3 Detektion von muskelspezifischen Proteinen in der Wundheilung

3.4.3.1 BAWD-vermittelte Induktion in der Wunde diabetischer Tiere

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten bisher die heilungsfördernde Eigenschaft des BAWD auf. Dabei war neben der robusten Induktion funktionalen Granulationsgewebes eine signifikante Reduktion des subkutanen Fettgewebes und damit Fett-spezifischer Marker zu beobachten. Die Vielzahl Muskel-assoziiierter Gene, die nach der BAWD-Behandlung exprimiert waren, wurde mit der signifikant induzierten FABP3-Expression in Verbindung gebracht, so dass im Nachfolgenden die Expression und Lokalisation muskulärer Strukturen im Wundgewebe diabetischer Tiere nachgegangen werden sollte. In diesem Zusammenhang wurde die Expression wichtiger Muskel-spezifischer Transkriptionsfaktoren (MyoD1; *myogenic differentiation 1*, MRF4; *myogenic regulatory factor 4*), Muskel-Struktur-Genen des Troponin (Tnn)-Komplexes (TnnT, TnnC, TnnI) und fibrillärer Strukturproteine (Myh7; *Myosin heavy chain 7*) über eine qPCR-Analyse evaluiert.

In der Wundheilung BAWD- und Laserskin-behandelter diabetischer Tiere war nach der qPCR-Analyse eine Induktion Muskel-spezifischer Transkriptionsfaktoren festzustellen (Abbildung 3.19, A). Die Transkriptionsfaktoren MyoD1 und MRF4 nehmen in der Entwicklung von Muskelgewebe eine entscheidende Rolle ein. Dabei ist MyoD1 einer der ersten Marker muskulärer Differenzierung und wird u.a. als Antwort auf Muskelverletzung aktiviert [Tapscott et al., 1988; Weintraub et al., 1989]. Die Aktivität von MyoD1 wird durch den Muskel-spezifischen, regulatorischen Faktor MRF4 (Myf6, Herculín) reguliert [Rhodes und Konieczny, 1989]. Interessanterweise war eine BAWD-vermittelte, verstärkte Induktion von MyoD1 und MRF4 in der frühen Heilungsphase diabetischer Wunden (Tag 3) zu beobachten, während im späteren Heilungsverlauf (Tag 10) keine Veränderung im mRNA-Expressionsniveau beobachtet werden konnte (Abbildung 3.19, A). Diese Beobachtungen deuten auf eine potentielle, BAWD-induzierte Initiation von komplexen Muskel-spezifischen Entwicklungsprozessen hin, die in der Ausbildung muskelähnlicher Strukturen enden.

Die Ausbildung von muskelähnlicher, kontraktile Strukturen wurde durch die verstärkte Expression von Genen aus dem Troponin-Proteinkomplex (Tnnt, Tnnc und Tnni) bestätigt (Abbildung 3.19, B). Die Troponine bilden gemeinsam mit Myosin- und Aktin-Filamenten den kontraktile Teil der Muskulatur. Während Kontroll-behandelte

III Ergebnisse

Wunden eine vergleichsweise schwache mRNA-Induktion aufzeigen konnten, war eine deutliche BAWD-induzierte mRNA-Expression festzustellen (Abbildung 3.19, B).

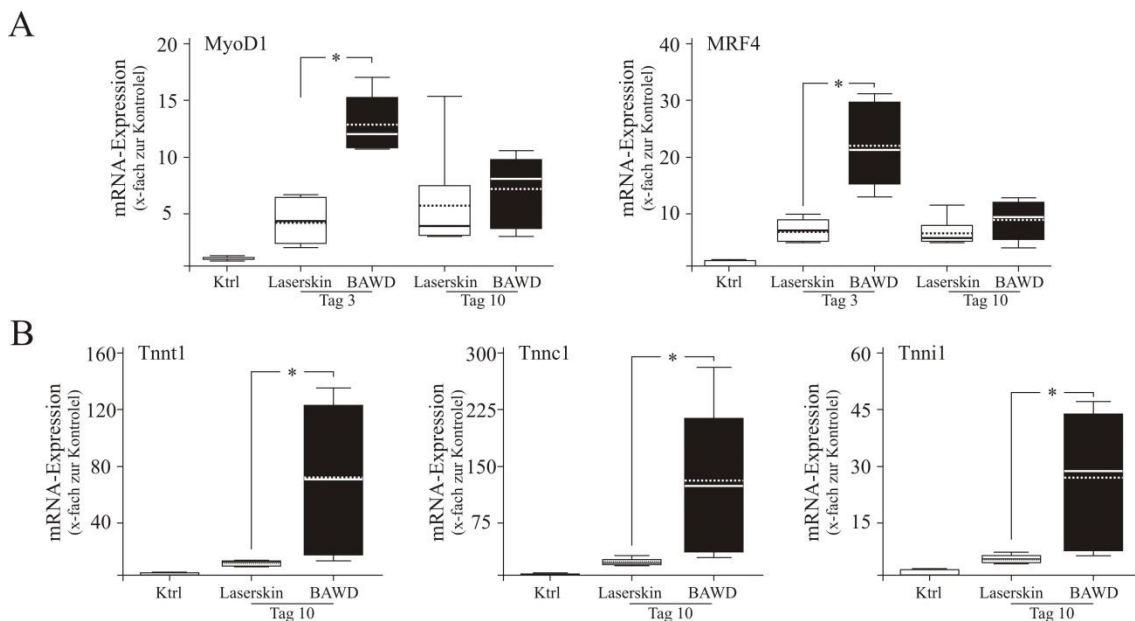


Abbildung 3.19 – Expression von muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren und Struktur-Komplexen nach BAWD-Behandlung

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression muskelspezifischer Transkriptionsfaktoren MyoD1 und MRF4 (A) und Muskel-Struktur-Genen des Troponin-Komplexes (B) in diabetischer Wundheilung. Wunden (n=2) diabetischer Tiere (n=7) wurden zu dem Zeitpunkt (Tag 10) isoliert. Der Zeitwert repräsentiert die Quantifizierung der Transkripte und ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut dargestellt. Die entsprechenden Zeitwerte sind als Boxplots (Median: durchgezogene Linie, Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt, * p<0,05 (unpaired Students-t-Test).

Ergänzend zu der BAWD-induzierten Expression des Troponin-Komplexes war eine ausgeprägte Induktion von Proteinen des kontraktiven Apparates der quergestreiften Muskulatur zu beobachten (Anhang 1.2). Die über die Whole-Genom-Genexpressionsanalyse ermittelte, stärkste mRNA-Induktion wurde für das Myh7-Protein beobachtet und wurde über eine qPCR-Analyse bestätigt (Abbildung 3.17, C; Abbildung 3.20, B+C). Über die immunhistochemische Färbung wurde das Myh7-Protein in Bereichen des BAWD-induzierten Granulationsgewebes und im *panniculus carnosus* lokalisiert (Abbildung 3.20, A rechts), während in Kontroll-behandelte Wunden kein Myh7-Protein detektiert wurde (Abbildung 3.20, A links). Unter Verwendung Myh7-spezifischer Antikörper wurde eine BAWD-induzierte Proteinexpression des Myh7 mittels Western Blot-Analysen verifiziert (Abbildung 3.20, C)

III Ergebnisse

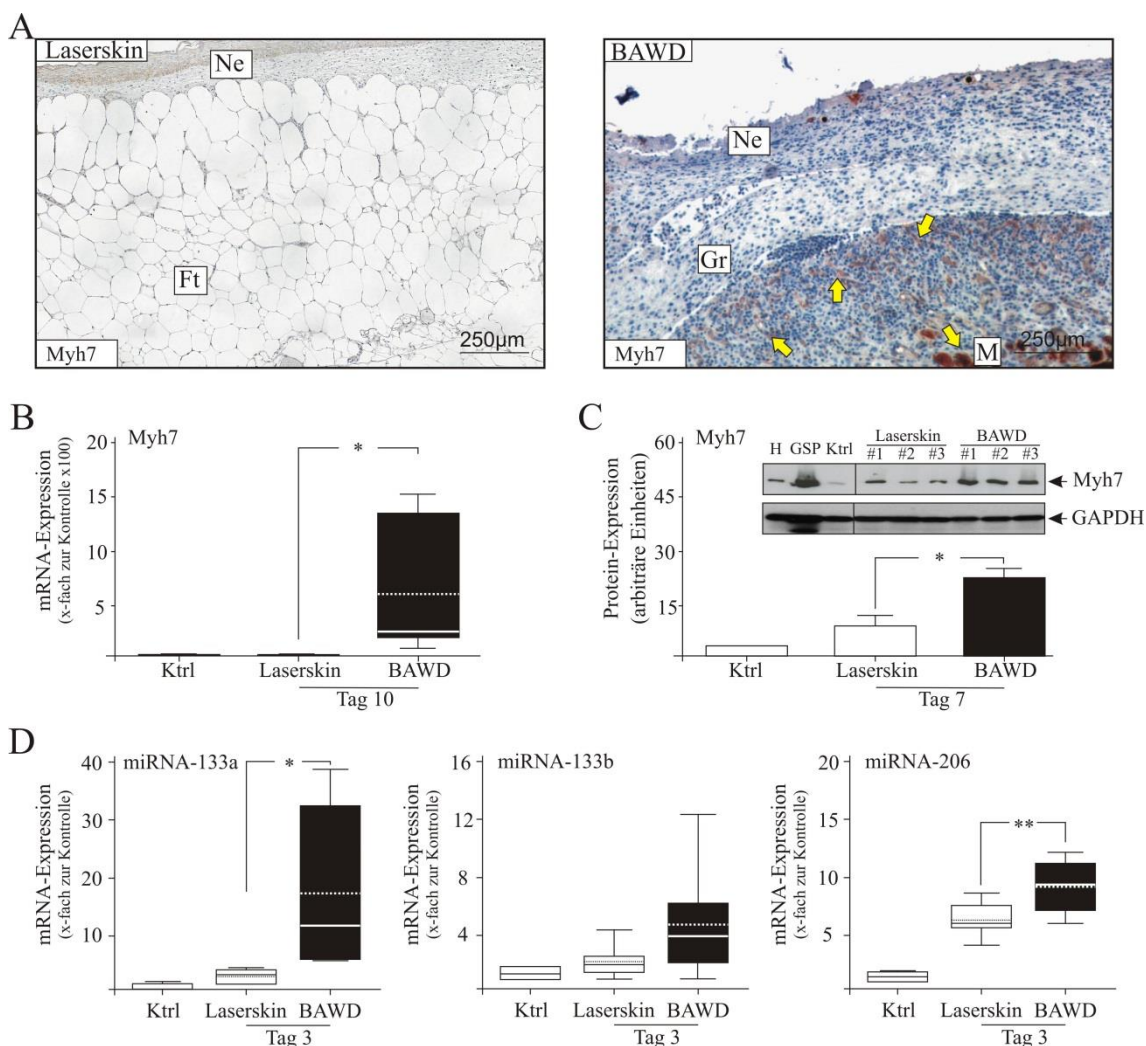


Abbildung 3.20 – BAWD-vermittelte Expression von Myh7 und regulatorischer muskelspezifischer miRNA

Wunden diabetischer Tiere wurden geschnitten und mit spezifischen Antikörpern gegen das fibrilläre Muskelprotein Myh7 (A) immunhistochemisch gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Präparate von Tag-10-Wunden, in denen starke immunpositive Signale mit gelben Pfeilen markiert sind. Zur Bestimmung der Myh7-Proteinexpression (C) wurde 50µg Gesamtproteinlysate aus Tag-7-Wunden (n=3) diabetischer BAWD-behandelter und Kontroll-behandelter Tiere (n= 3) eingesetzt. Die dargestellten Banden (L1-L3; B1-B3) repräsentieren die individuelle Expression einzelner Versuchstiere. Die Werte wurden quantifiziert und auf die Expression von GAPDH normiert und gemittelt (Mittelwerte ± SEM). Als Positivkontrolle wurden Proteinlysate aus Herz (H), Skelettmuskelgewebe (GSP, Gastrocnemius posterior) und Kontrollhaut aufgetragen. qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression des Myh7 (B) und der regulatorischen muskelspezifischen miRNA (D) in diabetischer Wundheilung. Wunden (n=2) diabetischer Tiere (n=7) wurden zu einem definierten Zeitpunkt (Tag 10) isoliert. Die Zeitwerte repräsentieren die Quantifizierung der Transkripte und sind als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut dargestellt. Die entsprechenden Zeitwerte sind als Boxplots (Median: durchgezogene Linie, Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt, * p<0,05; ** p<0,01 (unpaired Students-t-Test).

Im Kontext der Expression muskelspezifischer Transkriptionsfaktoren und Strukturproteinen wurde die Induktion von muskelspezifischer microRNA (miR; sog. myomiR) untersucht. miR sind kurze, hoch konservierte, nichtcodierende RNAs, die im Kontext der Genregulation auf post-transkriptioneller Ebene wirken [He und Hannon, 2004]. In

Korrelation zu den Expressionsanalysen muskelspezifischer Transkriptionsfaktoren (Abbildung 3.19, A) konnte im Zuge einer BAWD-Behandlung eine verstärkte Expression von miR-133a, miR-133b und miR-206 an Tag 3 nach Verwundung detektiert werden (Abbildung 3.20, D). Die Beobachtung um die Initiation muskulärer Differenzierung wird durch die Expression dieser hochspezifisch-regulierenden Faktoren bekräftigt.

3.4.3.2 Expression muskelspezifischer Faktoren während der akuten Wundheilung

Die Expression Muskel-spezifischer Transkriptionsfaktoren und Strukturproteine in der kutanen Wundheilung wurde bislang nicht beschrieben. Die bisherigen Daten dieser Arbeit lassen vermuten, dass über eine BAWD-Applikation in der diabetisch-gestörten Wundheilung ein muskulärer Differenzierungsprozess initiiert wird. Um die Beobachtung einer BAWD-induzierten Expression muskulärer Gene und Proteine zu verifizieren, sollten die bisherigen Erkenntnisse dieser Arbeit auf den normalen Wundheilungsprozess übertragen werden. Es war wichtig zu klären, ob die BAWD-Anwendung in diabetisch-gestörter Wundheilung einen Prozess initiiert, der in der akuten Wundheilung physiologische Bedeutung hat. Im Nachfolgenden wurden Wundheilungsstudien an gesunden C57Bl/6-Mäusen durchgeführt, um die physiologische Relevanz muskelspezifischer Genexpression im akuten, normal heilenden Wundheilungsmodell zu bewerten.

Interessanterweise war die mRNA-Expression muskelspezifischer Transkriptionsfaktoren und Troponin-Gene in Wunden normalheilender Tiere induziert (Abbildung 3.21). Ähnlich wie in der BAWD-induzierten diabetischen Wundheilung, war die Expression von MyoD1 und MRF4 in der Initialphase der normalen Heilung gesunder Tiere stark erhöht (Abbildung 3.21, A). Dies deutet auf die Initiation muskulärer Differenzierung hin. Im weiteren Heilungsverlauf war eine Reduktion der mRNA-Expression zu beobachten, die dennoch im Vergleich zur unverletzten Kontrollhaut erhöht war und auf eine Beteiligung dieser Faktoren in den späteren Heilungsphasen darlegt.

Die höchste Expression der Troponin-Gene korrelierte temporär mit dem Aufbau von Granulationsgewebe (Tag 3 – Tag 7) und war zum Ende der Granulationsphase im Übergang zur Remodellierungsphase (ab Tag 7) im Vergleich zur maximalen Expression an Tag 5 abnehmend (Abbildung 3.21, B).

III Ergebnisse

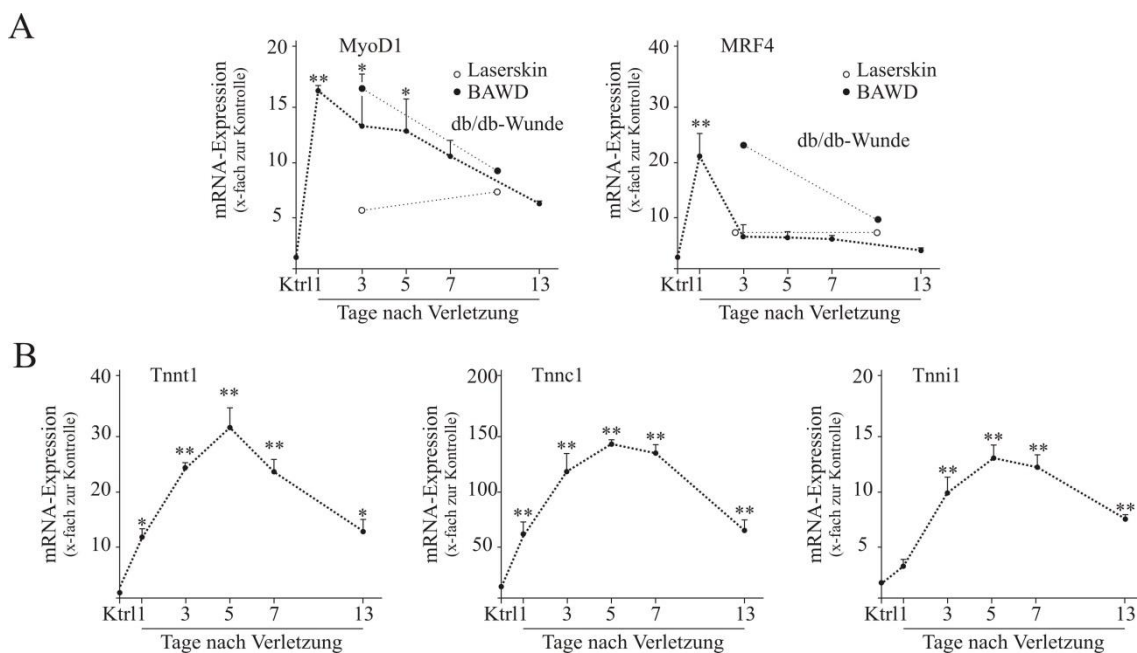


Abbildung 3.21 – Expression von muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren und Struktur-Komplexen in normaler Wundheilung

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von der muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren (A) und Muskel-Struktur-Genen (B) des Troponin-Komplexes in Wunden gesunder Wildtyp-Tiere. In der akuten Wundheilung ist die mRNA-Expressionskinetik im Wundheilungsverlauf gezeigt. Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut dargestellt. Die entsprechenden Zeitwerte zeigen Mittelwerte \pm SEM von Wunden (n=36) aus C57BL/6-Tieren (n= 12 Tiere/Zeitwert aus 3 unabhängigen Versuchsserien). In (A) ist die Expressionskinetik diabetischer Wunden übersichtshalber eingefügt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (1way-ANOVA mit Dunnett's Multiple Comparison Test)

Die Ausbildung muskulärer Strukturen wurde über die immunhistochemische Färbung Myh7-spezifischer Antigene in der akuten Wunden 5 Tage nach Verletzung insofern eindrucksvoll bestätigt, als dass eine starke Präsenz Myh7-positiver Zellen mit starker Akkumulation in der Wundregion zwischen den Wundrandkeratinozyten des hyperproliferativen Epithels sowie den muskulären Ausläufern des *panniculus carnosus* detektiert wurde (Abbildung 3.22, A). Des Weiteren verdeutlichte die Ko-Expression von α SMA in dieser Wundregion die Ausbildung einer kontraktile Zone (Abbildung 3.22, B) und war deutlich von der Infiltration von Neutrophilen (PMN-Färbung) und M Φ (F4/80-Färbung) abzugrenzen (Abbildung 3.22, B). Die mRNA- und Proteinexpression zeigte eine transiente Induktion mit maximaler Expression an Tag 5 und konnte in Verbindung zu der Expression der Troponin-Gene (Abbildung 3.21, B) und der für diese Wundheilungsphase charakteristischen Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten gesetzt werden (Abbildung 3.22, C+D).

III Ergebnisse

Die Analyse der Induktion muskulärer Strukturen wurde durch Untersuchungen der miRNA-Expression von miR-133a, miR-133b und miR-206 ergänzt. Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang eine Korrelation in der Expression regulatorischer miRNA und der Expression von muskulären Strukturproteinen beobachtet werden (Abbildung 3.22, E). Wie auch in der BAWD-vermittelten Induktion muskulärer Gene, deutete die temporär-unterschiedliche Transkription der regulatorischen mRNA in der akuten Wundheilung auf einen eng-regulierten, muskulären Entwicklungsprozess hin.

III Ergebnisse

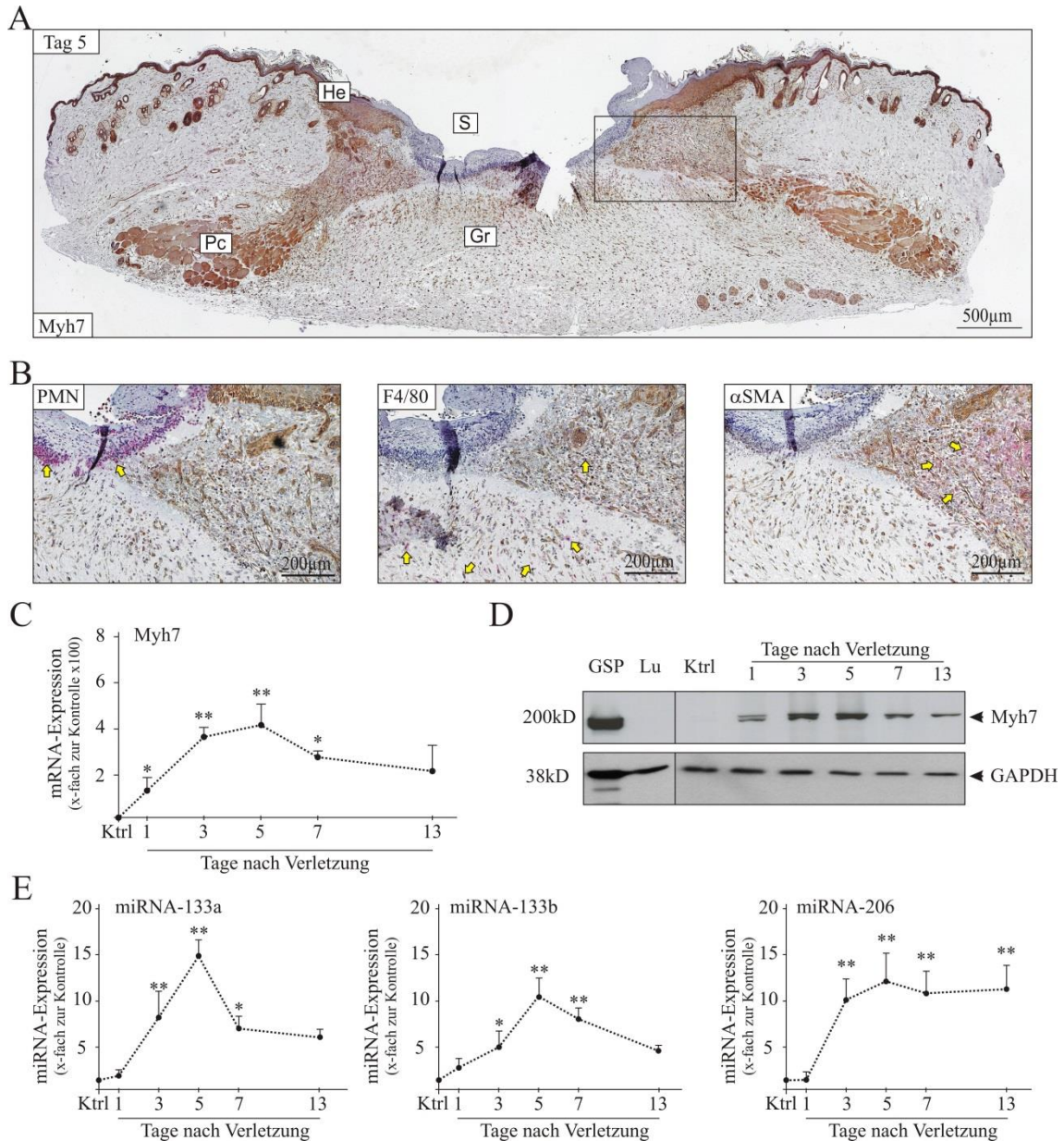


Abbildung 3.22 – Expression von Myh7 und regulatorischer muskelspezifischer miRNA in normaler Wundheilung

Unter Verwendung spezifischer Antikörper wurden 5-Tage-Wunden akut-heilender Tiere immunhistochemisch gefärbt, um (A) die Expression von Myh7 (braune Färbung) und (B) die Ko-Expression von PMN, F4/80 und α SMA (rötliche Färbung) zu lokalisieren. Starke immunpositive Signale sind mit gelben Pfeilen gekennzeichnet. Die Ko-Expression (B) ist im Übersichtsbild (A) durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet. Zur Bestimmung der Myh7-Proteinexpression (D) wurde 50 μ g Gesamteinlysate aus Wunden (n=2/ Zeitwert) von C57Bl/6-Tieren eingesetzt. Als Positiv- und Negativkontrolle wurden Proteinlysate aus Skelettmuskelgewebe (GSP, Gastrocnemius posterior) und Lungengewebe (Lu) aufgetragen. Die GAPDH-Expression diente der Ladungskontrolle. qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von Myh7 (C) und der regulatorischen muskelspezifischen miRNA (E) in Wunden gesunder Wildtyp-Tiere. Dabei ist die mRNA-Expressionskinetik im Wundheilungsverlauf gezeigt. Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut dargestellt. Die entsprechenden Zeitwerte zeigen Mittelwerte \pm SEM von Wunden (n=36) aus C57Bl/6-Tieren (n= 12 Tiere/Zeitwert aus 3 unabhängigen Versuchsserien). * p<0,05; ** p<0,01 (1way-ANOVA mit Dunnett's Multiple Comparison Test)

3.5 BAWD-vermittelte Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen

Die therapeutische Anwendung mesenchymaler Stammzellen (MSC) ist in der Lage, die Wundheilung auch in der diabetisch-gestörten Wundsituation zu verbessern [Falanga et al., 2007; Kwon et al., 2008]. MSCs zeichnen sich durch ihre Fähigkeit der Selbst-Erneuerung aus, werden in das verletzte Wundareal rekrutiert und differenzieren in unterschiedliche Zelltypen terminal aus (Abbildung 3.23) [Sasaki et al., 2008]. Die Charakterisierung und Identifizierung von MSCs auf molekulare Ebene erfolgt über Oberflächenmarker wie Sca1, Integrin-beta 1 (Itgb1, CD29) und dem Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 [Baddoo et al., 2003].

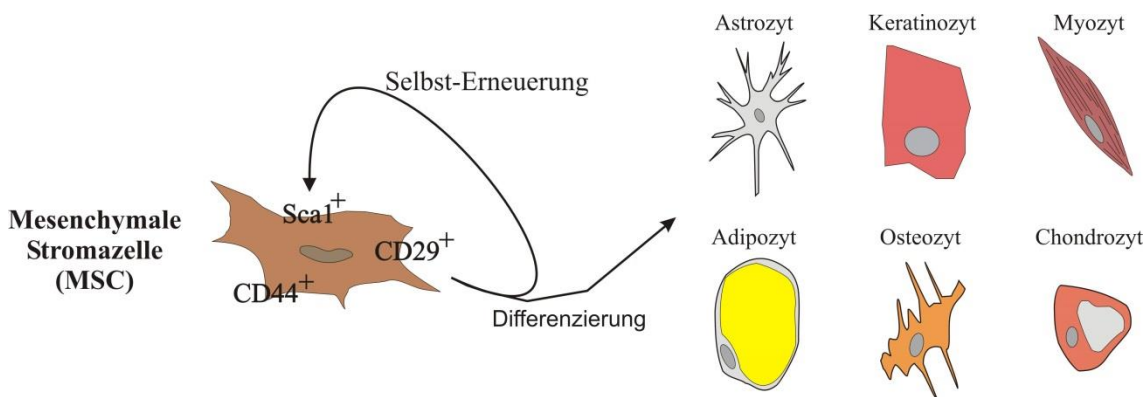


Abbildung 3.23 – Schematische Darstellung des Differenzierungspotentials mesenchymaler Stammzellen

3.5.1 BAWD-vermittelte Akkumulation von Sca1-positiven Zellen

In der muskulären Regeneration nach Verletzung sind Stammzellen ein wesentlicher Bestandteil [Hawke und Garry, 2001]. Muskelstammzellen werden u.a. als Satellitenzellen bezeichnet und sind in der Basallamina von Muskelfasern lokalisiert. Als Antwort auf Wachstumsfaktoren u.a. nach Verletzung werden diese Zellen aktiviert und differenzieren durch die Aktivität von MyoD1 zu Myoblasten [Tapscott et al., 1988; Weintraub et al., 1989]. Die Population muskulärer Stammzellen ist heterogen und beinhaltet zusätzlich MSCs [Holmes und Stanford, 2007]. Um einen Gewebe-regenerativen Mechanismus durch die potentielle Rekrutierung von Stammzellen als möglichen Faktor der BAWD-vermittelten verbesserten Wundheilung zu analysieren, wurde die Präsenz von Stammzellen mittels der immunhistochemischen Färbung des Stammzellmarkers Sca1 (*stem cell antigen 1*/ Ly6A/E) ausgeführt [van de Rijn et al., 1989].

III Ergebnisse

Die BAWD-Behandlung induzierte eine Akkumulation von Sca1-positiven Zellen (Abbildung 3.24, A unten). Der Einstrom Sca1-positiver Zellen fand aus den Wundrändern statt und die Sca1-Expression war an Tag 10 nach Verwundung in dem neu gebildeten Granulationsgewebe lokalisiert. Interessanterweise war die stärkste Sca1-Expression unmittelbar über dem Muskelgewebe festzustellen (Abbildung 3.24, A unten, gelbe Pfeile). In Laserskin-behandelten Wunden wurde hingegen keine Ansammlung Sca1-positiver Zellen festgestellt (Abbildung 3.25, oben).

qRT-PCR-Analysen zur Analyse der Expression MSC-assoziiierter Oberflächenmarker bestätigten die Erkenntnisse aus den immunhistologischen Beobachtungen (Abbildung 3.24, B). Die Expression von Sca1, CD29 und CD44 war in der diabetischen Wundheilung induziert. Interessanterweise zeigte die Behandlung mit BAWD eine verstärkte mRNA-Expression der Oberflächenmarker von MSCs und bekräftigt die Vermutung, dass die Ausbildung von Granulationsgewebe trotz der hyperglykämischen und pro-inflammatorischen Wundsituation durch andere BAWD-vermittelte Faktoren stattfindet.

III Ergebnisse

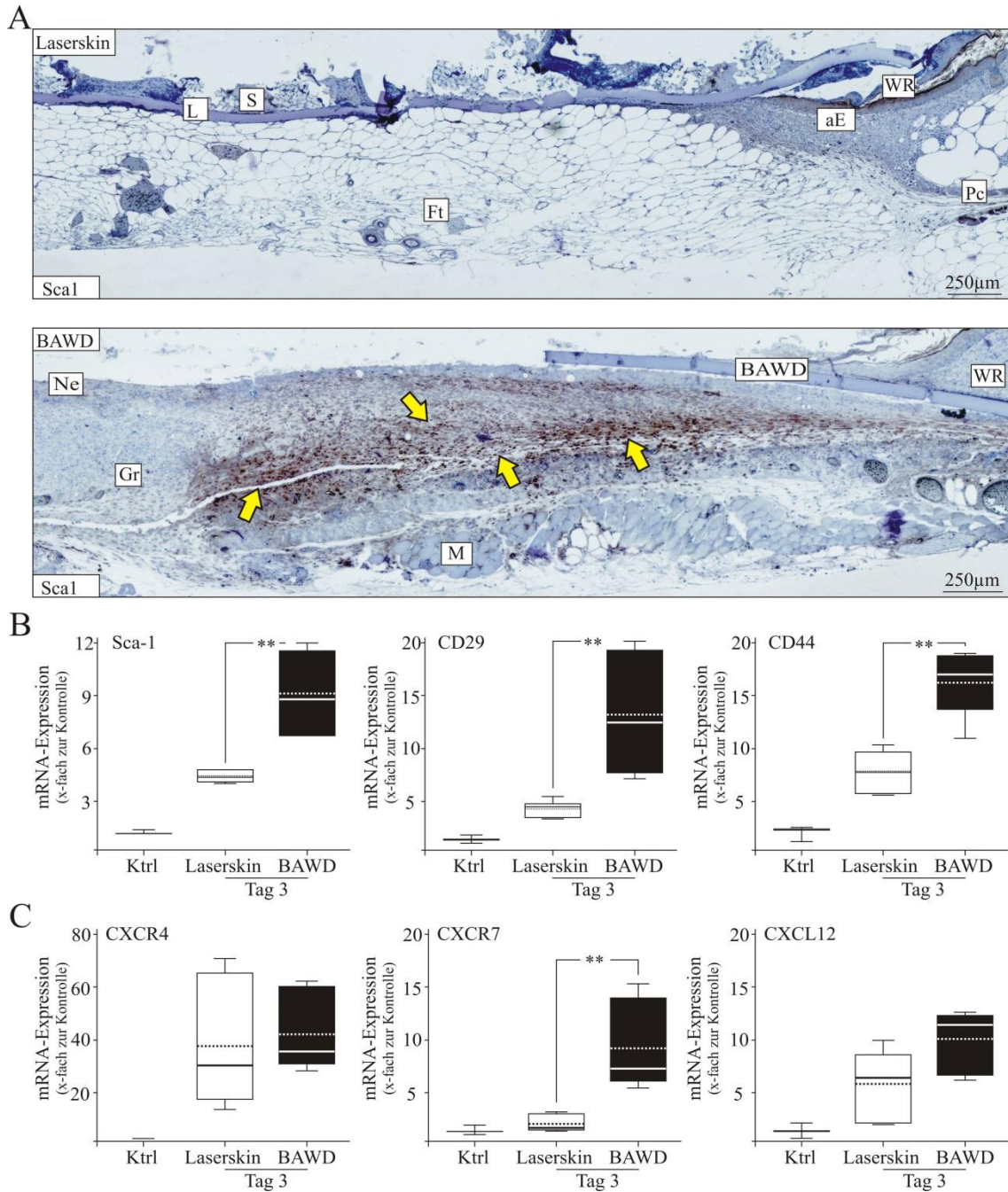


Abbildung 3.24 – BAWD-vermittelte Akkumulation Sca1-positiver Zellen

(A) Diabetische Wunden (Tag 10) wurden geschnitten und unter Verwendung spezifischer Antikörper Sca1-exprimierende Stammzellen im Wundgewebe immunhistochemisch lokalisiert; gelbe Pfeile kennzeichnen starke immunpositive Signale. (B+C) qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression der MSC-assoziierten Oberflächenmarker Sca1, CD29 und CD44, sowie der Rezeptoren CXCR4/CXCR7 und CXCL12. Wunden (n=2) diabetischer Tiere (n=7) wurden zu definierten Zeitpunkten (Tag 3 und Tag 10) isoliert. Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut und als Boxplots (Median: durchgezogene Linie, Mittelwert: gestrichelte Linie) dargestellt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (unpaired Students-t-Test).

Einhergehend mit der Akkumulation von MSCs war eine BAWD-induzierte Expression von CXCR7 detektierbar (Abbildung 3.24, C). Interessanterweise war in Laserskin-

behandelten Wunden keine vergleichbare CXCR-7-Induktion zu beobachten. Im Vergleich zu unverletzter diabetischer Kontrollhaut war die Expression von CXCL12 in Laserskin- und BAWD-behandelten Wunden leicht erhöht. Obwohl tendenziell die CXCL12-Transkripte nach BAWD erhöht vorlagen, war in der statistischen Auswertung keine Signifikanz festzustellen. Für die Expression von CXCR4 konnte keine behandlungsabhängige Veränderung festgestellt werden, allerdings war das mRNA-Expressionsniveau im Vergleich zu unverletzter Kontrollhaut in beiden Behandlungssituationen stark induziert (Abbildung 3.24, C).

3.5.2 Sca1-positive Zellen in der Wunde normal heilender Tiere

Die Befunde einer Sca1-positiven Zellinfiltration aus den Untersuchungen der diabetischen Wundheilung nach BAWD-Anwendung sollten in die akute Wundheilungssituation übertragen werden. Es war wichtig zu klären, ob in der akuten Heilung MSCs in das Wundareal rekrutiert werden. In diesem Zusammenhang würde eine physiologische Relevanz der MSC-Akkumulation im Gewebe akuter Wunden die Bedeutung der BAWD-vermittelten MSC-Infiltration hervorheben.

Die mRNA-Analysen Wunden normal-heilender Tiere zeigten eine deutliche Induktion der MSC-assoziierten Oberflächenmarker Sca1, CD29 und CD44 im Wundheilungsverlauf (Abbildung 3.25, A). Dabei war eine starke Sca-1 und CD29 mRNA-Induktion in der Initialphase der akuten Wundheilung zu beobachten, die im weiteren Wundheilungsverlauf persistierte. Die mRNA-Expression von CD44 war zum Zeitpunkt der späten Entzündungsphase und während der Granulationsphase stark induziert, zeigte aber im weiteren Heilungsverlauf ebenfalls eine fortdauernde Expression. In Korrelation zu den Befunden aus der diabetisch-gestörten Wundheilung konnte in der akuten Wunde eine stark induzierte mRNA-Expression von CXCR4 detektiert werden (Abbildung 3.25, B). Zwar zeigte die CXCR7-Expression eine Induktion nach Verletzung, jedoch konnte keine statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollhaut festgestellt werden. Interessanterweise war die Expression des chemotaktischen CXCL12 in zeitlicher Korrelation zur Expression des CXCR4/CXCR7 zu bringen und zeigte in der Phase der Granulation und Neovaskularisierung eine starke Induktion (Abbildung 3.25, B). Diese Ergebnisse spiegeln die potenzielle Rekrutierung von Stammzellen wider und verweisen auf eine potentielle Beteiligung von Stammzellen im akuten Wundheilungsverlauf.

III Ergebnisse

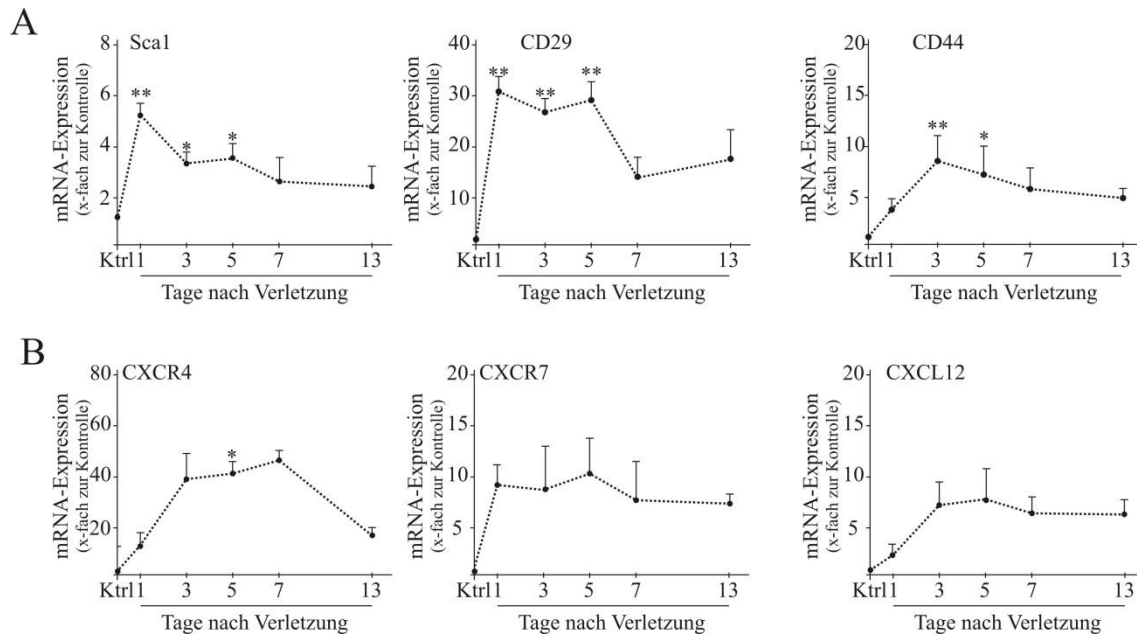


Abbildung 3.25 – mRNA-Expression MSC-assoziiierter Oberflächenmarker

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression (A) der MSC-assoziierten Oberflächenmarkern Sca1, CD29 und CD44, sowie (B) der Chemokinrezeptoren CXCR4/CXCR7 und CXCL12 in Wunden normalheilender Wildtyp-Tiere. Dabei ist mRNA-Expressionskinetik im Wundheilungsverlauf gezeigt. Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur Kontrollhaut dargestellt. Die entsprechenden Zeitwerte zeigen Mittelwerte \pm SEM von Wunden (n=36) aus C57BL/6-Tieren (n= 12 Tiere/Zeitwert aus 3 unabhängigen Versuchsserien). In (A) ist die Expressionskinetik diabetischer Wunden übersichtshalber eingefügt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (1way-ANOVA mit Dunnett's Multiple Comparison Test)

Die Akkumulation von MSCs im akuten Wundgewebe wurde durch eine nachfolgende FACS-Analyse verifiziert. Die Quantifizierung von infiltrierenden MSCs in das akute Wundgewebe wurde über die durchflußzytometrische Analyse aus dem Granulationsgewebe isolierter Zellpopulationen mit den MSC-assoziierten Oberflächenmarker Sca1, CD29 und CD44 erreicht. Der Anteil $CD45^-$ - $Sca1^+$ - $CD29^+$ - $CD44^+$ - Zellen im Gesamtanteil vitaler Zellen des Granulationsgewebes war nach Verwundung bis Tag 5 zunehmend (Abbildung 3.25, B) und steht im Einklang mit den mRNA-Analysen zu der Expression der MSC-assoziierten Oberflächenmoleküle sowie insbesondere zu der Expression des chemotaktischen Moleküls CXCL12 und den entsprechenden Rezeptoren CXCR4 und CXCR7.

III Ergebnisse

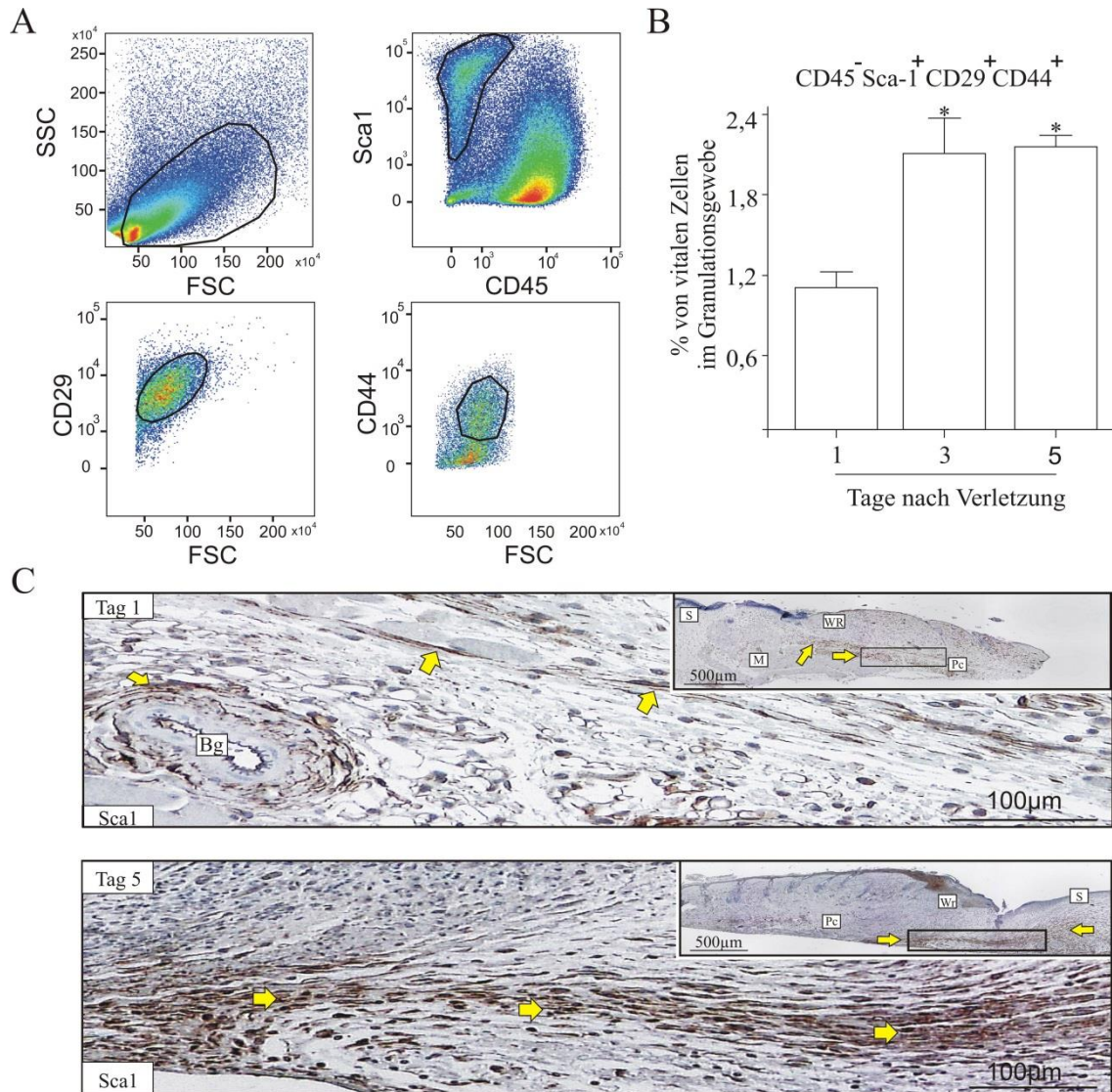


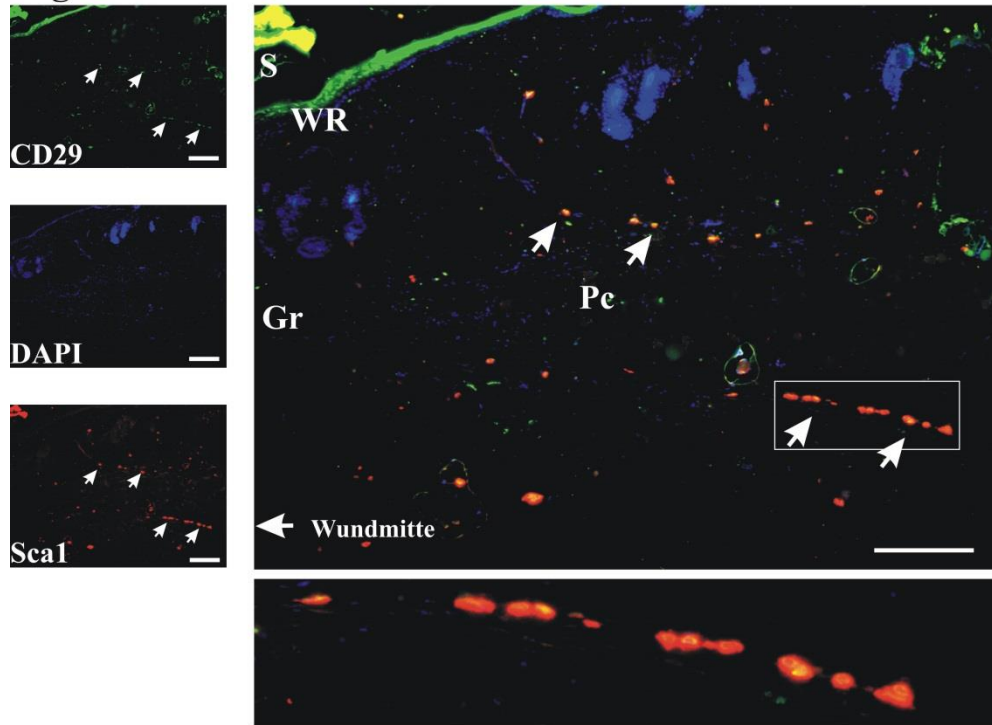
Abbildung 3.26 – Quantifizierung von MSC über die durchflußzytometrische Analyse der MSC-assoziierten Oberflächenmarker Sca1, CD29 und CD44 und Lokalisierung Sca1-positiver Zellen im Wundgewebe normal heilender Tiere

Für die FACS-Untersuchung zur Quantifizierung der MSC-Zellzahl im Wundgewebe (n=6 Wunden/Tier) wurden C57Bl/6-Tiere (n=4) verwundet und zu definierten Zeitpunkten (Tag 1, Tag 3 und Tag 5) getötet. Die Wunden wurden unmittelbar für die FACS-Analyse vorbereitet. (A) Exemplarische Darstellung der Auswertungsstrategie; schwarz-umrundete Felder kennzeichnen die positiven Signaldetektionen. (B) Die Analyse zur Bestimmung der relativen Zellzahl wurde mittels der Software FlowJo durchgeführt. Die Mittelwerte \pm SEM stellen die Population dreifach-positiver Zellen nach Ausschluß der vitalen Gesamtzellpopulation im Granulationsgewebe dar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (unpaired Students-t-Test im Vergleich zu Tag 1). (C) Unter Verwendung Sca1-spezifischer Antikörper wurden Sca1-positive Zellen im akuten Wundgewebe 1 und 5 Tagen nach Verletzung gefärbt. Dargestellt sind Ausschnitte (dunkler Rahmen im kleineren Übersichtsbild) repräsentativer Präparate, in denen die starken immunpositive Signale mit gelben Pfeilfen gekennzeichnet sind. Bg: Blutgefäß; S: Schorf; M: Muskel; WR: Wundrand; Pc: Panniculus carnosus

III Ergebnisse

Die Befunde wurden durch eine abschließende immunhistologische Untersuchung gestützt (Abbildung 3.26, C; Abbildung 3.27). Die Auswertung zur Lokalisation des Stammzellmarkers Sca1 ermöglichte die Detektion einer beginnenden Akkumulation Sca1-positiver Zellen angrenzend zu Blutgefäßen im Bereich des *panniculus carnosus* (Abbildung 3.26, C oben). Dabei wurde durch die Immunfluoreszenz-Analyse aufgrund der Verwendung von Serienschnitten (Schnittdicke 4 µm) eine Ko-Expression von Sca1 und CD29, sowie CD29 und CD44 detektiert (Abbildung 3.27) Mit der Anwendung der Opal™-Färbung konnte diese Ko-Expression der MSC-assoziierten Oberflächenmoleküle bestätigt werden (Abbildung 3.28). Im weiteren Wundheilungsverlauf wurde eine weitere Anreicherung Sca1-positiver Zellen beobachtet, die im Ausstrom aus den Wundrandbereichen bzw. Einstrom in das Granulationsgewebe resultierte (Abbildung 3.26, C unten) und sowohl die durchflußzytometrischen Analysen als auch die Daten zur mRNA-Expression verifizierte.

Tag 5 - CD29-Sca1



Tag 5 - CD29-CD44

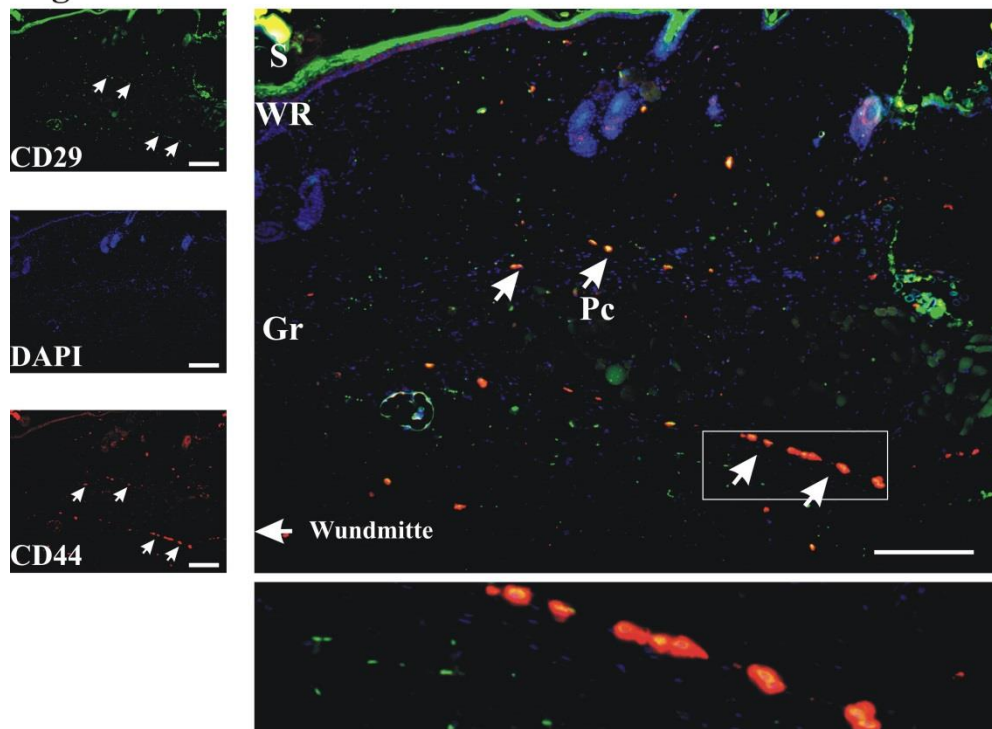


Abbildung 3.27 –Immunfluoreszierende histologische Lokalisierung Sca1-, CD29- und CD44-positiver Zellen im Wundgewebe normal heilender Tiere

Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Sca1, CD29 und CD44 wurden Tag-5-Wunden normal heilender Tiere gefärbt. Dargestellt sind die Einzelfärbung repräsentativer Präparate (Serienschnitt) sowie die Überlagerung, in denen starke immunpositive Signale mit weißen Pfeilfen gekennzeichnet ist. Zur besseren Visualisierung erfolge eine Kerngegenfärbung mit DAPI. Balken: 100µm; S: Schorf; WR: Wundrand, Gr: Granulationsgewebe; Pc: Panniculus carnosus

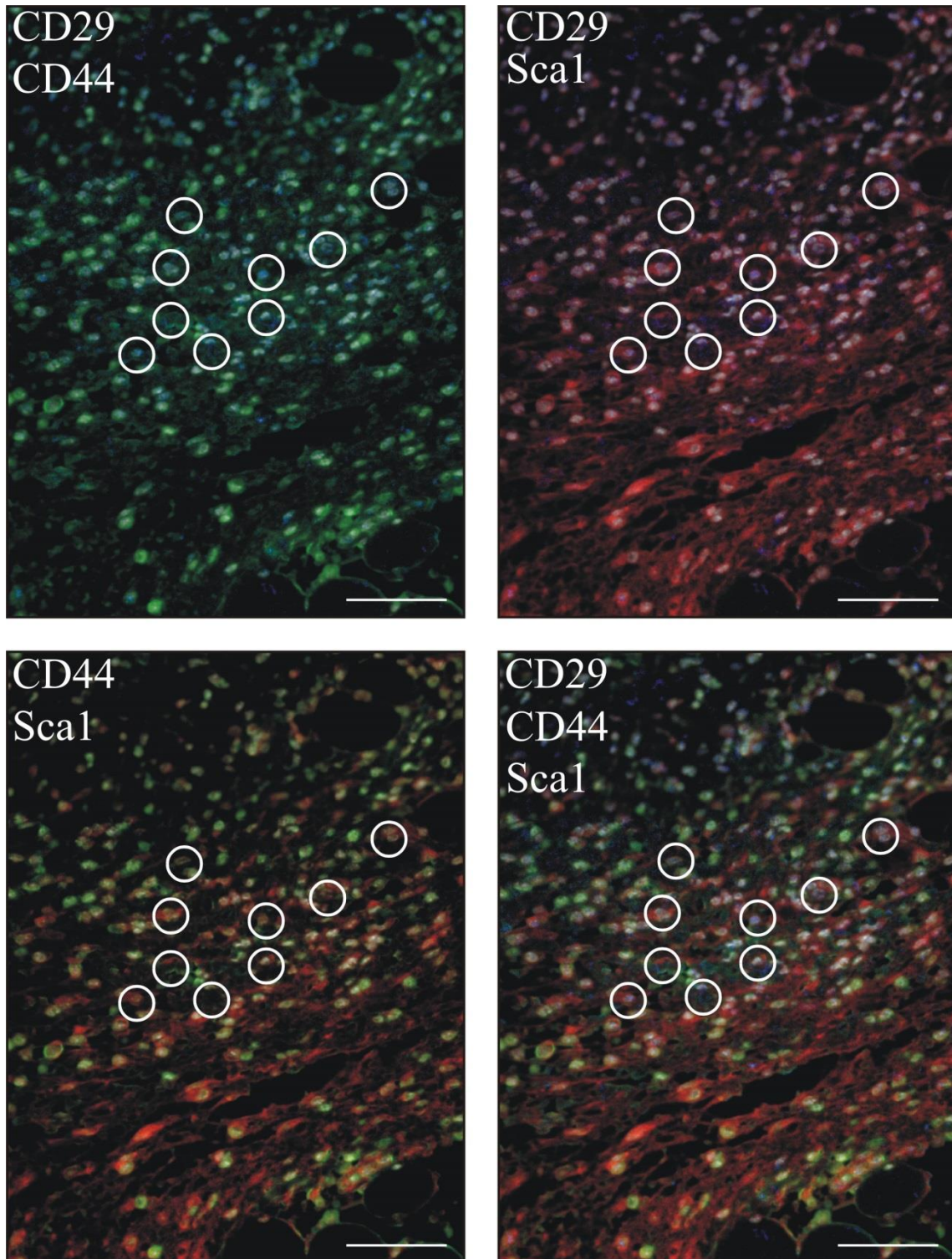


Abbildung 3.28 –Immunfluoreszierende histologische Lokalisierung Sca1-, CD29- und CD44-positiver Zellen im Wundgewebe normal heilender Tiere

Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Sca1 (rot), CD29 (blau) und CD44 (grün) wurden Tag-3-Wunden normal heilender Tiere mittels der Opal-Methode gefärbt. Dargestellt sind die entsprechenden Ko-Färbungen eines einzelnen Schnittes, sowie die Überlagerung, in denen starke immunpositive Signale mit weißen Kreisen gekennzeichnet sind. Zur besseren Visualisierung erfolge eine Kerngegenfärbung mit DAPI (weiß). Balken: 50µm

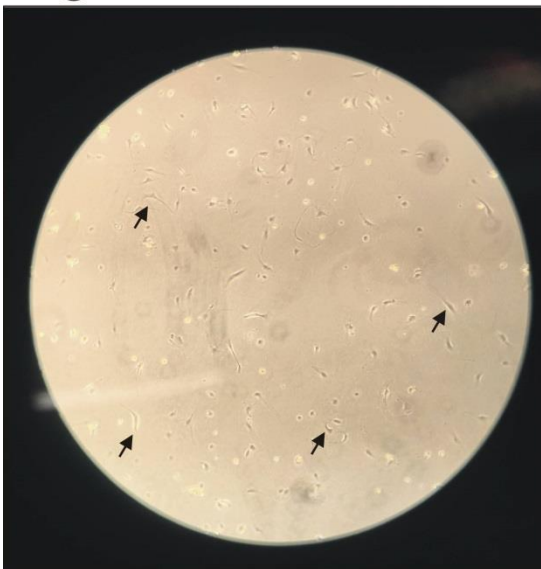
3.6 Einfluss von konditioniertem Keratinozyten-Medium auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

3.6.1 Isolation, Kultur und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde ein potentieller Einfluss von Keratinozyten auf die Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) gezeigt (siehe 3.5.1). Darüber hinaus wurde über histologische und FACS-basierte Untersuchungen auf die Präsenz von MSCs im Wundgewebe hingewiesen (siehe 3.5.2). Mit den nachfolgenden Experimenten sollte geklärt werden, inwieweit Keratinozyten nicht nur Einfluss auf die mögliche Rekrutierung von MSCs haben, sondern ob Keratinozyten tatsächlich in der Lage sind, das Differenzierungsschicksal der MSCs in Muskel-ähnliche Zellen zu beeinflussen.

Die Isolation der MSCs wurde nach Yu et al. 2011 durchgeführt (siehe 2.5.1). Das gewonnene Zellpellet wurde in DMEM-Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen kultiviert. Das Wachstum der MSCs wurde täglich unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach 24 Stunden im Inkubator konnten erste MSCs identifiziert werden (Abbildung 3.29), deren Anzahl mit fortschreitender Kultivierungsdauer zunehmend war. MSCs konnten durch ihre charakteristische Morphologie bestimmt werden, die sich aus einem kleinen Zellkörper und einer Fibroblasten-ähnlichen Morphologie ableitet.

Tag 1



Tag 2

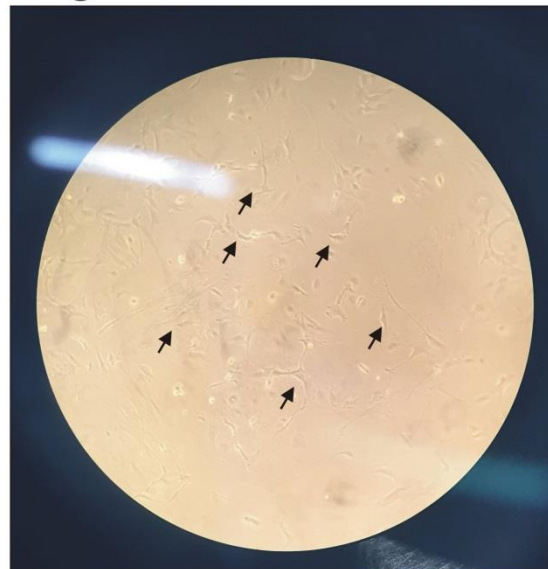


Abbildung 3.29 –Mikroskopische Aufnahme der MSC-Zellkultur

Mikroskopische Aufnahmen (4x Vergrößerung) von MSCs in 175 cm²-Zellkulturflaschen. Pfeile zeigen morphologisch-charakteristische Zellen an.

III Ergebnisse

Im weiteren Verlauf wurde das Differenzierungspotential der isolierten Zellen untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Passagen potentieller MSCs (Passage 1 und Passage 6) mit definierten Medien differenziert (siehe 2.5.3).

Die histologischen Untersuchungen ergaben nach einer 14-tägigen Inkubationszeit mit Differenzierungsmedium, dass sowohl Zellen aus Passage 1 als auch Passage 6 zu adipozytären Zellen (Färbung mit Oil-Red-O) differenziert werden konnten (Abbildung 3.30), wohingegen mit DMEM-Vollmedium kultivierte Kontrollzellen nicht differenziert sind. Mittels Isopropanol wurde das Färbemittel (Oil-Red-O) eluiert und photometrisch quantitativ ermittelt. Dabei wurde eine signifikante Zunahme des Farbstoffs bestimmt, was die Beobachtung um die Differenzierung der MSCs zu Adipozyten hin verstärkt (Abbildung 3.31).

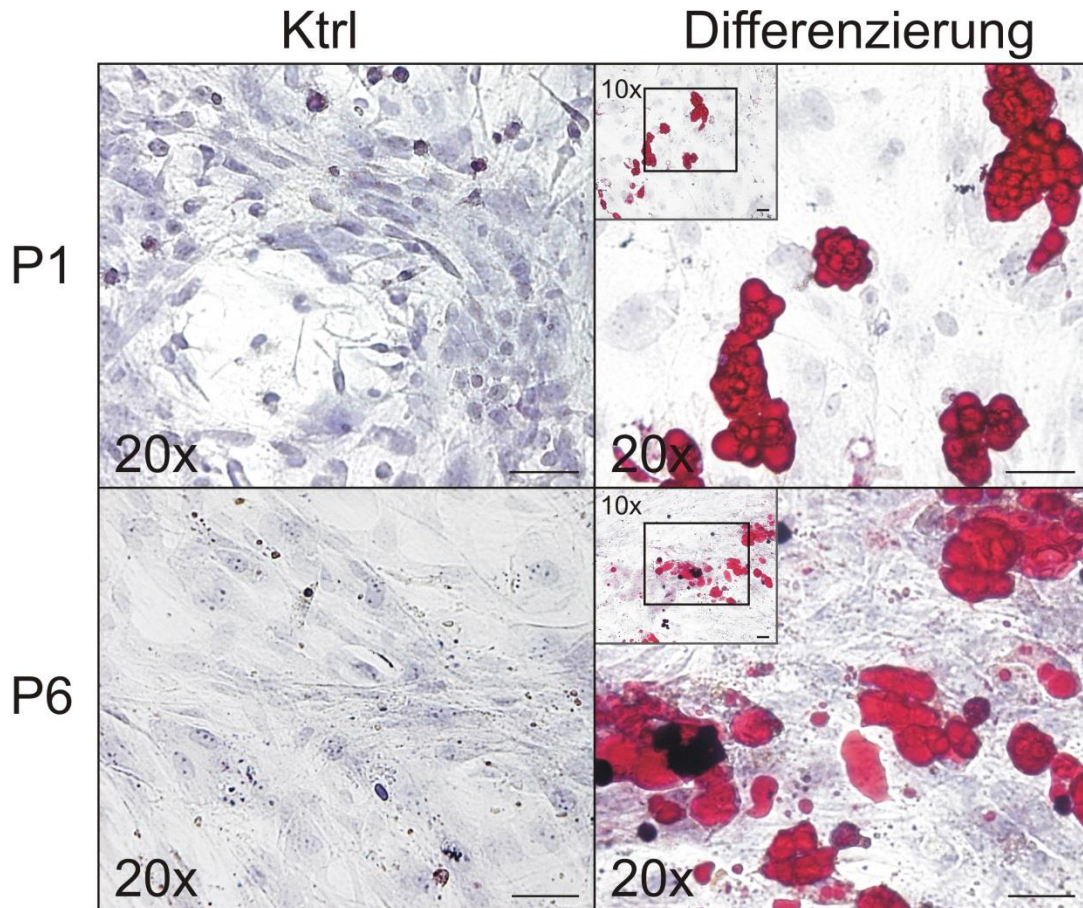


Abbildung 3.30 – Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu adipozytären Zellen

Unter Verwendung eines definierten Differenzierungsmediums und –dauer (14 Tage) wurden zwei verschiedene MSC-Passagen (Passage 1 und Passage 6) zu adipozytären Zellen differenziert. Dargestellt sind repräsentative, mikroskopische Aufnahmen (20x-Vergrößerung). Adipozytäre Zellen wurden über Oil-Red-O angefärbt (rot). Zur besseren Visualisierung erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämotoxylin (blau). Balken: 50 μ m.

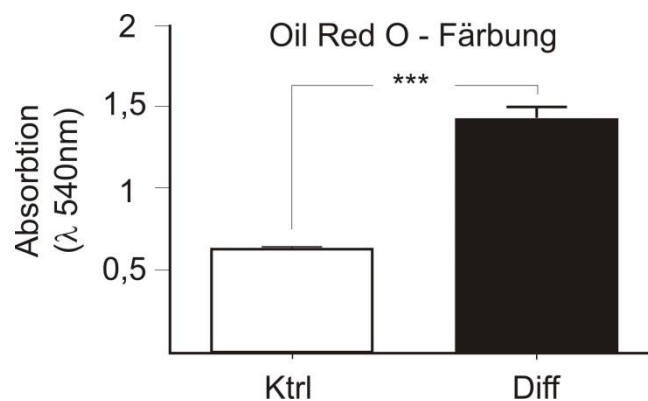


Abbildung 3.31 – Quantifizierung der Oil-Red-O-Färbung

MSCs (Passage 1) wurden 14 Tage in definiertem Medium zu Adipozyten differenziert und mittels Oil-Red-O gefärbt. Das Färbemittel wurde in drei Versuchsansätzen (n=3) mittels Isopropanol eluiert und photometrisch (bei $\lambda=540$ nm) quantitativ bestimmt. *** $p < 0,001$ (unpaired Students-t-Test).

III Ergebnisse

Zudem zeigten parallel stattfindende Differenzierungsexperimente das Differenzierungspotential von MSCs hinsichtlich einer osteozytären Entwicklung auf (Abbildung 3.32), so dass unter der Durchführung des Protokolls nach Yu et al. (2011) auf eine erfolgreiche und reproduzierbare MSC-Isolation geschlossen werden kann.

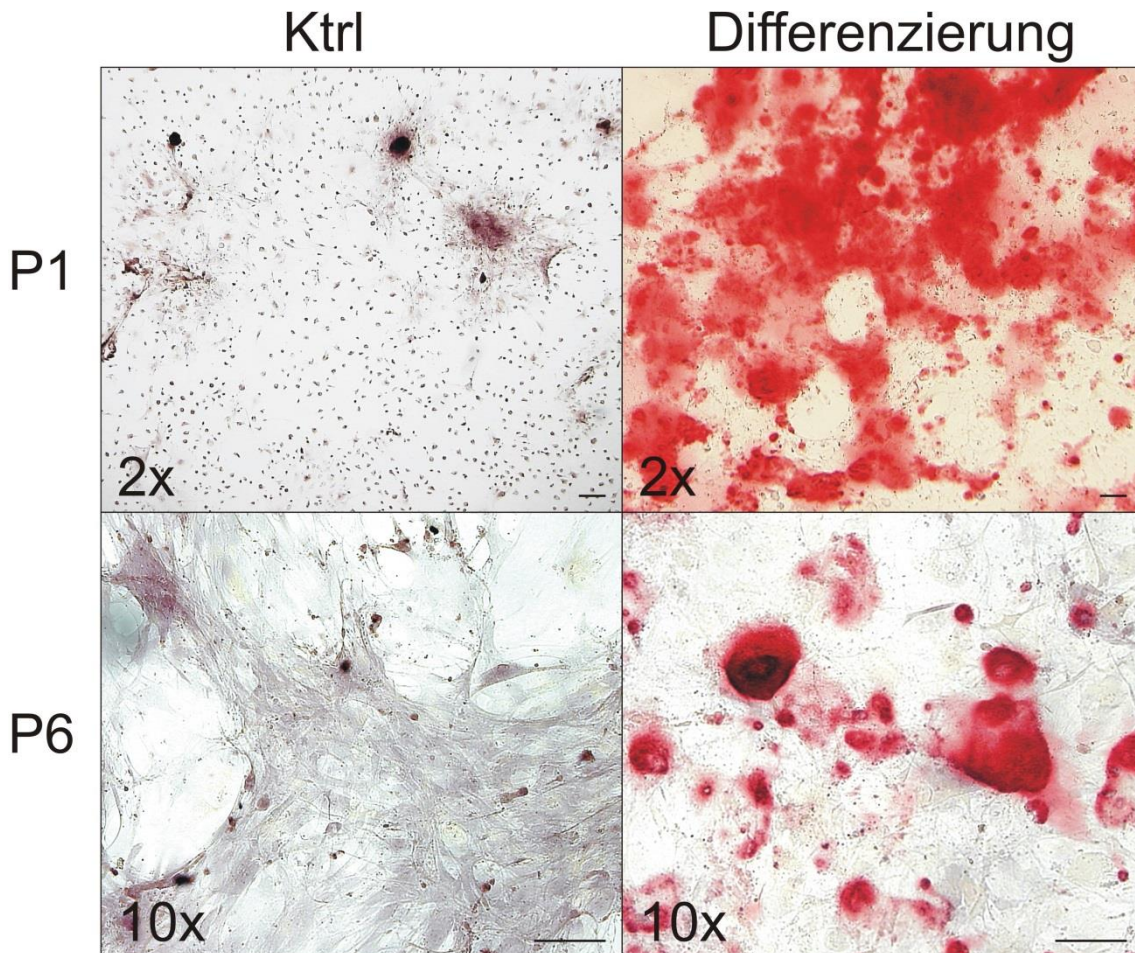


Abbildung 3.32 – Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu osteozytären Zellen

Unter Verwendung eines definierten Differenzierungsmediums und –dauer (21 Tage) wurden zwei verschiedene MSC-Passagen (Passage 1 und Passage 6) zu osteozytären Zellen differenziert. Dargestellt sind repräsentative, mikroskopische Aufnahmen (2x- und 10x-Vergrößerung). Osteozytäre Zellen wurden über Alizarinrot S angefärbt (rot). Balken: 50 µm

Diese Erkenntnisse wurden im Abschluss über die durchflußzytometrische Analyse aus einer frühen (Passage 2) und einer späten (Passage 7) MSC-Kultur mit den MSC-assoziierten Oberflächenmarkern Sca1, CD29 und CD44 bestätigt (Abbildung 3.33, Abbildung 3.34). Der Anteil Sca1⁺-CD29⁺-CD44⁺-positiver Zellen lag zwischen 44,3 % und 67,5 % (Tabelle 3.3).

III Ergebnisse

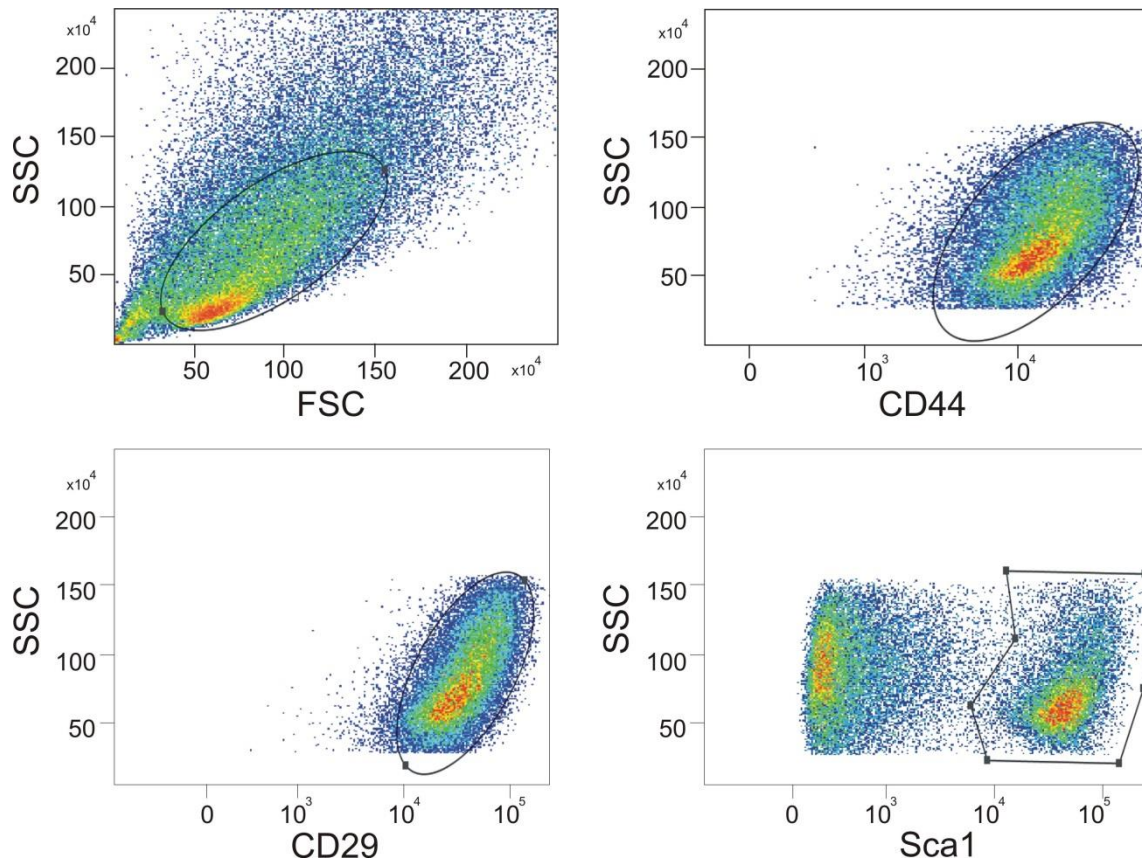


Abbildung 3.33 – Quantifizierung von MSC über die durchflußzytometrische Analyse der MSC-assoziierten Oberflächenmarker Sca1, CD29 und CD 44

Für die FACS-Untersuchung zur Quantifizierung der MSC-Population in der Zellkultur nach Isolation aus dem Fettgewebe wurden unterschiedliche Passagen (Passage 2 und Passage 7) aus unterschiedlichen Isolationsexperimenten (n=2) verwendet. Dargestellt ist eine exemplarische Auswertungsstrategie; schwarz-umrundete Felder kennzeichnen die positiven Signaldetektionen.

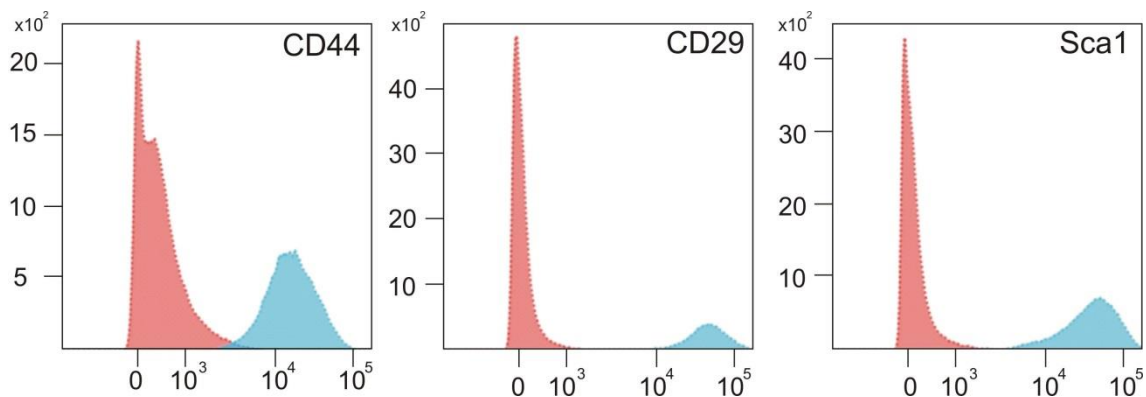


Abbildung 3.34 – Histogramme der MSC-assoziierten Oberflächenmarker Sca1, CD29 und CD44

Für die FACS-Untersuchung zur Quantifizierung der MSC-Population in der Zellkultur nach Isolation aus dem Fettgewebe wurden unterschiedliche Passagen (Passage 2 und Passage 7) aus unterschiedlichen Isolationsexperimenten (n=2) verwendet. Dargestellt sind die Positivsignale (blau) im Vergleich zur Negativkontrolle (rot).

Tabelle 3.3: Prozentualer Anteil MSC-assoziierter Oberflächenmarker

Passage	CD44+	CD44+/CD29+	CD44+/CD29+/Sca1+
MSC P 2 (1)	74,1 %	99,2 %	67,5 %
MSC P 2 (2)	86,3 %	97,4 %	62,2 %
MSC P 7 (1)	96,5 %	97,8 %	44,3 %
MSC P 7 (2)	99,5 %	98,7 %	45,0 %

3.6.2 Stimulation der MSCs mit konditioniertem Keratinozyten-Medium

In den vorausgegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die MSC-Isolation nach Yu (Yu et al. 2011) reproduzierbar war, charakteristische Eigenschaften aufzeigte (Plastikadhärenz und Differenzierungspotential) und nach der FACS-Auswertung in einer MSC-Population ($CD44^+CD29^+Sca1^+$) in der Zellkultur von 44,3 % bis zu 67,5 % resultierte.

Diese Erkenntnisse als Grundlage nehmend, wurden im nachfolgenden Stimulationsexperimente mit Keratinozyten-konditioniertem Medium durchgeführt, um die beobachtete Präsenz Muskel-ähnlicher Strukturelemente während der BAWD-Anwendung im diabetischen und in der normal-heilenden Wundsituation nachzubilden. Ziel dieser Experimente sollte sein, einen Mechanismus aufzuklären, der beschreibt, ob Keratinozyten in der Lage sind, die Differenzierung von MSCs in Muskel-ähnliche Zellen zu beeinflussen.

Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben. Über die qRT-PCR wurde die mRNA-Expression von FABP3, FABP4, Myf6, Myh7 und Myod nach Stimulation mit KCBI-konditioniertem Medium (Abbildung 3.35) und HaCaT-konditioniertem Medium (Abbildung 3.36) bestimmt. Nach Auswertung der mRNA-Expression stimulierter MSCs im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen waren weder für KCBI- noch für HaCaT-konditioniertes Medium signifikante Unterschiede ersichtlich.

III Ergebnisse

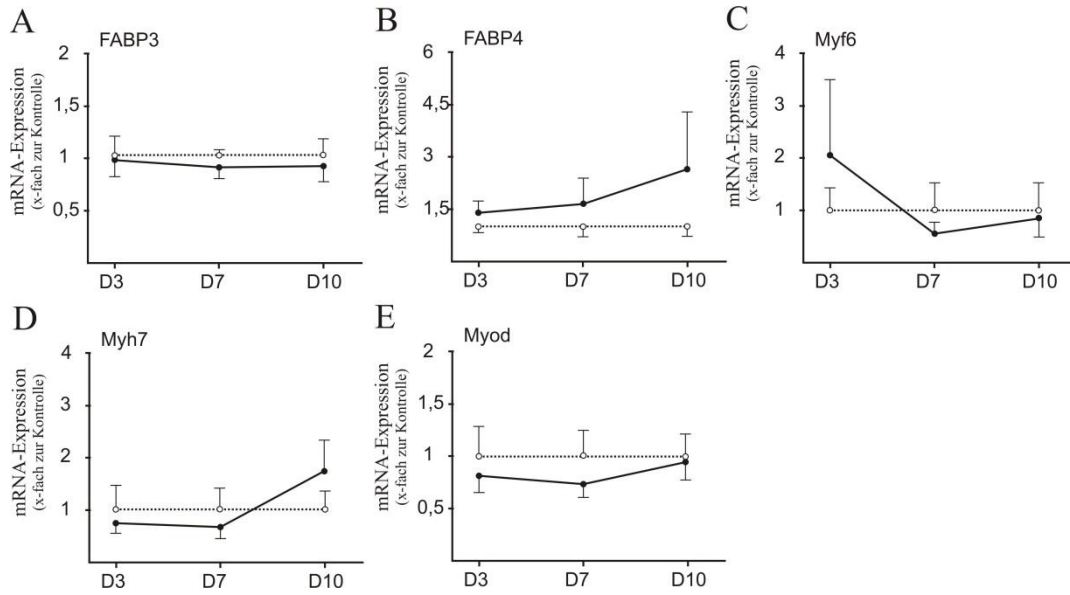


Abbildung 3.35 – mRNA-Expression in MSCs nach Stimulation mit KCBI-konditioniertem Medium

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von verschiedenen Muskel-spezifischen Genen (A, C-E) und FABP4 (B). Die mRNA von MSC-Zellkulturen (Passage 1, 3, 5) aus verschiedenen Isolationen (n=3) wurde zu definierten Zeitpunkten (Tag 3, Tag 7 und Tag 10) nach Stimulation mit KCBI-konditioniertem Medium isoliert. Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur am gleichen Tag isolierten mRNA der Kontrollzellen dargestellt. Die mRNA-Expression stimulierter Zellen im Vgl. zu Kontrollzellen ist in schwarzen Kreisen dargestellt. Kontrollzell-mRNA-Expression: weiße Kreise.

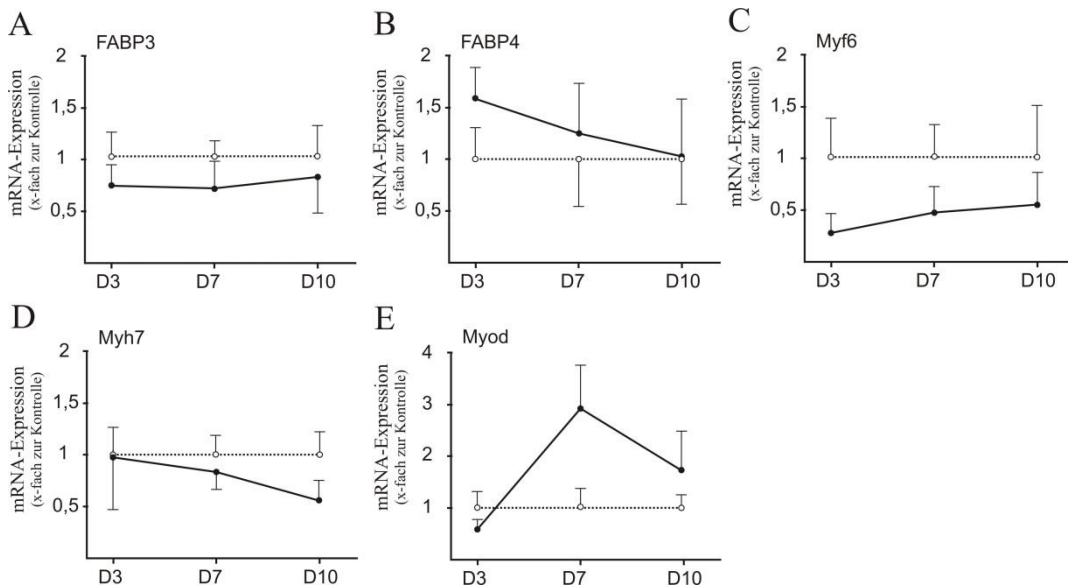


Abbildung 3.36 – mRNA-Expression in MSCs nach Stimulation mit HaCaT-konditioniertem Medium

qRT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von verschiedenen Muskel-spezifischen Genen (A, C-E) und FABP4 (B). Die mRNA von MSC-Zellkulturen (Passage 1, 3, 5) aus verschiedenen Isolationen (n=3) wurde zu definierten Zeitpunkten (Tag 3, Tag 7 und Tag 10) nach Stimulation mit HaCaT-konditioniertem Medium isoliert. Die Quantifizierung der Transkripte ist als x-fach-Wert im Vergleich zur am gleichen Tag isolierten mRNA der Kontrollzellen dargestellt. Die mRNA-Expression stimulierter Zellen im Vgl. zu Kontrollzellen ist in schwarzen Kreisen dargestellt. Kontrollzell-mRNA-Expression: weiße Kreise.

3.7 Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse

Zur Identifizierung einer möglichen Antwort des Keratinozyten-basierten BAWD auf wundrelevante Mediatoren (IL-1 β und TNF- α) sind Keratinozyten *in-vitro* stimuliert worden und eine nachfolgende Genomexpressionsanalyse wurde durchgeführt. Eine 3-stündige Stimulation resultierte in der differentiellen Expression von 66 Genen. Nach einer 24-stündigen Stimulation war die regulierte Expression von 225 Genen identifiziert. Dabei war eine verstärkte Expression von Wachstumsfaktoren, pro-angiogenen Faktoren, immunmodulatorischen Faktoren und EZM-Molekülen detektierbar (Abbildung 3.2 + Tabelle 3.1).

In tierexperimentellen Untersuchungen an diabetischen *db/db*-Mäusen wurde die Funktionalität und Wirksamkeit des BAWD *in vivo* getestet. Dabei war zunächst makroskopisch eine Wundverbesserung nach BAWD-Behandlung sichtbar, die in nachfolgenden histologischen Untersuchungen verifiziert wurde. Der offene Wundbereich war an Tag 10 nach BAWD-Behandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung um 30% reduziert. Mittels einer AZAN-Färbung wurde ein robustes, ausgeprägtes Granulationsgewebe nachgewiesen. Zudem vermittelte das BAWD eine histologisch zu beobachtende zahlenmäßige Reduktion von Fettzellen, eine Induktion von Muskelgewebe, sowie eine größere Anzahl an hyperproliferativen Zellen im Wundrandbereich (Abbildung 3.3 – Abbildung 3.5)

Die Keratinozyten des BAWD waren über den Heilungsverlauf vital und wurden nach Applikation auf das murine Wundgewebe in der Expression von VEGF und IL-8 induziert (Abbildung 3.6).

Das BAWD hatte keine Auswirkung auf inflammatorische Prozesse in der Wundheilung diabetischer Tiere. Die Expression verschiedener Zyto- und Chemokine war unverändert. Eine unveränderte Expression und Anzahl von PMN und M Φ wurde nachgewiesen, die histologisch jedoch in einer differentiellen Lokalisation nach BAWD-Behandlung resultierte. Das BAWD vermittelte die Induktion der TNFAIP6-mRNA. Das TNFAIP6-Protein wurde immunhistochemisch im zum Applikationsbereich angrenzenden Granulationsgewebe detektiert (Abbildung 3.7 – Abbildung 3.15).

III Ergebnisse

Die BAWD-Behandlung induzierte in der immunhistochemischen Auswertung die Ausbildung neuer vaskulärer Strukturen, dabei wurde jedoch auf molekularer Ebene eine gleichstarke mRNA-Induktion angiogener Faktoren im Granulationsgewebe vorgefunden (Abbildung 3.16).

Die BAWD-Behandlung resultierte nach Auswertung der Genomsequenzierung in einer differentiellen Expression von 297 Genen nach einer Behandlungsdauer von 10 Tagen (71 Gene herunter- und 226 Gene heraufreguliert). Dabei war eine Vielzahl an Muskelassoziierten Genen signifikant hochreguliert, die funktionell mit Skelettmuskel-, Herzmuskelentwicklung und Muskeldifferenzierung assoziiert sind. Zudem wurde eine phänotypische Aktivitätsänderung von inflammatorischen M Φ (M1) hin zu regenerativen M Φ (M2) beobachtet (Abbildung 3.17 + Tabelle 3.2).

Zudem veränderte eine BAWD-Behandlung die Balance zwischen FABP3- und FABP4-exprimierenden Zellen und resultierte in einer erhöhten Induktion muskelspezifischer Transkriptionsfaktoren. Dazu deutete die induzierte Expression von Genen aus dem Troponin-Proteinkomplex und von kontraktilen Muskelproteinen auf die Ausbildung Muskel-ähnlicher, kontraktiler Strukturen hin (Abbildung 3.18 – Abbildung 3.20).

Das BAWD bewirkte eine Akkumulation von Sca1-positiven Zellen im Granulationsgewebe. Die mRNA-Expression von MSC-spezifischen Genen Sca1, CD29 und CD44 war in der diabetischen Maus nach Verletzung erhöht und nach BAWD-Anwendung signifikant verstärkt (Abbildung 3.23 + Abbildung 3.24).

Es war wichtig zu klären, ob die BAWD-Behandlung in diabetisch-gestörter Wundheilung einen Prozess initiiert, der in der akuten Wundheilung normal-heilender Tiere physiologische Bedeutung hat. Dabei war die Übertragung der Beobachtungen einer BAWD-vermittelten Induktion muskulärer Differenzierungsprozesse auf den normalen Wundheilungsprozess möglich. Die Expression von spezifischen Transkriptionsfaktoren war in der Initialphase der normalen Heilung gesunder Tiere stark erhöht. Zudem korrelierte die Expression von Troponin- und Myh7-Genen temporär mit dem Aufbau von Granulationsgewebe. Immunhistochemisch konnten die kontraktilen Elemente zwischen

III Ergebnisse

den Keratinozyten am Wundrand und den muskulären Ausläufern des *panniculus carnosus* lokalisiert werden (Abbildung 3.21 + Abbildung 3.22)

In der Initialphase der normalen Wundheilung gesunder Tiere war eine starke Expression von MSC-Markern zu beobachten. Die frühe Akkumulation von MSCs im akuten Wundgewebe wurde durch eine FACS-Analyse verifiziert und durch immunhistologische Untersuchungen gestützt. Dabei konnte eine beginnende Akkumulation von Sca1-positiven Zellen angrenzend zu Blutgefäßen an Tag 1 nach Verletzung detektiert werden, die durch Ausstrom aus den Wundrandbereichen in einem Einstrom in das Granulationsgewebe im weiteren Wundheilungsverlauf resultierte (Abbildung 3.25 - Abbildung 3.28).

Die Isolation von MSCs aus inguinalem Fettgewebe wurde erfolgreich durchgeführt. Eine Stimulation von aus Fettgewebe-isolierten MSCs mit konditioniertem Keratinozytem-Medium hatte keinen Einfluss auf das Differenzierungsschicksal der MSCs gezeigt (Abbildung 3.29 – Abbildung 3.36).

IV Diskussion

Die Verwendung biologisch-aktiver Wunddressings (BAWD) hat bis heute in über 200000 Patienten mit verschiedenen Hautverletzungen wie Brandwunden, chirurgischen Wunden und chronischen Ulzerationen einen Behandlungserfolg erzielt [Lazic und Falanga, 2011]. BAWDs sekretieren *in vitro* zahlreiche heilungsrelevante Faktoren wie VEGF, PDGF-A und IGF-1 und interagieren mit dem Wundgewebe [Mansbridge et al., 1998; Badiavias et al., 2002]. Die BAWD-Behandlung wird nicht als klassische Transplantation charakterisiert, sondern bewirkt einen transienten Wundstimulus, der in der Regel so lange anhält, wie die Effektorzellen vital und aktiv im Konstrukt verbleiben [Griffiths et al., 2004]. Ein wesentlicher Effekt, der die erfolgreiche BAWD-Applikation verdeutlicht, wird als Wundrand-Effekt bezeichnet und beinhaltet die BAWD-vermittelte Stimulation der epithelialen Wundränder zur Migration in die Wundmitte [Phillips und Gilchrest, 1990; Lazic und Falanga, 2011]. Allerdings bleiben nach aktuellem Forschungsstand die heilungsfördernden Mechanismen einer BAWD-Behandlung größtenteils unklar und nicht geklärt [Lazic und Falanga, 2011].

4.1 Verwendung biologisch-aktiver Wunddressings (BAWD) in der Behandlung diabetischer Ulzerationen

In der Erforschung Diabetes mellitus-Typ-2-assoziiierter Erkrankungen ist die Nutzung von Tiermodellen von Vorteil. Dabei sind die geringen Haltungsansprüche, die hohe Reproduktivität und die hohe Verfügbarkeit der Tiere von großer Bedeutung. Zwar ist das murine Genom um ca. 10 % kleiner als das humane Genom, dennoch konnte eine starke Übereinstimmungsrate der Gene des Mauschromosoms 16 und Chromosomen des humanen Genoms (3, 8, 12, 16, 21 und 22) festgestellt werden [Mural et al., 2002]. In der Erforschung diabetisch-gestörter Wundheilung werden insbesondere die genetisch-prädisponierten *ob/ob* und *db/db*-Mausstämme häufig verwendet [Chatzigeorgiou et al., 2009; Seitz et al., 2010]. Nach Verletzung entwickeln beide Mausstämme gravierende Wundheilungsstörungen. Die wichtigsten Defekte in der Reepithelialisierung und Ausbildung von Granulationsgewebe wurden mit dem Verlust der Funktion verschiedener Wachstumsfaktoren assoziiert, die auf Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen regulierend einwirken [Greenhalgh et al., 1990; Werner et al., 1994; Frank et al., 2000; Seitz et al., 2010]. Tiere des *db/db*-Mausstamms werden schon früh hyperpha-

gisch, adipös und Insulin-resistent und entwickeln eine starke Hyperglykämie [Chatzigeorgiou et al., 2009].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues BAWD der Firma Boehringer Ingelheim untersucht. Das BAWD besteht aus zwei Komponenten. Diese Komponenten sind allogene, interfollikuläre, humane Keratinozyten und eine Hyaluronsäure-haltige Trägermembran (Laserskin). Nach BAWD-Anwendung auf Wunden diabetischer *db/db*-Tiere wurden ausgeprägte Wundränder auf murinem Wundgewebe beobachtet (Abbildung 3.3, B). Der Effekt resultierte nach Auswertung der histologischen Präparate in einer verbesserten Reepithelialisierung (Abbildung 3.4, B) und steht in Übereinstimmung zu den Ergebnissen zulassungsrelevanter Studien, in denen auf einen BAWD-vermittelten beschleunigten Wundverschluss hingewiesen wurde [Falanga und Sabolinski, 1999; Marston et al., 2003]. Interessanterweise zeigte eine BAWD-Behandlung diabetischer Mäuse zudem eine starke Ausbildung von funktionalem Granulationsgewebe in der murinen diabetischen Wunde (Abbildung 3.5, Abbildung 3.16). Die aktuelle klinische Grundversorgung diabetischer Fußulzera beschränkt sich zurzeit auf eine konservative Lokaltherapie, in der die Wunde von avitalen Gewebeanteilen befreit (Debridement) und durch eine Infektionskontrolle versorgt wird [Doupsis und Veves, 2008]. In erster Linie soll durch diese Maßnahme das Risiko einer Amputation vermindert werden, eventuelle Gewebe-aufbauende therapeutische Ansätze sind sekundär [Boulton, 2004]. Folglich wäre der beschleunigte Wundverschluss mit der Ausbildung von funktionalem Granulationsgewebe für die Behandlung diabetischer Wunden von großer Bedeutung. In der Behandlung diabetischer Ulzera mit rekombinanten PDGF-BB-Faktor (Becaplermin) wurde eine verbesserte Epithelialisierung erreicht, allerdings wurde auf verstärkte Ausbildung von Granulationsgewebe nicht eingegangen, weil dieser Effekt möglicherweise nicht beobachtet werden konnte [Steed et al., 1995; Wieman et al., 1998]. Die Anwendung mit Becaplermin wurde jedoch mit der Ausbildung von malignen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht, so dass eine Behandlung diabetischer Ulzerationen stark reglementiert wurde [Papanas und Maltezos, 2010]. Entgegen der Funktionsweise inerter Wundverbände, die lediglich die Wunde bedecken, kann durch die BAWD-Anwendung eine dynamische Wundheilung erreicht werden, in der das biologisch-aktive Wund dressing kontext-abhängig mit den spezifischen Wundmediatoren reagiert [Lazic und Falanga, 2011]. Aufgrund der temporären Verfügbarkeit der Effektorzellen, kann die Induktion von malignen Erkrankungen ausgeschlossen werden, so

dass im Vergleich zur monotherapeutischen Behandlung diabetischer Ulzerationen mit der Anwendung von BAWD ein weiterer Vorteil besteht [Griffiths et al., 2004; Gurtner et al., 2008].

Eine wundheilungsförderliche Interaktion setzt nicht nur die Aktivität der lebenden Wundaufgabe voraus, sondern auch ihre Responsivität auf wundheilungsrelevante Mediatoren. Die Ergebnisse der histologischen und molekularen Evaluation der BAWD-Anwendung in diabetischer Wundheilung (Abbildung 3.5, Abbildung 3.6) deuten auf eine Interaktion zwischen Konstrukt und Wunde hin. Darüber hinaus kann die beobachtete Ausbildung des Granulationsgewebes nach BAWD auf die Interaktion mit Fibroblasten zurückzuführen sein [Werner et al., 2007]. Keratinozyten sezernieren Wachstumsfaktoren, die Fibroblasten aktivieren können. So liegt in der kutanen Wundheilung FGF2 nach Verletzung in erhöhter Konzentration vor. Es wird in Basalkeratinozyten normaler und hyperproliferativer Epidermis exprimiert und erfüllt wichtige Funktionen in der Ausbildung des Granulationsgewebes und der Reepithelialisierung [Kurita et al., 1992; Sasaki et al., 1992; Ortega et al., 1998; Werner und Grose, 2003]. Aktivierte Fibroblasten produzieren u.a. Keratinozyten-spezifische Wachstumsfaktoren und darüber hinaus EZM-Proteine und tragen zum Wiederaufbau des zerstörten Gewebes wesentlich bei [Werner und Grose, 2003].

Interessanterweise induzierte die *in vitro*-Stimulation des BAWD mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF- α die Expression wichtiger wundheilungsrelevanter Faktoren wie FGF2, HB-EGF und TGF- β 3 (Tabelle 3.2). Nach Auswertung der Whole-Genom-Sequenzierung konnte zudem eine Induktion von Zytokinen und Chemokinen des BAWD gezeigt werden, so dass in Kombination mit der induzierten Expression von EZM-Komponenten (wie Fibronectin) nach *in vitro*-Stimulation ein möglicher wundheilungsmodulierender Effekt festgehalten werden kann. Diese Beobachtungen stehen in Einklang zu der beschriebenen Wirkungsweise weiterer biologisch-aktiver Wunddressings [Mansbridge et al., 1998] und verdeutlichen die große Bedeutung zellulärer Therapeutika als Quelle biologischer Signale im Kontext gestörter Wundheilung [Gurtner et al., 2008].

Die Bedeutung des positiven Behandlungseffekts in der diabetischen Wunde wird um eine weitere interessante Beobachtung verstärkt. Eine systemische, blutzuckersenkende

Wirkung war in den diabetischen Tieren auszuschließen (Abbildung 3.4, A). Zur Wiederherstellung einer adäquaten Wundheilung diabetischer *ob/ob*-Tiere wird jedoch die systemische Gabe von Leptin als blutzuckersenkendes Mittel benötigt [Goren et al., 2003]. Mögliche Erklärungsansätze der verbesserten Wundheilung trotz gleichbleibender Blutzuckerwerte werden in den nachfolgenden Kapiteln diskutiert.

4.2 Moduliert das BAWD die Entzündungsreaktion nach Verletzung direkt oder indirekt?

4.2.1 Heilung aufgrund differenzierter Verteilung von Immunzellen

Die Entzündungsreaktion in Folge einer Gewebsverletzung stellt einen integralen Bestandteil der Wundheilung dar [Martin, 1997]. Die Initiierung der Wundheilungsprozesse und die Regulation der Immunzellinfiltration sind für den Ausgang der Wundheilung von großer Bedeutung und unterliegen einer engen Kontrolle [Martin und Leibovich, 2005; Eming et al., 2007]. Fehlregulierte Prozesse in der inflammatorischen Phase begründen oftmals massive Wundheilungsstörungen und resultieren als Konsequenz in einer überschießenden Infiltration neutrophiler Granulozyten (PMN) und Makrophagen (M Φ) [Fahey et al., 1991; Loots et al., 1998; Frank et al., 2000; Wetzler et al., 2000; Diegelmann et al., 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bewertung der inflammatorischen Immunantwort im Wundheilungsprozess das Expressionsprofil von Zytokinen und Chemokinen im Zuge einer BAWD-Behandlung untersucht. Die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren (IL-1 β und TNF- α) war in der diabetischen Wunde unabhängig der Behandlung persistierend und kann die Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigen [Hübner et al., 1996; Wetzler et al., 2000]. Ergänzend dazu und in Korrelation zu früheren Untersuchungen von Wetzler et. al (2000) konnten die Expressionsanalysen ein charakteristisches Muster diabetisch-gestörter Wundheilung aufzeigen, in der die Chemokinexpression in einer anhaltenden Induktion im Wundheilungsverlauf resultierte.

Interessanterweise konnte entgegen der Beobachtung, dass eine persistierende Inflammation den fortlaufenden Wundheilungsprozess beeinträchtigt, in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass extrinsische Faktoren (in diesem Fall die topische Bereitstellung von Keratinozyten) durchaus in der Lage sind, fehlregulierte Prozesse im Verlauf diabetischer Wundheilung durch die Initiation anderer, wundheilungsrelevanter Fakto-

ren zu kompensieren. In diesem Zusammenhang konnte eine differentielle Immunzelllokalisierung nach BAWD-Behandlung festgestellt werden, obwohl die absolute Anzahl der wundheilungsrelevanten, immunologischen Zellen unverändert blieb (Abbildung 3.13). Die BAWD-vermittelte Stimulation der Wundrandkeratinozyten zur Migration und Proliferation kann eine Erklärung auf diese differentielle Zellverteilung liefern. Im Zuge der zahlenmäßigen Erhöhung aktivierter Keratinozyten und der Annäherung der Wundränder kann eine veränderte, positionsspezifische Sekretion von Wachstumsfaktoren und Chemokinen nicht ausgeschlossen werden. Neben der Bereitstellung von TGF- α , EGF und HB-EGF [Cribbs et al., 2002; Werner et al., 2007] sind u.a. Keratinozyten maßgeblich an der Produktion der CCL2- und CXCL2-Chemokine beteiligt [Gibran et al., 1997, Jackman et al., 2000; Wetzler et al., 2000; Tokura et al., 2008]. Folglich war wahrscheinlich die Konzentration der chemotaktischen Mediatoren CXCL2 und CCL2 verschieden und resultierte nach einer Laserskin-Applikation in einer diffusen Verteilung von PMN/M Φ im Wundareal. BAWD-behandelte Wunden zeigten hingegen eine kontrollierte Verteilung, die möglicherweise auf eine differenzierte Sekretion der Chemokine zurückzuführen ist. Der positive Heilungserfolg nach BAWD-Applikation resultiert demnach weniger aufgrund der direkten modulierenden Wirkung auf die Expression pro-inflammatorischen und chemotaktischer Mediatoren, sondern mehr durch den verbesserten Wundschluss. Die anzunehmende Sekretion BAWD-basierter wundrelevanter Faktoren und veränderte Chemokin-Gradienten können ebenfalls zur verbesserten Wundsituation diabetischer Tiere beitragen.

Die Induktion wundheilungs-relevanter Faktoren (siehe Tabelle 3.1) und die Stimulation des Wundgewebes zur Produktion von EZM-Bestandteilen können zudem die differenzierte Infiltration der Immunzellen begründen. So wurde in Folge einer BAWD-Applikation interessanterweise eine deutliche Induktion von Wachstumsfaktoren wie EGF, sowie eine leichte Erhöhung von HB-EGF, TGF- α und FGF2 beobachtet. Die Induktion dieser Faktoren steht in klarem Zusammenhang zu der Aktivierung von Keratinozyten und Fibroblasten [Schultz et al., 1991; Werner und Grose, 2003, Werner et al., 2007]. Diese Faktoren nehmen für den erfolgreichen Ausgang im Wundheilungsverlauf eine wesentliche Rolle ein [Kurita et al., 1992; Sasaki et al., 1992; Ortega et al., 1998; Shirakita et al., 2005; Sogabe et al., 2006]. Ergänzend dazu wurde für iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) nach BAWD-Anwendung eine deutliche Induktion beobachtet (Anhang 1.2). Da iNOS in zahlreiche Prozesse akuter und chronischer Wundheilung

involviert ist [Wetzler et al., 2000a; Frank et al., 2002], wäre in weiteren Versuchen der interessante Befund der BAWD-induzierten iNOS-Expression zu überprüfen.

4.2.2 Heilung aufgrund der BAWD-vermittelten Differenzierung regenerativer M2-ähnlicher Makrophagen?

Bemerkenswert ist, dass nicht abschließend geklärt wurde, ob die unkontrollierte, persistierende Immunantwort als Ursache oder in Folge der Heilungsstörung bewertet werden muss [Wetzler et al., 2000]. In diesem Zusammenhang wird die Rolle von Neutrophilen in der Wundheilung durch einige Studien in Frage gestellt [Simpson und Ross, 1972; Dovi et al., 2003, Martin et al., 2003]. Eine grundlegendere Bedeutung für den erfolgreichen Ausgang kutaner Wundheilung haben M Φ [Leibovich und Ross, 1975; Goren et al., 2009]. Sie nehmen im Übergang von der Entzündungs- zur Reparaturphase eine zentrale Rolle ein. Allerdings stehen M Φ in der Diskussion, auch maßgeblich an der Pathophysiologie chronischer Wunden beteiligt zu sein [Loots et al., 1998; Falanga, 2005; Goren et al., 2007].

In einer Arbeit von Goren et al. (2003) wurde durch eine systemische Behandlung diabetischer *ob/ob*-Tiere mit Leptin die Anzahl an Neutrophilen im Wundgewebe deutlich reduziert. Dazu war die Expression von pro-entzündlichen Zytokinen herabgesetzt. Interessanterweise wurde trotz der Leptin-vermittelten Blutzucker- und Gewichtssenkung der Anteil an M Φ nicht verändert. Die systemische Behandlung mit Leptin bewirkte zudem eine Abnahme der COX-2-Expression, so dass möglicherweise eine Differenzierung zu regenerativen M Φ (M2-ähnlich) stattgefunden hat. Jedoch sind die Phagozytoseaktivität und Zytokinausschüttung von M Φ durch Leptin gesteigert [La Cava, 2004]. Zudem wird die Differenzierung von T-Helferzellen durch Leptin *in vitro* in Richtung Th-1-Zellen begünstigt [Lord et al., 1998]. In *ob/ob*-Mäusen ist die Funktion der T-Lymphozyten herabgesetzt aufgrund dessen eine verminderte Zytokinproduktion und eine erhöhte Apoptose der intestinalen Lymphozytenpopulation resultiert [Siegmond et al., 2002; Siegmond et al., 2004]. In ihrem Modell der induzierten Kolitis (durch Natriumdextransulfat [DSS] oder Trinitrobenzylsulfonsäure [TNBS]) konnten Siegmond et al., (2002) in Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäusen einen Schutzeffekt beobachten. Erst durch die Gabe von Leptin wurde eine Angleichung der Zytokinproduktion herbeigeführt und eine der Wildtypmäusen entsprechende Apoptoserate der T-Lymphozyten erreicht. Diese widersprüchlichen Beobachtungen verdeutlichen die Komplexität biolo-

gischer Systeme, in denen ein anderer Ausgang der Behandlung in unterschiedlichen Systemen durch verschiedene Regelkreise der Immunantwort resultiert.

Es wird angenommen, dass im Wundheilungsprozess $M\Phi$ verschiedene Funktionen in den unterschiedlichen Heilungsphasen einnehmen. Der Phänotyp wechselt von einem inflammatorischen ($M1$ -ähnlich) hin zu einem immunoregulatorischen bzw. gewebesaufbauenden $M\Phi$ ($M2$ -ähnlich) [Lucas et al., 2010, Daley et al., 2010; Rodero und Khosrotehrani, 2010; Brancato und Albina, 2011]. So sind in der frühen Phase der Wundverletzung inflammatorische Monozyten-Vorläufer durch die Expression von Ly-6C (lymphocyte antigen)⁺, $CCR2^+$ und $CX3CR3^-$ (Fractalkine-Rezeptor) gekennzeichnet. Im weiteren Heilungsverlauf prädominieren $M\Phi$ aus Ly-6C⁻, $CCR2^-$ und $CX3CR3^+$ -Monozyten-Vorläufer und sezernieren Faktoren wie TGF- β 1 und VEGF, die Fibroblasten stimulieren und Angiogenese fördern [Ishida et al., 2008; Brancato und Albina, 2011; Goren et al., 2014]. Obwohl die mRNA- und Western Blot-Analysen in der vorliegenden Arbeit eine zahlenmäßig unveränderte $M\Phi$ -Infiltration aufzeigten (Abbildung 3.13), kann der geweberegenerative Effekt einer BAWD-Behandlung diabetischer Wunden aus *db/db*-Tieren möglicherweise auf die Polarisierung immigrierter $M\Phi$ zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang konnte über die Whole-Genom-Genexpressionsanalyse die Induktion einer Vielzahl an Genen beobachtet werden, deren Funktion mit der Aktivitätsänderung inflammatorischer $M\Phi$ ($M1$) hin zu regenerativen $M\Phi$ ($M2$ -ähnlich) im Wundgewebe eng-assoziiert ist (Tabelle 3.3) [Murray et al., 2014]. Darüber hinaus sind andere Immunzellen in Prozesse der kutanen Wundheilung involviert. So prädominieren insbesondere T-Zellen des adaptiven Immunsystems in der Phase der Gewboremodellierung [Efron et al., 1990; Eming et al., 2007]. T-Zellen werden durch die $M\Phi$ -vermittelte Sekretion des IFN- γ -induzierten Proteins-10 (*IFN- γ inducible protein*, IP-10) und CXCL9 (*Mig, monokine induced by IFN- γ*) rekrutiert [Baggiolini, 1998]. Es wird angenommen, dass die Th1- und Th2-T-Zellpopulation differentiell das Wundmikromilieu durch eine distinkte Zytokinsekretion regulieren [Azouz et al., 2004]. Dabei sezernieren Th1-T-Zellen IFN- γ , IL-2 und TNF- α , während Th2-T-Zellen IL-4, IL-5 und IL-10 freisetzen [Eming et al., 2007]. Interessanterweise interagieren CD40-Ligand-exprimierende T-Zellen direkt mit CD40-exprimierenden Keratinozyten, Fibroblasten, Blutplättchen und $M\Phi$ und beeinflussen deren Expressionsprofil inflammatorischer Mediatoren [Yellin et al., 1995; Kaufman et al., 2001]. Es

kann daher spekuliert werden, ob die BAWD-vermittelte Induktion des Granulationsgewebes möglicherweise auf die differentielle Aktivität der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen zurückzuführen ist. Weitere Versuche zur Analyse sind zur Klärung notwendig. Zudem sollte ein BAWD-modulierter MΦ-Phänotypwechsel in Betracht gezogen werden, der durch weitere mRNA- und Proteinanalysen näher definiert werden sollte.

4.2.3 BAWD-vermittelte Induktion des anti-inflammatorischen TNFAIP-6 Proteins

Entzündungszellen nutzen Mediatoren zur Kontrolle der Inflammation [Martin, 1997; Werner und Grose, 2003]. Als Antwort auf die Aktivität von TNF- α und IL-1 wird TNFAIP-6 (TNF- α -induziertes Protein 6; TSG-6) in Epithelzellen, Fibroblasten und mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*) exprimiert [Milner und Day, 2003]. In gesundem Gewebe und unstimulierten Zellen ist die TNFAIP-6-Expression nicht konstitutiv, sondern wird erst als Antwort auf pro-inflammatorische Mediatoren induziert [Milner und Day, 2003]. In einem Ratten-Tiermodell zur Untersuchung der Wundheilung am Zahnfleisch wurde nach Gabe rekombinanten TNFAIP-6 eine verringerte Inflammation und reduzierte Immunzellinfiltration beobachtet [Beltran et al., 2015]. Da die kutane Wundheilung durch eine inflammatorische Phase charakterisiert ist und die Interaktion von Keratinozyten und Fibroblasten als TNFAIP-6-sezernierende Zellen einen wichtigen Bestandteil der Heilung darstellen, kam die Frage auf, ob eine Beteiligung von TNFAIP-6 im Wundheilungsprozess der Haut identifiziert werden konnte. In der Tat wurde mittels mRNA- und immunhistochemischer Analysen TNFAIP-6 im kutanen Heilungsprozess nachgewiesen (Abbildung 3.15). Dabei war die Expression in der akuten Wundheilung klar in zeitlicher Korrelation zur initialen Entzündungsreaktion zu setzen (starke Induktion von TNF- α und IL-1 in der Initialphase der Entzündung). Daher ist TNFAIP-6 aufgrund seiner anti-inflammatorischen Eigenschaft mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Dämpfung und Regulation der initialen Inflammation beteiligt [Milner und Day, 2006; Beltran et al., 2015].

Neben seiner immunmodulatorischen Eigenschaft interagiert TNFAIP-6 mit Glykosaminoglykanen der EZM wie Hyaluronsäure, Chondroitin und Aggrecan. Das Protein kann zudem als ein wichtiger Faktor in der Modulation von Wundproteasen nach einer

Verletzung in der Remodellierungsphase betrachtet werden [Wisniewski et al., 1994; Bardos et al., 2001; Szanto et al., 2004].

Nach BAWD-Behandlung wurde in der Wundheilung diabetischer Tiere eine starke Induktion des TNFAIP-6 auf mRNA-Ebene festgestellt und wurde immunhistochemisch im neugebildeten Granulationsgewebe lokalisiert (Abbildung 3.15). Aufgrund der immunmodulatorischen Eigenschaft des TNFAIP-6 könnte die lokale, BAWD-induzierte Expression von dem Protein den Übergang in die nächste Heilungsphase trotz der unveränderten pro-inflammatorischen und hyperglykämischen Wundsituation begründen. Die TNFAIP-6-vermittelte Modulation von Wundproteasen könnte zudem eine Erklärung dafür liefern, warum in der diabetisch-gestörten, stark proteolytischen Wundsituation ein Neuaufbau von Gewebe stattgefunden hat. Zur weiteren Klärung einer möglichen Modulation der Wundproteasen wäre es sinnvoll, in BAWD-behandelten Wunden die Expression von MMPs und ihrer TIMPs zu bestimmen.

Neben den bereits erwähnten Quellen des anti-inflammatorischen TNFAIP-6 wurden mesenchymale Stammzellen (MSCs) als potentielle Quelle der Sekretion beschrieben [Qi et al., 2014]. Die Funktion der MSCs in der Wundheilung und deren Rolle nach BAWD werden im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

4.3 MSCs in der murinen Heilung normal heilender und diabetisch-gestörter Wunden

Gegenwärtig besteht großes Interesse daran, die heilungsförderlichen anti-inflammatorischen und gewebesaufbauenden Effekte mesenchymaler Stammzellen (MSCs) therapeutisch zu nutzen [Prockop und Olson, 2007]. In Tabelle 4.1 ist die Anwendung von MSCs in der Behandlung von akuten und chronischen Verletzungen in unterschiedlichen experimentellen Tiermodellen exemplarisch dargestellt.

Tabelle 4.1: Anwendung von MSCs bei akuten und chronischen Verletzungen

Organ	Untersuchungsmodell	Ergebnis	Referenz
Lunge	Ventilator-induzierte Lungenschädigung	↑ Lungenfunktion, ↓ Inflammation	Curley et al., 2012
	Exzisionalwunde in diabetischen db/db-Mäusen	↑ Wundheilung	Falanga et al., 2007
Haut	Exzisionalwunde in BALB/c- und diabetischen db/db-Mäusen	↑ Re-Epithelialisierung, ↑ Vaskularisierung	Wu et al., 2007
	Inzisionalwunde in STZ-induzierten diabetischen Ratten	↑ Kollagendisposition ↑ Wundreißfestigkeit	Kwon et al., 2008
	Exzisionalwunde in C57Bl/6-Tieren	↑ Wundheilung ↓ Gewebsfibrose	Qi et al., 2014
Herz	Akuter Myokardinfarkt in Ratten	↑ Ventrikulärfunktion, ↓ Infarktgröße	Beitnes et al., 2012
	STZ-induzierte diabetische Ratten	↑ Herzfunktion,	Monnerat-Cahli et al., 2014
	Akuter Myokardinfarkt in Mäusen	↓ Infarktgröße ↑ Herzfunktion	Lee et al., 2009
Nieren	Glomerulonephritis	↓ Inflammation ↓ Matrixakkumulation	Tsuda et al., 2010
Leber	High-Fett-Diät und STZ-induzierte diabetische Lebererkrankung	↓ Entzündung ↑ Proliferation der Hepatozyten	Nagaishi et al., 2014

Die Bedeutung der MSC in der Behandlung akuter und chronischer Verletzungen wird durch die unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten verdeutlicht. MSCs sind in der Lage, Heilung unterschiedlicher Gewebe zu fördern [Wu et al., 2007; Beitnes et al., 2012; Nagaishi et al., 2014]. Nach Verletzung der Haut entsteht in dem Wundbereich aufgrund fehlender Sauerstoffversorgung über das Blutgefäßsystem eine ischämische Situation. Eine vergleichbare Situation ist am Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt zu sehen. Umso interessanter ist die Beobachtung, dass nach Injektion von MSCs eine Reduktion der Infarktgröße und eine verbesserte Herzfunktion festzustellen war [Lee et al., 2009]. Dabei wurde die Verbesserung der Herzfunktion zu der MSC-vermittelten Sekretion von TNFAIP-6 korreliert. In Exzisionalwunden normal heilender C57BL/6-Tiere wurde durch eine intradermale Injektion von humanen Knochenmarkentstammenden MSCs (*human bone marrow [BM]-derived MSC*) eine deutlich verbesserte Wundheilung beobachtet [Qi et al., 2014]. Die Sekretion des antiinflammatorischen TNFAIP-6 durch die injizierten MSCs wurde mit der verbesserten Wundheilung in Verbindung gebracht.

In der eigenen Arbeit wurde eine Induktion von TNFAIP-6 in den Wunden diabetischer Tiere nach BAWD-Applikation auf mRNA- und Protein-Ebene beobachtet. Die Vermutung liegt nahe, dass eine BAWD-vermittelte Aktivierung und Akkumulation von MSCs aufgrund der erhöhten TNFAIP-6-Expression im Wundgewebe vorlag. MSCs werden in das verletzte Wundgewebe rekrutiert [Sasaki et al., 2008]. Die Charakterisierung und Identifizierung von MSCs auf molekularer Ebene erfolgt über Oberflächenmarker wie Sca1, Integrin-beta 1 (CD29) und dem Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 [Baddoo et al., 2003]. Die erhöhten mRNA-Expressionen dieser Marker nach BAWD-Behandlung deuten auf eine Akkumulation von MSCs im diabetischen Wundgewebe hin. Scheinbar wird durch die BAWD-Anwendung eine Wundsituation geschaffen, die der normal heilenden Wunden gesunder Tiere ähnelt. In Wunden normal heilender Tiere war eine temporäre Expression der MSC-Marker im Wundheilungsverlauf zu beobachten. Interessanterweise war eine starke Akkumulation der MSCs zum Zeitpunkt der Granulationsphase (beginnend ab Tag 3) festzustellen. Um abschließend die BAWD-vermittelte Akkumulation von MSCs in der Wunde diabetischer Tiere zu verifizieren, sollte eine FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenmarker des diabetischen Wundgewebes durchgeführt werden. Aufgrund der tierexperimentellen Versuchsanordnung war dies in dieser Arbeit nicht möglich.

Dennoch sind die Beobachtungen der MSC-Akkumulation im Wundheilungsverlauf aus der Analyse der Wunden normal heilender Tiere möglicherweise auf die Wundsituation diabetischer Tiere übertragbar. Dabei werden aktuell für die kutane Wundheilung zwei heilungsförderliche Funktionen von MSCs diskutiert: die parakrine Sekretion wichtiger Wundmediatoren und die Differenzierung in heilungsrelevante Zellen [Sasaki et al., 2008; Hocking und Gibran, 2010]. Die therapeutischen, heilungsfördernden Effekte durch MSCs werden jedoch hauptsächlich ihrer sekretorischen Funktion zugesprochen [Chen et al., 2008; Shohara et al., 2012].

Chen et al. (2008) haben in ihrer Studie zur Analyse der MSCs und MSC-konditionalen Kultumediums die Expression wichtiger Zytokine und Chemokine (CCL3, CCL4 und CXCL12) und Wachstumsfaktoren (VEGF α , IGF-1, EGF) detektiert. Darüber hinaus zeigte MSC-konditioniertes Zellkulturmedium ein verstärktes Migrationspotential auf M Φ , Keratinozyten und Endothelzellen und verstärkte Proliferation in Keratinozyten und Endothelzellen *in vitro* [Chen et al., 2008]. In Exzisionalwunden normal heilender Balb/C-Tiere war nach Applikation mit MSC-konditionierten Medium eine verbesserte Wundheilung zu beobachten, dazu konnte eine Akkumulation von M Φ und Endothelvorläuferzellen festgestellt werden [Chen et al., 2008]. Es ist daher nicht verwunderlich, eine starke Akkumulation der MSCs in der hoch-zellulären Granulationsphase vorzufinden. Aufgrund der Tatsache, dass diese Faktoren und die Prozesse der Migration und Proliferation wichtige Funktionen und Grundlagen adäquat-heilender Wunden darstellen, sollte die Bedeutung dieser Zellen auf kutane Wundheilungsprozesse weitergehend evaluiert und eine physiologische Relevanz verifiziert werden. Dazu würden sich *in vivo*-Depletionsversuche eignen, in denen konditional z.B. über einen induzierbaren Diphtheria-Toxin-Rezeptor MSCs in Apoptose geführt werden könnten. Zudem wäre es interessant, den Ursprung dieser Stammzellen zu identifizieren, um gezielt im „Stammzellreservoir“ die Rekrutierung der heilungsförderlichen Zellen ins verletzte Gewebe zu induzieren.

4.4 Muskelaufbau und eine mögliche Funktion in der kutanen Wundheilung

In der vorliegenden Arbeit ist ein bislang unbekannter Regelkreis kutaner Wundheilung in der Maus entdeckt worden, in dem die Induktion und Ausbildung kontraktile

ren einen Beitrag zum erfolgreichen Heilungsverlauf bereitstellen kann. Es kann spekuliert werden, ob die eingewanderten MSCs möglicherweise nicht nur aus dem Knochenmark entstammen, sondern auch aus anderen Geweben rekrutiert werden [da Silva Meirelles et al., 2008]. Dazu ist anzumerken, dass die Population der MSCs sehr heterogen ist und im adulten Organismus aus Knochenmark, peripherem Blut, Fettgewebe und Muskeln isoliert werden kann [Buján et al., 2006; da Silva Meirelles et al., 2008; Hass et al., 2011].

Eine Untergruppe der MSCs umfasst die Muskelstammzellen. Sie werden weiterhin in Satellitenzellen und *muscle-derived stem cells* (MDSCs, Muskel-abhängige Stammzellen) unterteilt. Satellitenzellen sind auf die Entwicklung muskulärer Gewebe beschränkt und MDSCs zeigen ein Differenzierungspotential über die myogene und mesenchymale Ebene hinaus [Buján et al., 2006]. Sie werden als Vorläufer der Satellitenzellen angesehen [Jankowski et al., 2002; Cao et al., 2003]. Interessanterweise scheint der Grad der Verletzung das Potential der Stammzellaktivierung zu bestimmen. So werden Vorläuferzellen für homöostatische Prozesse bereitgehalten, während die „leistungsstärkeren“ Stammzellen erst nach schwerwiegenden Verletzungen aktiviert werden [Jankowski et al., 2002]. Nach einer Muskelverletzung proliferieren diese Stammzellen, differenzieren zu Myoblasten und fusionieren, um neue Muskelfasern zu bilden [Chargé und Rudnicki, 2004]. *Myogenic regulatory factors* (MRFs) wie MyoD1, Myf5 und MRF4 induzieren bzw. regulieren die Differenzierung der Myoblasten [Füchtbauer und Westphal, 1992; Cooper et al., 1999].

Munz et al. (1999) zeigten die differentielle Expression des muskelspezifischen Transkriptionsfaktors skNAC (*skeletal muscle nascent polypeptide-associated complex*) in der kutanen Wundheilung der Maus. Dabei war der Transkriptionsfaktor innerhalb von 12 h nach Verletzung stark induziert und durch *in situ*-Hybridisierung an den Wundrändern des *panniculus carnosus* zu identifizieren [Munz et al., 1999]. Der Faktor reguliert die Fusion der Myoblasten und ist ein wesentlicher Bestandteil in der Muskeldifferenzierung [Yotov und St-Arnaud, 1996]. Es wurde spekuliert, dass skNAC möglicherweise Satellitenzellen aktiviert [Munz et al., 1999].

Interessanterweise war in der vorliegenden Arbeit das Expressionsmaximum der muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren MyoD1 und MRF4 in der normal heilenden

Wunde an Tag 1 nach Verletzung zu beobachten (Abbildung 3.21) und somit in Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Beobachtungen [Munz et al., 1999; Chargé und Rudnicki, 2004]. Tatsächlich wird eine starke Expression von MyoD1 innerhalb von 12 h nach Stammzellaktivierung *in vivo* beobachtet und ist noch vor der Expression bestimmter Zellteilungsmarker wie PCNA (*proliferative cell antigen nuclear*) detektierbar [Chargé und Rudnicki, 2004].

Die Expression von MRFs in der Wunde normal heilender Tiere deutet auf die Initiation muskelspezifischer Regelkreise hin. Dabei scheint die Verletzung des *panniculus carnosus* eine wichtige Rolle durch die Expression des skNAC in der Initiation muskulärer Differenzierung und möglicherweise in der Aktivierung der Stammzellen einzunehmen [Munz et al., 1999]. Im weiteren Wundheilungsverlauf wurde eine transiente Ausbildung von kontraktile Strukturen durch mRNA- und Proteinanalysen entdeckt (Abbildung 3.21 und 3.22). In diesem Zusammenhang korrelierte die Expression von Muskelstruktur-Genen des Troponin-Komplexes mit der Expression fibrillärer Strukturproteine wie Myh7. Die höchste Expression war in der Granulationsphase an Tag 5 zu detektieren. Die transiente Expression muskelspezifischer microRNA unterstützt die Hypothese der transienten Ausbildung kontraktile Strukturen (Abbildung 3.22, E). Diese kurzen, hoch konservierten, nichtcodierenden RNAs regulieren spezifisch die Genfunktion auf post-transkriptioneller Ebene [He und Hannon, 2004]. Dabei reguliert miRNA-133 die Myoblastenproliferation, während miRNA-206 in Satellitenzellen induziert ist und die Differenzierung in Muskelzellen fördert [Chen et al., 2006; Liu et al., 2012]. Eine abschließende histologische Untersuchung der Wunden verdeutlichte möglicherweise die Ausbildung einer kontraktile Zone zwischen den Wundrandkeratinozyten und dem verletzten *panniculus carnosus* (Abbildung 3.22, A). Diese kontraktile Elemente scheinen nach Auswertung der Expression von α SMA (*alpha smooth muscle actin*) in Verbindung zu stehen (Abbildung 3.22, B). Möglicherweise stellt die Formation kontraktile Elemente einen zusätzlichen Mechanismus in der kutanen Wundheilung dar, neben der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten eine ergänzende kontraktile Komponente für einen beschleunigten Wundverschluss bereitzustellen [Hinz et al., 2007].

Die Expression von α SMA war in der Wundheilung diabetischer *ob/ob*-Tiere auf mRNA- und Protein-Ebene nicht zu beobachten [Seitz et al., 2010]. Die anhaltende Ent-

zündung in Kombination mit dem diabetischen Phänotyp schließt einen Übergang in die nächsten Heilungsphasen aus [Wetzler et al., 2000; Seitz et al., 2010], so dass kein effektiver Wundverschluss erreicht werden kann. Interessanterweise induzierte BAWD den Aufbau funktionalen Gewebes (Abbildung 3.16). In Verbindung dazu war eine starke Expression muskelspezifischer Gene zu beobachten (Abbildung 3.17). Ähnlich wie in der Wunde normal heilender Tiere, war die Expression von MRFs zu Beginn der Wundheilung stark induziert (Abbildung 3.19).

Vergleicht man das Expressionsprofil in der diabetischen und normal heilenden Wunde, scheint eine frühe Induktion der Transkriptionsfaktoren notwendig, um wundheilungsfördernde Prozesse zu initiieren (Abbildung 3.19, Abbildung 3.21). Nach BAWD-Anwendung wurde im weiteren Heilungsverlauf auf die erhöhte Expression von muskelspezifischen microRNAs hingewiesen (Abbildung 3.20, D), sowie die verstärkte Expression von Muskelstruktur-Genen des Troponin-Komplexes und fibrillärer Proteine wie Myh7 beobachtet (Abbildung 3.19, Abbildung 3.20). Allerdings kann aufgrund fehlender Langzeitkinetik der transiente Charakter der Expression muskulärer Strukturen für die diabetische Wunde nicht zweifelsfrei geklärt werden. In dieser Hinsicht wären längere Versuchszeitpunkte notwendig, um das Expressionsprofil der Muskelgene zu vervollständigen. Nichtsdestotrotz scheint es, dass die Exposition mit lebenden Keratinozyten in der Lage ist, den Aufbau kontraktiler Strukturen in der diabetischen Wunde einzuleiten. Möglicherweise kann BAWD durch die Induktion anderer Mechanismen die fehlregulierten Prozesse der Entzündungsreaktion in diabetischer Wundheilung für eine erfolgreiche Heilung auf diese Weise kompensieren.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Keratinozyten (KCBI als Bestandteil des BAWD und HaCaT-Zellen) auf eine mögliche Differenzierung von MSCs hinzu Muskel-ähnlicher Zellen/ Strukturen untersucht (Abbildung 3.35, Abbildung 3.36). In diesem experimentellen Ansatz ist es aber leider nicht gelungen, mögliche Regelkreise bzw. die potentielle Einflussnahme von Keratinozyten auf das Differenzierungsschicksal der MSCs *in vitro* tiefergehend aufzuklären. Deswegen lässt sich auch hier nur spekulieren, inwieweit eine direkte Beteiligung der Keratinozyten auf die Differenzierung der MSCs zu heilungsfördernden Zellen eine tragende Rolle einnimmt. Insofern wäre es in weiteren Experimenten notwendig, das Sekretionsprofil der stimulierten MSCs aufzuklären, um den möglicherweise bedeutenderen Anteil ihrer heilungsrelevanten Funk-

tion, nämlich die Sekretion parakriner Wundmediatoren, näher zu untersuchen [Sasaki et al., 2008; Hocking und Gibran, 2010].

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die topische Anwendung lebender, humaner Keratinozyten in der Lage ist, die gestörte diabetische Wundheilung in der *db/db*-Maus zu verbessern. Eine BAWD-Behandlung konnte die Immunantwort nicht eingrenzen, allerdings scheint eine BAWD-vermittelte differentielle Immunzell-Verteilung für einen Gewebsaufbau verantwortlich zu sein. Zusätzlich wurde eine Interaktion der Keratinozyten mit dem Mauswundgewebe beobachtet. Möglicherweise kann die Überleitung in eine heilende Phase durch die Einwirkung der MSCs und eine damit verbundene lokale Sekretion des anti-entzündlichen TNFAIP-6 zurückzuführen sein. Die Whole-Genom-Sequenzierungsdaten lassen die Spekulation zu, dass eine BAWD-Anwendung möglicherweise eine Polarisierung gewebergenerativer M Φ bewirkt. Aufgrund der positiven Beobachtungen in der kutanen Wundheilung diabetischer Tiere, sollte die Anwendung des von Boehringer Ingelheim entwickelten Keratinozyten-basierten BAWDs auf der humanen, diabetischen Wunde untersucht werden.

V Zusammenfassung

Diabetes-assoziierte Fußulcerationen (*diabetic foot ulcerations*, DFU) repräsentieren eine schwerwiegende klinische Komplikation der Wundheilung. Bislang sind pharmakologische Behandlungsansätze diabetischer Wundheilungsstörung unzureichend und limitiert. Der Erkenntnismangel der zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen gestörter Wundheilung ergänzt die unzufrieden stellende klinische Situation. In den vergangenen Jahren sind vermehrt zelluläre Wundverbände in den klinischen Fokus gerückt. Sie ermöglichen eine individuelle, dynamische Wundbehandlung und haben in den ersten klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit ist ein zellulärer Wundverband der Firma Boehringer Ingelheim genutzt worden, um die Wundheilung in diabetischen *db/db*-Tieren zu analysieren. Der Wundverband (BAWD; *biological active wound dressing*) besteht aus humanen Keratinozyten, die auf einer Hyaluronsäure-haltigen Matrix kultiviert werden.

Nach topischer Anwendung der lebenden Wundaufgabe war eine Interaktion humaner Keratinozyten mit murinem Wundgewebe zu beobachten. Die gestörte diabetische Wundheilung in der *db/db*-Maus war nach BAWD-Behandlung in einem um 30 % verbesserten Wundverschluss und dem Aufbau qualitativ neuen Gewebes deutlich verbessert.

Aufgrund der unverändert hohen Expression von Zyto- und Chemokinen in der frühen und späten Heilungsphase wurde eine Dämpfung der Immunantwort ausgeschlossen. Vielmehr war eine BAWD-vermittelte differenzielle Immunzellverteilung festzuhalten. Zudem zeigten Whole-Genom-Sequenzanalysen eine BAWD-induzierte Expression von Genen auf, die regenerative M2-ähnliche M Φ charakterisieren.

Außerdem scheint die BAWD-Anwendung nach Auswertung immunhistochemischer Daten und über die signifikant erhöhte CD29-, CD44- und Sca1-mRNA-Expression die Rekrutierung heilungsfördernder MSCs zu begünstigen, denen ein potentiell anti-entzündlicher Charakter zugesprochen wird.

In dieser Arbeit konnte zudem ein neuer Regelkreis kutaner Wundheilung beschrieben werden, der auf Basis der Expression muskelspezifischer Faktoren und der transienten Ausbildung kontraktile Elemente in der Wunde normal heilender Tiere beruht, die bis-

lang nicht beschrieben wurden. Interessanterweise induzierte eine BAWD-Anwendung die Expression muskelspezifischer Gene und Proteine in der Wundheilung diabetischer Tiere. Möglicherweise stellt die Ausbildung kontraktiler Elemente neben der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten eine ergänzende Komponente für einen beschleunigten Wundverschluss dar. Diese Befunde eröffnen neue Möglichkeiten zu Verständnis und Therapie diabetischer gestörter Wundheilung im humanen Organismus.

VI Abstract

Diabetes-associated foot ulcerations (DFU) represent a serious clinical complication of wound healing. To date, pharmacological approaches to improve diabetic wound healing disorders still remain poor and limited. The lack of knowledge for underlying molecular and cellular mechanisms of impaired wound healing particularly adds to this unsatisfactory clinical condition. In the last years, the usage of novel cellular wound dressing has grown clinical attention enabling an individual and dynamic wound treatment and showing promising results after the first clinical trials.

Here, human keratinocytes were used as a dynamic approach to deliver a living source of multiple wound-induced mediators for treatment of highly disturbed healing conditions in severely diabetic mice. For this purpose, human keratinocytes were cultured on a hyaluronic acid matrix. Upon injury, mice skin wounds were covered with this biological active wound dressing (BAWD).

It was shown that BAWD interacted with murine wound tissue and strongly improved diabetes-disturbed wound healing in *db/db*-mice. Because of unchanged high expression of cytokines and chemokines even in the late phase of wound healing an attenuation of the inflammatory response was excluded. Interestingly, a BAWD-driven differential immune cell distribution was observed. Whole-genome-sequencing revealed a BAWD-induced expression of genes involved in the polarization of M2-like macrophages. Additionally, recruitment of healing-supporting MSCs appeared to be induced upon BAWD. For MSCs it has been shown that they have an anti-inflammatory property secreting the anti-inflammatory protein TNFAIP-6.

Also, a yet unobserved novel regulatory loop of cutaneous wound healing could have been identified involving a transient expression of muscle-specific genes and induction of contractile components during normal wound healing. Most likely, the contractile components are an additional source for a fast wound closure. Interestingly, after BAWD application an induced expression of muscle specific genes and proteins in wound of diabetic mice was revealed. Thus, application of BAWD showed to be a promising therapeutical approach providing new functional granulation tissue formation under diabetic disturbed conditions.

VII Literaturverzeichnis

Agren MS, Steenfos HH, Dabelsteen S, Hansen JB, Dabelsteen E; 1999. Proliferation and mitogenic response to PDGF-BB of fibroblasts isolated from chronic venous leg ulcers is ulcer-age dependent. *J Invest Dermatol* 112(4):463-469; PMID: 10201530

Alexiadou K, Doupis J; 2012. Management of diabetic foot ulcers. *Diabetes Ther* 3(1):4; PMID: 22529027

Austyn JM, Gordon S; 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11(10):805-815; PMID: 7308288

Azouz A, Razzaque MS, El-Hallak M, Taguchi T; 2004. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. *Med Electron Microsc* 37(3):141-148; PMID: 15449105

Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG; 2003. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 89(6):1235-1249; PMID: 12898521

Badiavas EV, Paquette D, Carson P, Falanga V; 2002. Human chronic wounds treated with bioengineered skin: histologic evidence of host-graft interactions. *J Am Acad Dermatol* 46(4):524-530; PMID: 11907501

Baggiolini M; 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392(6676):565-568; PMID: 9560152

Baggiolini M; 2001. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250(2):91-104; PMID: 11489059

Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Glant TT; 2001. Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis. *Am J Pathol* 159(5):1711-1721; PMID: 11696432

Barrick B, Campbell EJ, Owen CA; 1999. Leukocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathologic processes. *Wound Repair Regen* 7(6):410-422; PMID: 10633000

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M; 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16(5):585-601; PMID: 19128254

Beer HD, Longaker MT, Werner S; 1997. Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. *J Invest Dermatol* 109(2):132-138; PMID: 9242497

Beitnes JO, Oie E, Shandadfar A, Karlsen T, Müller RM, Aakhus S, Reinholt FP, Brinchmann JE; 2012. Intramyocardial injections of human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction modulate scar formation and improve left ventricular function. *Cell Transplant* 21(8):1697-1709; PMID: 22410280

Beltran SR, Svoboda KK, Kerns DG, Sheth A, Prockop DJ; 2015. Anti-inflammatory protein tumor necrosis factor-alpha-stimulated protein 6 (TSG-6) promotes early gingival wound healing: an in vivo study. *J Periodontol* 86(1):62-71; PMID: 25269522

Boulton AJ; 2004. The diabetic foot: from art to science. The 18th Camillo Golgi lecture. *Diabetologia* 47(8):1343-1353; PMID: 15309286

Brancato SK, Albina JE; 2011. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol* 178(1):19-25; PMID: 21224038

Brem H, Tomic-Canic M; 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 117(5):1219-1222; PMID: 17476353

Brown LF, Dubin D, Lavigne L, Logan B, Dvorak HF, van de Water L; 1993. Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing. *Am J Pathol* 142(3):793-801; PMID: 8456940

- Bucalo B, Eaglstein WH, Falanga V; 1993.** Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. *Wound Repair Regen* 1(3):181-186; PMID: 17163887
- Buchberger B, Follmann M, Freyer D, Huppertz H, Ehm A, Wasem J; 2010.** The importance of growth factors for the treatment of chronic wounds in the case of diabetic foot ulcers. *GMS Health Technol Assess* 6; PMID: 21289885
- Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G; 2000.** Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 67(1):97-103; PMID: 10648003
- Buján J, Pascual G, Corrales C, Gómez-Gil V, Garcia-Honduvilla N, Bellón JM; 2006.** Muscle-derived stem cells used to treat skin defects prevent wound contraction and expedite reepithelialization. *Wound Repair Regen* 14(2):216-223; PMID: 16630112
- Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, Cummins J, Epperly M, Qu-Petersen Z, Huard J; 2003.** Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol* 5(7):640-646; PMID: 12792651
- Carmeliet P, Jain RK; 2011.** Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473(7347):298-307; PMID: 21593862
- Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, Botek G; 2005.** Treatment for diabetic foot ulcers. *366(9498):1725-1735*; PMID: 16291067
- Chargé SB, Rudnicki MA; 2004.** Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84(1):209-238; PMID: 14715915
- Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E; 2009.** The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 23(2):245-258; PMID: 19414410
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ; 2006.** The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38(2):228-233; PMID: 16380711
- Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y; 2008.** Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3(4):e1886; PMID: 18382669
- Chen WY, Abatangelo G; 1999.** Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen* 7(2):79-89; PMID: 10231509
- Cheng CY, Martin DE, Leggett CG, Reece MC, Reece AC; 1988.** Fibronectin enhances healing of excised wounds in rats. *Arch Dermatol* 124(2):221-225; PMID: 3341802
- Chmurzynska A; 2006.** The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet* 47(1):39-48; PMID: 16424607
- Christopherson K 2nd, Hromas R; 2001.** Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. *Stem Cells* 19(5):388-396; PMID: 11553847
- Clark RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB; 1982.** Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 79(5):264-269; PMID: 6752288
- Clayton W Jr, Elasy TA; 2009.** A review of the pathophysiology, classification, and treatment of foot ulcers in diabetic patients. *Clin Diabetes* 27(2):52-58
- Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M, Butler-Browne GS, 1999.** In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci* 112(17):2895-2901; PMID: 10444384

VII Literaturverzeichnis

- Cotran RS, Mayadas-Norton T; 1998.** Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathol Biol (Paris)* 46(3):164-170; PMID: 9769911
- Couchman JR; 1993.** Hair follicle proteoglycans. *J Invest Dermatol* 101 (1 Suppl):60S-64S; PMID: 8326155
- Coulombe PA; 2003.** Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol* 121(2):219-230; PMID: 12880412
- Cowland JB, Borregaard N; 1997.** Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 45(1):17-23; PMID: 9339356
- Cribbs RK, Harding PA, Luguette MH, Besner GE; 2002.** Endogenous production of heparin-binding EGF-like growth factor during murine partial-thickness burn wound healing. *J Burn Care Rehabil* 23(2):116-125; PMID: 1182801
- Curley GF, Hayes M, Ansari B, Shaw G, Ryan A, Barry F, O'Brien T, O'Toole D, Laffey JG; 2012.** Mesenchymal stem cells enhance recovery and repair following ventilator-induced lung injury in the rat. *Thorax* 67(6):496-501; PMID: 22106021
- da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB; 2008.** In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26(9):2287-2299; PMID: 18566331
- Daley JM, Reichner JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL Jr, Mastrofrancesco B, Albina JE; 2005.** Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils. *J Immunol* 174(4):2265-2272; PMID: 15699161
- Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, Albina JE; 2010.** The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol* 87(1):59-67; PMID: 20052800
- Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W; 1991.** The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 30(43):10363-10370; PMID: 1931959
- de Imus G, Golomb C, Wilkel C, Tsoukas M, Nowak M, Falanga V; 2001.** Accelerated healing in pyoderma gangrenosum treated with bioengineered skin and concomitant immunosuppression. *J Am Acad Dermatol* 44(1):61-66; PMID: 11148478
- DeLisser HM, Yan HC, Newman PJ, Muller WA, Buck CA, Albelda SM; 1993.** Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 268(21):16037-16046; PMID: 8340425
- Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G; 1995.** Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 146(1):56-66; PMID: 7856739
- Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G; 2005.** Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 13(1):7-12; PMID: 15659031
- Devalaraja RM, Nanney LB, Du J, Qian Q, Yu Y, Devalaraja MN, Richmond A; 2000.** Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol* 115(2):234-244; PMID: 10951241
- Diegelmann RF; 2003.** Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 11(6):490-495; PMID: 14617291
- Dinh TL, Veves A; 2005.** A review of the mechanisms implicated in the pathogenesis of the diabetic foot. *Int J Low Extrem Wounds* 4(3):154-159; PMID: 16100096
- DiPietro LA, Polverini PJ, Rahbe SM, Kovacs EJ; 1995.** Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *Am J Pathol* 146(4):868-875; PMID: 7717454
- DiPietro LA, Polverini PJ; 1993.** Role of macrophage in the positive and negative regulation of wound neovascularization. *Behring Inst Mitt* 92:238-247; PMID: 7504451
- Doupis J, Veves A; 2008.** Classification, diagnosis, and treatment of diabetic foot ulcers. *Wounds* 20(5):117-126; PMID: 25942412

VII Literaturverzeichnis

- Dovi JV, He LK, DiPietro LA; 2003.** Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol* 73(4):448-455; PMID: 12660219
- Eckert RL, Struniolo MT, Broome AM, Ruse M, Rorke EA; 2005.** Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 124(3):481-492; PMID: 15737187
- Eckert RL, Yaffe MB, Crish JF, Murthy S, Rorke EA, Welter JF; 1993.** Involucrin-structure and role in envelope assembly. *J Invest Dermatol* 100(5):613-617; PMID: 8098344
- Edwards JP, Zhang X, Mosser DM; 2009.** The expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor by regulatory macrophages. *J Immunol* 182(4):1929-1939; PMID: 19201846
- Efron JE, Frankel HL, Lazarou SA, Wasserkrug HL, Barbul A; 1990.** Wound healing and T-lymphocytes. *J Surg Res* 48(5):460-463; PMID: 2352421
- Eichner R, Sun TT, Aebi U; 1986.** The role of keratin subfamilies and keratin pair in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J Cell Biol* 102(5):1767-1777; PMID: 2422179
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM; 2007.** Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127(3):514-525; PMID: 17299434
- Emoto H, Tagashira S, Mattei MG, Yamasaki M, Hashimoto G, Katsumata T, Negoro T, Nakatsuka M, Birnbaum D, Coulier F, Itoh N; 1997.** Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. *J Biol Chem* 272(37):23191-23194; PMID: 9287324
- Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bröcker EB, Gillitzer R; 1998.** Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol* 153(6):1849-1860; PMID: 9846975
- Fahey TJ 3rd, Sadaty A, Jones WG 2nd, Barber A, Smoller B, Shires GT; 1991.** Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. *J Surg Res* 50(4):308-313; PMID: 2020184
- Falabella AF, Valencia IC, Eaglstein WH, Schachner LA; 2000.** Tissue-engineered skin (Apligraf) in the healing of patients with epidermolysis bullosa wounds. *Arch Dermatol* 136(10):1225-1230; PMID: 11030768
- Falanga V, Margolis D, Alvarez O, Auletta M, Maggiasco F, Altman M, Jensen J, Sabolinski M, Hardin-Young J; 1998.** Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. Human Skin Equivalent Investigators Group. *Arch Dermatol* 134(3):293-300; PMID: 9521027
- Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, Shroyer D, Carson P; 2007.** Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng* 13(6):1299-1312; PMID: 17518741
- Falanga V, Sabolinski M; 1999.** A bilayered living skin construct (APLIGRAF) accelerates complete closure of hard-to-heal venous ulcers. *Wound Repair Regen* 7(4):201-207; PMID: 10781211
- Falanga V, 2000.** Classifications for wound bed preparation and stimulation of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 8(5):347-352; PMID: 11115147
- Falanga V, 2005.** Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366(9498):1736-1743; PMID: 16291068
- Fleming BD, Mosser DM; 2011.** Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. *Eur J Immunol* 41(9):2498-2502; PMID: 21952805
- Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S; 1995.** Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 270(21):12607-12613; PMID: 7759507

VII Literaturverzeichnis

- Frank S, Madlener M, Werner S; 1996.** Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 271(17):10188-10193; PMID: 8626581
- Frank S, Kämpfer H, Wetzler C, Stallmeyer B; Pfeilschifter J; 2000.** Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES-expression. *Biochem J* 347(Pt1):265-273; PMID: 10727427
- Frank S, Kämpfer H, Wetzler C, Pfeilschifter J; 2002.** Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney Int* 61(3):882-888; PMID: 11849442
- Fuchs E; 1990.** Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* 111 (6Pt2):2807-2814; PMID 2269655
- Füchtbauer EM, Westphal H; 1992.** MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *Dev Dyn* 193(1):34-39; PMID: 1311614
- Gabbiani G, Chaponnier C, Hüttner I; 1978.** Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *J Cell Biol* 76(3):561-568; PMID: 564911
- Georges-Labouesse E, Messaddeq N, Yehia G, Cadalbert L, Dierich A, Le Meur M; 1996.** Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat Genet* 13(3):370-373; PMID:8673141
- Ghazizadeh S, Taichman LB; 2001.** Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J* 20(6):1215-1222; PMID: 11250888
- Gibran NS, Ferguson M, Heimbach DM, Isik FF; 1997.** Monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in the human burn wound. *J Surg Res* 70(1):1-6; PMID: 9228919
- Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS; 1988.** Hemidesmosomes and anchoring fibril collagen appear synchronously during development and wound healing. *Dev Biol* 126(2):253-262; PMID: 3350210
- Gillitzer R, Goebeler M; 2001.** Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 69(4):513-521; PMID: 11310836
- Goliger JA, Paul DL; 1995.** Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol Biol Cell* 6(11):1491-1501; PMID: 8589451
- Gordon S, Martinez FO; 2010.** Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32(5):593-604; PMID: 20510870
- Gordon S; 2003.** Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3(1):23-35; PMID: 12511873
- Goren I, Kämpfer H, Podda M, Pfeilschifter J, Frank S; 2003.** Leptin and wound inflammation in diabetic ob/ob mice: differential regulation of neutrophil and macrophage influx and a potential role for the scab as a sink for inflammatory cells and mediators. *Diabetes* 52(11):2821-2832; PMID: 14578302
- Goren I, Müller E, Schiefelbein D, Christen U, Pfeilschifter J, Mühl H, Frank S; 2007.** Systemic anti-TNFalpha treatment restores diabetes-impaired repair in ob/ob mice by inactivation of macrophages. *J Invest Dermatol* 127(9):2259-2267; PMID: 17460730
- Goren I, Allmann N, Yogev N, Schürmann C, Linke A, Holdener M, Waisman A, Pfeilschifter J, Frank S; 2009.** A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am J Pathol* 175(1):132-147; PMID: 19528348
- Goren I, Pfeilschifter J, Frank S; 2014.** Uptake of neutrophil-derived Ym1 protein distinguishes wound macrophages in the absence of interleukin-4 signaling in murine wound healing. *Am J Pathol* 184(12):3249-3261; PMID: 25307347

VII Literaturverzeichnis

- Gray AJ, Bishop JE, Reeves JT, Mecham RP, Laurent GJ; 1995.** Partially degraded fibrin(ogen) stimulates fibroblast proliferation in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12(6):684-690; PMID: 7766431
- Green KJ, Simpson CL; 2007.** Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* 127(11):2499-2515; PMID: 17934502
- Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R; 1990.** PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol* 136(6):1235-1246; PMID: 2356856
- Greenhalgh DG; 1998.** The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 30(9):1019-1030; PMID: 9785465
- Greiling D, Clark RA; 1997.** Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci* 110(Pt7):861-870; PMID: 9133673
- Grellner W, Georg T, Wilske J; 2000.** Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds. *Forensic Sci Int* 113(1-3):251-264; PMID: 10978634
- Griffiths M, Ojeh N, Livingstone R, Price R, Navsaria H; 2004.** Survival of Apligraf in acute human wounds. *Tissue Eng* 10(7-8):1180-1195; PMID: 15363174
- Grinnell F, Zhu M; 1996.** Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin. *J Invest Dermatol* 106(2):335-341; PMID: 8601737
- Grinnell F; 1994.** Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 124(4):401-404; PMID: 8106541
- Guo L, Degenstein L, Fuchs E; 1996.** Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev* 10(2):165-175; PMID: 8566750
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT; 2008.** Wound repair and regeneration. *Nature* 453(7193):314-321; PMID: 18480812
- Haase R, Kirschning CJ, Sing A, Schröttner P, Fukase K, Kusumoto S, Wagner H, Heesemann J, Ruckdeschel K; 2003.** A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. *J Immunol* 171(8):4294-4303; PMID: 14530354
- Hasegawa H, Naito I, Nakano K, Momota R, Nishida K, Taguchi T, Sado Y, Ninomiya Y, Ohtsuka A; 2007.** The distributions of type IV collagen alpha chains in basement membranes of human epidermis and skin appendages. *Arch Histol Cytol* 70(4):255-265; PMID: 18296826
- Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R; 2011.** Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 9:12; PMID: 21569606
- Hawke TJ, Garry DJ; 2001.** Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91(2):534-551; PMID: 11457764
- He L, Hannon GJ; 2004.** MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5(7):522-531; PMID: 15211354
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G; 2007.** The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170(6):1807-1816; PMID: 17525249
- Hocking AM, Gibran NS; 2010.** Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 316(14):2213-2219; PMID: 20471978
- Holmes C, Stanford WL; 2007.** Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *Stem Cells* 25(6):1339-1347; PMID: 17379763
- Homberg M, Ramms L, Schwarz N, Dreissen G, Leube RE, Merkel R, Hoffmann B, Magin TM; 2015.** Distinct impact of two keratin mutations causing epidermolysis bullosa simplex on keratinocyte adhesion and stiffness. *J Invest Dermatol* (pub ahead of print); PMID:25961909

VII Literaturverzeichnis

- Hsu YC, Li L, Fuchs E; 2014.** Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med* 20(8):847-856; PMID:25100530
- Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S; 1996.** Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* 8(7):548:556; PMID: 8891436
- Ishida Y, Gao JL, Murphy PM; 2008.** Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J Immunol* 180(1):569-579; PMID: 18097059
- Issekutz TB; 1995.** In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, and C5a utilizes LFA-1, Mac-1 and VLA-4. The relative importance of each integrin. *J Immunol* 152(12):6533-6540; PMID: 7759886
- Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ, Cotsarelis G; 2005.** Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* 11(12):1351-1354; PMID: 16288281
- Jackman SH, Yoak MB, Keerthy S, Beaver BL; 2000.** Differential expression of chemokines in a mouse model of wound healing. *Ann Clin Lab Sci* 30(2):201-207; PMID: 10807166
- Jameson J, Havran WL; 2007.** Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* 215:114-122; PMID: 17291283
- Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J; 2002.** Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 9(10):642-647; PMID: 12032710
- Jones PH, Watt FM; 1993.** Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73(4):713-724; PMID: 8500165
- Kämpfer H, Pfeilschifter J, Frank S; 2001.** Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: a comparative study of normal and impaired repair. *Lab Invest* 81(3):361-373; PMID: 11310829
- Kaufman J, Graf BA, Leung EC, Pollock SJ, Koumas L, Reddy SY, Blieden T, Smith TJ, Phipps RP; 2001.** Fibroblasts as sentinel cells: Role of the CDcd40-CDcd40 ligand system in fibroblast activation and lung inflammation and fibrosis. *Chest* 120(1 Suppl):53S-55S; PMID: 11451915
- Koch AE, Poverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM; 1992.** Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992 258(5089):1798-1801; PMID:1281554
- Kurita Y, Tsuboi R, Ueki R, Rifkin DB, Ogawa H; 1992.** Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in wound healing sites of mouse skin. *Arch Dermatol Res* 284(4):193-197; PMID: 1417064
- Kwon DS, Gao X, Liu YB, Dulchavsky DS, Danyluk AL, Bansal M, Chopp M, McIntosh K, Arbab AS, Dulchavsky SA, Gautam SC; 2008.** Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. *Int Wound J* 5(3):453-463; PMID: 18593394
- La Cava A, Matarese G; 2004.** The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 4(5):371-379; PMID: 15122202
- Lauer G, Sollberg S, Cole M, Flamme I, Stürzebecher J, Mann K, Krieg T, Eming SA; 2000.** Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 115(1):12-18; PMID: 10886501
- Lawrence T, Natoli G; 2011.** Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 11(11):750-761; PMID: 22025054
- Lazic T, Falanga V; 2011.** Bioengineered skin constructs and their use in wound healing. *Plast Reconstr Surg* 127 Suppl 1:75S-90S; PMID: 21200276

VII Literaturverzeichnis

- Lechler T, Fuchs E; 2005.** Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437(7056):275-280; PMID: 16094321
- Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ; 2009.** Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6; *Cell Stem Cell* 5(1):54-63; PMID: 19570514
- Leibovich SJ, Ross R; 1975.** The role of macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78(1):71-100; PMID: 1109560
- Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC; 2003.** Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Pathol* 162(1):303-312; PMID: 12507913
- Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, Oates JF 3rd, Berard CW, Rosen H; 1965.** The healing of rat skin wounds. *Ann Surg.* 161:293-308; PMID: 14260029
- Li J, Chen J, Kirsner R; 2007.** Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 25(1):9-18; PMID: 17276196
- Liao H, Zakhaleva J, Chen W; 2009.** Cells and tissue interactions with glycosylated collagen and their relevance to delayed diabetic wound healing. *Biomaterials* 30(9):1689-1696; PMID: 19157537
- Liu N, Williams AH, Maxeiner JM, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN; 2012.** microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *J Clin Invest* 122(6):2054-2065; PMID: 22546853
- Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H; 2002.** Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 45(7):1011-1016; PMID: 12136400
- Loot MA, Kenter SB, Au FL, van Galen WJ, Middelkoop E, Bos JD, Mekkes JR; 2002.** Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur J Cell Biol* 81(3):153-160; PMID: 11998867
- Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E; 1998.** Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 111(5):850-857; PMID: 9804349
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI; 1998.** Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394(6696):897-901; PMID: 9732873
- Low QE, Drugae IA, Duffner LA, Quinn DG, Cook DN, Rollins BJ, Kovacs EJ, DiPietro LA; 2001.** Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol* 159(2):457-463; PMID: 11485904
- Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A, Eming SA; 2010.** Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* 184(7):3964-3977; PMID: 20176743
- Mackenzie IC; 1997.** Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *J Invest Dermatol* 109(3):377-383; PMID: 9284108
- Madlener M, Parks WC, Werner S; 1998.** Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res* 242(1):201-210; PMID: 9665817
- Mansbridge J, Liu K, Patch R, Symons K, Pinney E; 1998.** Three-dimensional fibroblast culture implant for the treatment of diabetic foot ulcers: metabolic activity and therapeutic range. *Tissue Eng* 4(4):403-414; PMID: 9916172

VII Literaturverzeichnis

- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M; 2004.** The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25(12):677-686; PMID: 15530839
- Marston WA, Hanft J, Norwood P, Pollak R; 2003.** The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care* 26(6):1701-1705; PMID: 12766097
- Martin P, D'Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R, McKercher SR; 2003.** Wound healing in the PU.1 null mouse - tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol* 2003 13(13):1122-1128; PMID: 12842011
- Martin P, Leibovich SJ; 2005.** Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 15(11):599-607; PMID: 16202600
- Martin P; 1997.** Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276(5309):75-81; PMID: 9082989
- Mascre G, Dekoninck S, Drogat B, Youssef KK, Broheé S, Sotiropoulou PA, Simons BD, Blanpain C; 2012.** Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature* 489(7415):257-262; PMID: 22940863
- Mast BA, Schultz GS; 1996.** Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 4(4):411-420; PMID: 17309691
- McClain SA, Simon M, Jones E, Nandi A, Gailit JO, Tonnesen MG, Newman D, Clark RA; 1996.** Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of granulation tissue induction. *Am J Pathol* 149(4):1257-1270; PMID: 8863674
- Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF; 2007.** Impaired wound healing. *Clin Dermatol* 25(1):19-25; PMID: 17276197
- Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JE; 2000.** Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *J Immunol* 165(1):435-441; PMID: 10861082
- Milner CM, Day AJ; 2003.** TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *J Cell Sci* 116(10):1863-1873; PMID: 12692188
- Milner CM, Higman VA, Day AJ; 2006.** TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator? *Biochem Soc Trans* 34(3):446-450; PMID: 16709183
- Monnerat-Cahli G, Trentin-Sonoda M, Guerra B, Manso G, Ferreira AC, Silva DL, Coutinho DC, Carneiro-Ramos MS, Rodrigues DC, Cabral-da-Silva MC, Goldenberg RC, Nascimento JH, Campos de Carvalho AC, Medei E; 2014.** Bone marrow mesenchymal stromal cells rescue cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Cardiol* 171(2):199-208; PMID: 24374203
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A; 2001.** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765; PMID: 11244051
- Morbach S, Müller E, Reike H, Risse A, Rümenapf G, Spraul M; 2014.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 122(7):416-424; PMID: 25014093
- Mosser DM, Edwards JP; 2008.** Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12):958-969; PMID: 19029990
- Mosser DM; Zhang X; 2008.** Activation of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* Chapter 14:Unit 14.2; PMID: 19016446
- Munz B, Wiedmann M, Lochmüller H, Werner S; 1999.** Cloning of novel injury-regulated genes. Implications for an important role of the muscle-specific protein skNAC in muscle repair. *J Biol Chem* 274(19):13305-13310; PMID: 10224091

VII Literaturverzeichnis

- Mural et al.; 2002.** A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and human genome. *Science* 296(5573):1661-1671; PMID: 12040188
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hammilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA; 2014.** Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41(1):14-20; PMID: 25035950
- Nagaishi K, Ataka K, Echizen E, Arimura Y, Fujimiya M; 2014.** Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic hepatocyte damage in mice by inhibiting infiltration of bone marrow-derived cells. *Hepatology* 59(5):1816-1829; PMID: 24375439
- Nguyen BP, Ryan MC, Gil SG, Carter WG; 2000.** Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 12(5):554-62; PMID: 10978889
- Novak ML, Koh TJ; 2013.** Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *Am J Pathol* 183(5):1352-1363; PMID: 24091222
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb, M; 1996.** Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271(25):15292-15297; PMID: 8663044
- Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M; Basilico C; 1998.** Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(10):5672-5677; PMID: 9576942
- Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA; 1996.** Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 132(3):381-397; PMID: 8636216
- Panuncialman J, Falanga V; 2009.** The science of wound bed preparation. *Surg Clin North Am* 89(3):611-626; PMID: 19465200
- Papanas N, Maltezos E; 2010.** Benefit-risk assessment of becaplermin in the treatment of diabetic foot ulcers. *Drug Saf* 33(6):455-461; PMID: 20486728
- Peiser L, Gordon S; 2001.** The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* 3(2):149-159; PMID: 11251301
- Peters T, Sindrilaru A, Hinz B, Hinrichs R, Menke A, Al-Azzeh EA, Holzwart K, Oreshkova T, Wang H, Kess D, Walzog B, Sulyok S, Sunderkötter C, Friedrich W, Wlaschek M, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K; 2005.** Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation. *EMBO J* 24(19):3400-3410; PMID: 16148944
- Phillips TJ, Gilchrist BA; 1990.** Cultured epidermal grafts in the treatment of leg ulcers. *Adv Dermatol* 5:33-48; PMID: 2204378
- Pierce GF, Tarpley JE, Tseng J, Bready J, Chang D, Kenney WC, Rudolph R, Robson MC, Vande Berg J, Reid P, Kaufman S, Farrell CL; 1995.** Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *J Clin Invest* 96(3):1336-1350; PMID: 7657809
- Pinhal-Enfield G, Ramanathan M, Hasko G, Vogel SN, Salzman AL, Boons GJ, Leibovich SJ; 2003.** An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *Am J Pathol* 163(2):711-721; PMID: 12875990
- Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P; 2011.** Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146(6):873-887; PMID: 21925313
- Potten CS, Morris RJ; 1988.** Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl* 10:45-62; PMID:3077942

- Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Oyama N, Black MM; 2005.** Collagen XVII/BP180: a collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex. *Clin Exp Dermatol* 30(6):682-687; PMID: 16197389
- Prockop DJ, Olson SD; 2007.** Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood* 109(8):3147-3151; PMID: 17170129
- Qi Y, Jiang D, Sindrilaru A, Stegemann A, Schatz S, Treiber N, Rojewski M, Schrezenmeier H, Vander Beken S, Wlaschek M, Böhm M, Seitz A, Scholz N, Dürselen L, Brinckmann J, Ignatius A, Scharffetter-Kochanek K; 2014.** TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. *J Invest Dermatol* 134(2):526-537; PMID: 23921952
- Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, Vanham G, Noel W, Bogaert P, Boonefaes T, Kindt A, Van den Berg R, Leenen PJ, De Baetselier P, Ghassabeh GH; 2005.** Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 77(3):321-327; PMID: 15591125
- Raes G, Van den Bergh R, De Baeselier P, Ghassabeh GH, Scotton C, Locati M, Mantovani A, Sozzani S; 2005.** Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol* 174(11):6561; PMID: 15905489
- Raja, Sivamani K, Garcia MS, Isseroff RR; 2007.** Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci* 12:2849-2868; PMID: 17485264
- Reigle KL, Di Lullo G, Turner KR, Last JA, Chervoneva I, Birk DE, Funderburgh JL, Elrod E, Germann MW, Surber C, Sanderson RD, San Antonio JD; 2008.** Non-enzymatic glycation of type 1 collagen diminishes collagen-proteoglycan binding and weakens cell adhesion. *J Cell Biochem* 104(5):1684-1698; PMID: 18348167
- Rhodes SJ, Konieczny SF; 1989.** Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev* 3(12B):2050-2061; PMID: 2560751
- Rodero MP, Khosrotehrani K; 2010.** Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol* 3(7):643-653; PMID: 20830235
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H; 2008.** Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 180(4):2581-2587; PMID: 18250469
- Satoh T, Takeuchi O, Vandenberg A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K, Akira S; 2010.** The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophages polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* 11(10):936-944; PMID: 20729857
- Savill J, Fadok V; 2000.** Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407(6805):784-788; PMID: 11048729
- Schultz G, Rotatori DS, Clark W; 1991.** EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. *J Cell Biochem* 45(4):346-352; PMID: 2045428
- Seitz O, Schürmann C, Hermes N, Müller E, Pfeilschifter J, Frank S, Goren I; 2010.** Wound healing in mice with high-fat diet- or ob gene-induced diabetes-obesity syndromes: a comparative study. *Exp Diabetes Res* 2010:476969; PMID: 21318183
- Shirakita Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S, Hashimoto K; 2005.** Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci* 118(11):2363-2370; PMID: 15923649

VII Literaturverzeichnis

- Shohara R, Yamamoto A, Takikawa S, Iwase A, Hibi H, Kikkawa F, Ueda M; 2012.** Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms. *Cytherapy* 14(10):1171-1181; PMID: 22900957
- Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G; 2002.** Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 122(7):2011-2025; PMID: 12055606
- Siegmund B, Sennello JA, Jones-Carson J, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Batra A, Fedke I, Zeitz M, Fantuzzi G; 2004.** Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. *Gut* 53(7):965-972; PMID: 15194645
- Simpson DM, Ross R; 1972.** The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 51(8):2009-2023; PMID: 5054460
- Singer AJ, Clark RA; 1999.** Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341(10):738-746; PMID: 10471461
- Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O; 2006.** Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen* 14(4):457-462; PMID: 16939574
- Steed DL, Attinger C, Brem H, Colaizzi T, Crossland M, Franz M, Harkless L, Johnson A, Moosa H, Robson M, Serena T, Sheehan P, Veves A, Wiersma-Bryant L; 2008.** Guidelines for the prevention of diabetic ulcers. *Wound Repair Regen* 16(2):169-174; PMID: 18318802
- Steed DL; 1995.** Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. Diabetic Ulcer Study Group. *J Vasc Surg* 21(1):71-78; PMID: 7823364
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S; 1992.** Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176(1):287-292; PMID: 1613462
- Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M, Merchant A, Galiano RD, Tomic-Canic M; 2005.** Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am J Pathol* 167(1):59-69; PMID: 15972952
- Stojadinovic O, Pastar I, Vukelic S, Mahoney MG, Brennan D, Krzyzanowska A, Golinko M, Brem H, Tomic-Canic M; 2008.** Deregulation of keratinocyte differentiation and activation: a hallmark of venous ulcers. *J Cell Mol Med* 12(6b):2675-2690; PMID: 18373736
- Sun TT, Eichner R, Nelson WG, Vidrich A, Woodcock-Mitchell J; 1983.** Keratin expression during normal epidermal differentiation. *Curr Probl Dermatol* 11:277-291; PMID: 6197247
- Sun H, Tian J, Xian W, Xie T, Yang X; 2015.** Pentraxin-3 attenuates renal damage in diabetic nephropathy by promoting M2 macrophage differentiation. *Inflammation* 38(5):1739-1747; PMID: 25761429
- Szántó S, Bárdos T, Gál I, Glant TT, Mikecz K; 2004.** Enhanced neutrophil extravasation and rapid progression of proteoglycan-induced arthritis in TSG-6-knockout mice. *Arthritis Rheum* 50(9):3012-3022; PMID: 15457471
- Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, Lassar AB; 1988.** MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* 242(4877):405-411; PMID: 3175662
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S; 2005.** Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 23:901-944; PMID: 15771589
- Tokura Y, Kobayashi M, Kabashima K; 2008.** Epidermal chemokines and modulation by antihistamines, antibiotics and antifungals. *Exp Dermatol* 17(2):81-90; PMID: 18034836
- Tonnesen MG, Feng X, Clark RA; 2000.** Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5(1):40-46; PMID: 11147674

- Tsuda H, Yamahara K, Ishikane S, Otani K, Nakamura A, Sawai K, Ichimaru N, Sada M, Taguchi A, Hosoda H, Tsuji M, Kawachi H, Horio M, Isaka Y, Kangawa K, Takahara S, Ikeda T; 2010.** Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 299(5):F1004-1013; PMID: 20739390
- Usui ML, Mansbridge JN, Carter WG, Fujita M, Olerud JE; 2008.** Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *J Histochem Cytochem* 56(7):687-696; PMID: 18413645
- Vaalamo M, Leivo T, Saarialho-Kere U; 1999.** Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, -4) in normal and aberrant wound healing. *Hum Pathol* 30(7):795-802; PMID 10414498
- van de Rijn M, Heimfeld S, Spangrude GJ, Weissman IL; 1989.** Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(12):4634-4638; PMID: 2660142
- van der Neut R; Krimpenfort P, Calafat J, Niessen CM, Sonnenberg A; 1996.** Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta 4 null mice. *Nat Genet* 13(3):366-369; PMID:8673140
- Vasquez R, Marien BJ, Gram C, Goodwin DG, Menzoian JO, Raffetto JD; 2004.** Proliferative capacity of venous ulcer wound fibroblasts in the presence of platelet-derived growth factor. *Vasc Endovascular Surg* 38(4):355-360; PMID: 15306954
- Veves A, Falanga V, Armstrong DG, Sabolinski ML; 2001.** Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care* 24(2):290-295; PMID: 11213881
- Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A; 2014.** Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1840(8):2452-2459; PMID: 24513306
- Vlassara H; 2005.** Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment. *Ann N Y Acad Sci* 1043:452-460; PMID: 16037266
- Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ; 2014.** Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev* 10(2):131-145; PMID: 24809394
- Watt FM, Green H; 1982.** Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells. *Nature* 295(5848):434-436; PMID: 6895777
- Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, Miller AD; 1989.** Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(14):5434-5438; PMID: 2748593
- Weiss SJ; 1989.** Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320(6):365-376; PMID: 2536474
- Werner S, Grose R; 2003.** Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83(3):835-870; PMID: 12843410
- Werner S, Krieg T, Smola H; 2007.** Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 127(5):998-1008; PMID: 17435785
- Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, Williams LT; 1992.** Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(15):6896-6900; PMID: 1379725
- Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT; 1994.** The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* 266(5186):819-822; PMID: 7973639

VII Literaturverzeichnis

- Wetzler C, Kämpfer H, Pfeilschifter J, Frank S; 2000a.** Keratinocyte-derived chemotactic cytokines: expressional modulation by nitric oxide in vitro and during cutaneous wound repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 274(3):689-696; PMID: 10924337
- Wetzler C, Kämpfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S; 2000.** Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol* 115(2):245-253; PMID: 10951242
- Wieman TJ; 1998.** Clinical efficacy of becaplermin (rhPDGF-BB) gel. Becaplermin Gel Studies Group. *Am J Surg* 176(2A Suppl):74S-79S; PMID: 9777976
- Wisniewski HG, Burgess WH, Oppenheim JD, Vilcek J; 1994.** TSG-6, an arthritis-associated hyaluronan binding protein, forms a stable complex with the serum protein inter-alpha-inhibitor. *Biochemistry* 33(23):7423-7429; PMID: 7516184
- Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE; 2007.** Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 25(10):2648-2659; PMID: 17615264
- Wuest SJ, Crucet M, Gemperle C, Loretz C, Hersberger M; 2012.** Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. *Atherosclerosis* 225(1):121-127; PMID: 22980500
- Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F; 1993.** Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 101(1):64-68; PMID: 8392530
- Xu J, Clark RA; 1996.** Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *J Cell Biol* 132(1-2):239-249; PMID: 8567727
- Yager DR, Zhang LY, Liang HX, Diegelmann RF, Cohen IK; 1996.** Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* 107(5):743-748; PMID: 8875960
- Yellin MJ, Brett J, Baum D, Matsushima A, Szabolcs M, Stern D, Chess L; 1995.** Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *J Exp Med* 182(6):1857-1864; PMID: 7500031
- Yotov WV, St-Arnaud R; 1996.** Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor. *Genes Dev* 10(14):1763-1772; PMID: 8698236
- Yu G, Wu X, Kilroy G, Halvorsen YD, Gimble JM, Floyd ZE; 2011.** Isolation of murine adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol* 702:29-36; PMID: 21082392

VIII Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
BAWD	biologisch aktives Wunddressing
CC	<i>chemokine cc motif</i>
CXC	<i>chemokine cxc motif</i>
DAVID	Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery
DETC	<i>dentic epidermal t cell</i> ; dentritische epidermale T-Zelle
DFS	diabetisches Fußsyndrom
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ESC	<i>epidermal stem cell</i> ; epidermale Stammzelle
EZM	extrazelluläre Matrix
FABP	<i>fatty acid binding protein</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HE	hyperproliferatives Epithel
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFE	interfollikuläre Epidermisbereiche
IFN	Interferon
IGF-1	<i>insulin-like 1 growth factor</i>
IL	Interleukin
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
KGf	<i>keratinocyte growth factor</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDSC	<i>muscle-derived stem cell</i>
M Φ	Makrophagen
MIP-1	<i>macrophage inflammatory protein-1</i>
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MRF	<i>myogenic regulatory factor</i>
MSC	<i>mesenchymal stromal cell</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Sca1	<i>stem cell antigen 1</i>
skNAC	<i>skeletal muscle nascent polypeptide-associated complex</i>
TAC	<i>transient amplifying cell</i> ; transient amplifizierende Zelle

VIII Anhang

TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFAIP	TNF- α induziertes Protein
t-PA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
u-PA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung der Haut	1
Abbildung 1.2:	Epidermale Stratifizierung	2
Abbildung 1.3:	Phasen kutaner Wundheilung	6
Abbildung 2.1:	Schematische Darstellung des Herstellungprozesses	29
Abbildung 2.2:	Mikroskopische Aufnahme einer zu 90% konfluenten KCBI-1-Kultur	30
Abbildung 2.3:	Schematische Darstellung der SBS-(Sequencing by Synthesis)-Methodik	45
Abbildung 3.1:	Schematische Darstellung des BAWD	53
Abbildung 3.2:	Differentielle Genexpression des BAWD nach in vitro-Stimulation mit IL-1 β und TNF- α	55
Abbildung 3.3:	Tierexperimentelle Applikation von BAWD	58
Abbildung 3.4:	Blutzuckerspiegel und Reepithelialisierung	59
Abbildung 3.5:	BAWD-vermittelte Ausbildung von Granulationsgewebe	60
Abbildung 3.6:	Keratinocyten-Interaktion mit murinen Wundmediatoren	61
Abbildung 3.7:	mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine	63
Abbildung 3.8:	Proteinexpression pro-inflammatorischer Zytokine	64
Abbildung 3.9:	mRNA-Expression von CXC-Chemokinen	65
Abbildung 3.10:	mRNA-Expression von CC-Chemokinen	66
Abbildung 3.11:	Proteinexpression von CC- und CXC-Chemokinen	67
Abbildung 3.12:	mRNA-Expression des Chemokinrezeptors CXCR2	68
Abbildung 3.13:	Molekulare Analysen zur Infiltration von PMN und M Φ	69
Abbildung 3.14:	Lokalisierung der PMN- und M Φ -Infiltrate	71
Abbildung 3.15:	Expression des TNF- α -induzierten Proteins (TNFAIP6)	73
Abbildung 3.16:	BAWD-vermittelte Induktion funktionalen Granulationsgewebes	75

VIII Anhang

Abbildung 3.17: Identifizierung differentiell exprimierter Gene nach BAWD-Behandlung	77
Abbildung 3.18: Behandlungsabhängige Verschiebung muskulärer und adipozytärer Entwicklung	79
Abbildung 3.19: Expression von muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren und Struktur-Komplexen nach BAWD-Behandlung	81
Abbildung 3.20: BAWD-vermittelte Expression von Myh7 und regulatorischer muskelspezifischer miRNA	82
Abbildung 3.21: Expression von muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren und Struktur-Komplexen in normaler Wundheilung	84
Abbildung 3.22: Expression von Myh7 und regulatorischer muskelspezifischer miRNA in normaler Wundheilung	86
Abbildung 3.23: Schematische Darstellung des Differenzierungspotentials mesenchymaler Stammzellen	87
Abbildung 3.24: BAWD-vermittelte Akkumulation Sca1-positiver Zellen	89
Abbildung 3.25: mRNA-Expression MSC-assoziiierter Oberflächenmarker	91
Abbildung 3.26: Quantifizierung von MSC über die durchflußzytometrische Analyse der MSC-assoziierten Oberflächenmarker Sca1, CD29 und CD44 und Lokalisierung Sca1-positiver Zellen im Wundgewebe normal heilender Tiere	92
Abbildung 3.27: Immunfluoreszierende histologische Lokalisierung Sca1-, CD29- und CD44-positiver Zellen im Wundgewebe normal heilender Tiere	94
Abbildung 3.28: Immunfluoreszierende histologische Lokalisierung Sca1-, CD29- und CD44-positiver Zellen im Wundgewebe normal heilender Tiere	95
Abbildung 3.29: Mikroskopische Aufnahme der MSC-Zellkultur	96
Abbildung 3.30: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu adipozytären Zellen	98
Abbildung 3.31: Quantifizierung der Oil-Red-O-Färbung	98
Abbildung 3.32: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu osteozytären Zelle	99
Abbildung 3.33: Quantifizierung von MSC über die durchflußzytometrische Analyse der MSC-assoziierten Oberflächenmarker Sca1, CD29 und CD44	100
Abbildung 3.34: Histogramme der MSC-assoziierten Oberflächenmarker Sca1, CD29 und CD44	100
Abbildung 3.35: mRNA-Expression in MSCs nach Stimulation mit KCBI-konditioniertem Medium	102
Abbildung 3.36: mRNA-Expression in MSCs nach Stimulation mit HaCaT-konditioniertem Medium	102

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Zusammenstellung einzelner BAWD	19
Tabelle 2.1: Tabellarische Zusammenfassung der Einzelschritte für die immunhistochemische Färbung	36
Tabelle 3.1: Übersicht differenziell-exprimierter Gene nach 24-stündiger Stimulation	56
Tabelle 3.2: Induktion von Markergenen polarisierter MΦ (M2-ähnlich) nach BAWD	78
Tabelle 3.3: Prozentualer Anteil MSC-assoziiierter Oberflächemarker	101
Tabelle 4.1: Anwendung von MSCs bei akuten und chronischen Verletzungen	115
Tabelle 7.1: Differentielle Genexpression nach 3-stündiger Stimulation des BAWD	142
Tabelle 7.2: Differentielle Genexpression nach 24-stündiger Stimulation des BAWD	143
Tabelle 7.3: Whole-Genom-Sequenzierung nach 10-tägiger Behandlung mit BAWD	145

7.4 Whole-Genom-Sequenzierung

7.4.1 Whole-Genom-Sequenzierung nach *in vitro*-Stimulation des BAWD

Tabelle 7.1: Differentielle Genexpression nach 3-stündiger Stimulation des BAWD

Gen	log ₂ x-fache Änderung	Gen	log ₂ x-fache Änderung	Gen	log ₂ x-fache Änderung
APOL6	1.49	IFNAR2	1.35	PGLYRP2	4.70
ARHGAP31	1.56	IFNGR2	1.29	PLAU	2.07
BCL2A1	2.50	IKBKE	2.09	POU2F2	1.18
BCL3	1.63	IL32	3.69	PTAFR	1.52
BIRC3	3.48	IL36G	3.37	RARRES1	3.14
C1orf68	1.13	IL7R	2.89	RELB	2.63
C1QTNF1	2.38	IL8	3.01	ROS1	1.07
CCDC71L	1.10	INHBA	1.21	SAA1	5.97
CCL20	2.67	IRAK2	3.24	SCNN1D	2.21
CD83	1.62	IRF1	1.75	SERPINA3	2.20
CFB	5.03	IRF2	1.15	SERPINB1	1.78
CSF3	3.29	LRG1	4.08	SLC26A9	1.14
CXCL1	3.50	LRRC4	1.26	SLC44A4	1.90
CXCL10	2.12	LYN	1.82	SMAD3	1.64
CXCL2	1.05	MEFV	2.83	SOCS2	2.02
CXCL5	3.06	MMD	1.29	SOD2	2.62
CYP27B1	1.07	MRGPRX3	2.37	STAT5A	3.00
GBP1	1.24	N4BP3	2.29	SYBU	-1.05
HBEGF	1.78	NAV3	1.24	TGFBR3	-2.30
HCAR3	1.29	NFKB2	1.93	TNFAIP3	2.14
HDAC9	1.31	NFKBIE	2.75	TNFAIP6	1.50
HYAL4	2.35	NFKBIZ	1.50	TNIP1	1.89
ICAM1	2.45	NOD2	1.44	ZC3H12A	1.23
				ZNF319	2.55

VIII Anhang

Tabelle 7.2: Differentielle Genexpression nach 24-stündiger Stimulation des BAWD

Gen	log2 x-fache Änderung	Gen	log2 x-fache Änderung	Gen	log2 x-fache Änderung
ACER1	-1.5683	CYP2W1	-1.7879	ICAM1	2.1531
ACKR2	1.54265	CYP4B1	-2.4848	IGFBP3	1.6538
ADAM19	1.4596	DAPL1	-2.13055	IGFL1	-1.15255
AEBP1	1.3828	DEFB4A	4.0203	IGFL2	-1.5502
AKAP12	1.78355	DPYD	1.13355	IL1A	1.2633
AKR1B1	1.6222	DUSP2	-1.2945	IL1B	1.17535
ALDH1A3	1.41935	ELF3	1.66075	IL1R2	2.12755
ALDH3A1	-1.68195	ENC1	1.1542	IL1RL1	1.605
ANPEP	1.6454	ENDOU	-1.25545	IL20RA	-1.1751
ANTXR2	1.4318	ENKUR	2.25425	IL23A	2.35405
APOBEC3A	3.8953	EPHB6	-2.2096	IL32	3.6151
APOL6	1.17135	ESM1	1.7438	IL36G	3.3917
ARHGEF40	1.20035	ETS1	1.3777	IL7R	1.799
ARNTL2	1.0868	FAM83A	1.1434	IL8	2.4777
ATP1B1	1.3748	FBP1	-1.28905	INHBA	2.34845
B9D1	-1.12115	FERMT1	1.46895	IRAK2	2.64825
BAMBI	1.538	FGF2	2.10305	IRF1	1.2756
BIRC3	2.92735	FLG	-1.76085	ITGA2	1.59955
BMP6	1.6233	FLG2	-1.7503	ITGA5	1.67805
C15orf48	2.64035	FMNL3	1.13795	ITGAV	1.1749
C1QTNF1	2.14005	FN1	2.51685	KLHL5	1.1276
CCDC68	1.20845	FOXP1	-1.41075	KLRG2	-1.58665
CCDC71L	1.40905	G0S2	2.1473	KPNA7	1.42815
CCL20	2.5299	GBP6	-1.3681	KRT1	-1.89035
CD83	1.10015	GK	1.3299	KRT10	-1.6976
CDH16	-1.20415	GLIPR2	1.90665	KRT13	-1.5437
CEACAM6	1.38445	GPR68	1.7041	KRT4	-1.97165
CFB	2.95535	GPRC5A	1.2034	KRT7	1.07515
CH13L2	3.47895	H19	-1.5286	KRT77	-2.4528
CMPK2	1.43105	HAL	-1.31305	KRT9	-2.96225
COL12A1	1.25545	HAS2	2.45975	KYNU	1.68835
COL22A1	1.95525	HBEGF	1.84885	LAMA3	1.53255
CTSS	1.91985	HCAR3	2.05905	LAMB3	1.5177
CXCL1	2.06355	HDAC9	1.9457	LAMC2	1.71115
CXCL3	2.10675	HEPPL1	2.85675	LARP6	1.3066
CXCL5	2.8792	HLA-B	1.28295	LAYN	1.17075
CXCL6	1.51935	HLA-F	1.1941	LBH	1.56665
CYB5R2	1.42675	HSD11B1	1.63755	LCE3A	1.69245
CYP1A1	-1.8299	HSD17B2	1.58735	LCN2	1.59655
LIMD2	1.4199	SAT1	1.321	VNN1	3.1882
LOR	-2.39275	SCG5	1.6147	VNN3	2.49845

VIII Anhang

Fortsetzung:

LPXN	1.54745	SCNN1D	2.61465	WFDC2	1.51655
LRG1	1.6157	SERPINA3	1.6007	WNT9A	1.25295
LY6G6C	-1.3283	SERPINB1	1.5628	XDH	1.63195
LYN	1.658	SERPINB12	-1.30105	ZSWIM4	1.2026
MARCKSL1	1.2583	SERPINB4	1.6141		
MEDAG	1.38735	SERPINB9	1.1959		
MEFV	1.72715	SERPINE1	1.28385		
METTL7A	-1.3847	SLC41A2	1.2268		
MMP1	2.0904	SLC44A4	1.9355		
MMP10	2.4306	SLC6A14	1.39925		
MMP19	1.5841	SLFN5	1.22165		
MMP9	2.85725	SNCG	-1.1254		
MRGPRX3	1.44005	SOCS1	1.8515		
MUC1	1.4655	SOCS2	1.4952		
MYADM	1.3453	SOCS3	1.4354		
MYO10	1.0948	SOD2	2.57515		
MYO16	1.60225	SPHK1	1.7613		
MYRFL	-1.18405	SPOCD1	1.7632		
NAV3	1.5325	SPRR2A	2.728		
NES	1.68805	SPRR2B	2.57685		
NFKB2	1.8501	SPRR2E	1.59295		
NFKBIE	1.41725	SPRR2F	2.7122		
NFKBIZ	1.4519	SPRR2G	1.58		
OSMR	1.1028	STAT5A	1.802		
P2RY6	1.6433	STEAP4	1.5242		
P4HA3	1.3582	STRA6	2.2429		
PCDHGC5	1.37435	SYNPO	1.4119		
PDPN	1.39365	TAGLN3	1.16245		
PDZK1IP1	2.33685	TGFB3	1.36915		
PI3	1.1748	TGM2	1.9054		
PIK3CD	1.42925	THEM5	-1.72375		
PLAU	1.59455	TLR2	1.7964		
PLAUR	1.7269	TM4SF1	1.4198		
PMEPA1	1.29435	TMEM132A	1.89045		
RHCG	1.4639	TMEM158	1.2696		
ROS1	2.09975	TMEM63C	-1.33065		
RTKN2	1.4505	TNC	1.17495		
S100A12	2.5678	TNFAIP2	1.4982		
S100A7	2.8443	TNFAIP3	2.31785		
S100A7A	5.18095	TNIP1	1.859		
S100A8	1.4581	TRAF3IP3	1.51825		
S100A9	1.414	TRANK1	1.32615		
SAA1	2.39535	TYMP	1.72675		
SAA2	3.3761	VIM	1.52225		

7.4.2 Whole-Genom-Sequenzierung nach *in vivo*-Behandlung mit BAWD

Tabelle 7.3: Whole-Genom-Sequenzierung nach 10-tägiger Behandlung mit BAWD

Gen	x-fache Änderung	log2	Gen	x-fache Änderung	log2	Gen	x-fache Änderung	log2
Abcb4	1.72	0.79	Alpk3	2.78	1.47	B3gnt7	1.50	0.59
Abcd2	-1.64	-0.71	Als2cr12	-1.50	-0.59	Bche	-1.64	-0.71
Abi3bp	1.63	0.71	Alx4	6.23	2.64	Bin1	1.52	0.60
Abra	2.67	1.42	Ampd1	3.81	1.93	Bmper	-1.77	-0.82
Abtb2	-1.03	-0.04	Amy1	-1.61	-0.69	Bves	1.75	0.81
Acaa1b	-1.65	-0.72	Angpt11	1.74	0.80	C1rb	1.55	0.63
Acs11	-1.61	-0.69	Ank1	2.30	1.20	C3	1.57	0.65
Acss3	-1.54	-0.63	Ankrd2	3.66	1.87	C7	-2.02	-1.02
Acta1	2.98	1.58	Ankrd23	3.51	1.81	Cacna1e	-1.51	-0.60
Actb	-1.07	-0.10	Ankrd5	-1.77	-0.83	Cacna1s	2.59	1.37
Actn2	1.92	0.94	Ankrd9	1.64	0.72	Cacna2d1	1.63	0.71
Actn3	3.50	1.81	Ano5	3.88	1.96	Cacnb1	1.85	0.89
Acvr1c	-2.20	-1.14	Aoc3	-1.62	-0.70	Cacng1	1.81	0.86
Adam23	-1.53	-0.62	Apln	1.67	0.74	Cacng6	2.37	1.24
Adamts20	1.70	0.76	Apobec2	4.39	2.13	Camk2a	1.87	0.90
Adamts8	2.55	1.35	Apoc4	-1.58	-0.66	Camk2b	1.90	0.93
Adck3	1.95	0.97	Apol8	-1.50	-0.59	Cand2	1.72	0.78
Adcy5	-1.64	-0.72	Aqp4	2.62	1.39	Cap2	2.47	1.30
Adcyap1r1	-2.00	-1.00	Aqp7	-2.08	-1.06	Capn3	2.44	1.29
Adhfe1	-1.64	-0.71	Arg1	1.60	0.68	Car5b	-1.66	-0.73
Adig	-1.76	-0.82	Arhgap20	1.93	0.95	Card10	-1.06	-0.09
Adipoq	-2.04	-1.03	Art1	3.09	1.63	Casq1	2.72	1.45
Adora1	-2.14	-1.10	Art5	1.83	0.87	Casq2	2.01	1.01
Adprhl1	2.29	1.20	Arxes1	-2.29	-1.20	Cav2	-1.53	-0.61
Adra1a	-2.02	-1.02	Arxes2	-2.27	-1.19	Cav3	2.05	1.04
Adss11	1.76	0.81	Asb10	2.29	1.20	Ccdc136	1.50	0.59
Agbl1	1.34	0.42	Asb11	4.97	2.31	Ccdc149	1.31	0.39
Ag1	1.55	0.64	Asb12	3.23	1.69	Ccl11	1.58	0.66
Agpat2	-1.83	-0.87	Asb14	2.57	1.36	Ccl24	2.06	1.04
AI427809	1.57	0.65	Asb15	7.04	2.81	Ccl8	1.63	0.71
Aifm2	-1.74	-0.80	Asb16	2.11	1.07	Cd163	1.65	0.73
Ak1	1.80	0.85	Asb2	2.52	1.34	Cd1d1	-1.62	-0.70
Akap6	1.58	0.66	Asb5	1.84	0.88	Cd209b	-1.60	-0.68
Akr1c14	2.14	1.10	Aspa	-1.52	-0.60	Cd209e	1.99	0.99
Akr1c18	2.66	1.41	Atp1a2	1.51	0.59	Cd34	1.65	0.73
Alb	-1.70	-0.77	Atp1b2	1.85	0.89	Cd36	-1.64	-0.71
Aldh1a2	-2.70	-1.43	Atp2a1	2.95	1.56	Cd44	-1.02	-0.03
Aldh1a7	-2.84	-1.51	Atp6v0e2	1.60	0.68	Cd55	1.82	0.86
Aldh111	-1.55	-0.64	Atp8a2	1.58	0.66	Cd51	-1.55	-0.63
Alox15	2.34	1.23	B3galt2	-1.59	-0.67	Cdh15	1.73	0.79
Alpk2	1.77	0.83	B3galt5	1.65	0.73	Cdk14	-2.03	-1.02

VIII Anhang

Fortsetzung

Cdnf	1.56	0.64	Ddo	1.59	0.67	Fbxo31	1.87	0.91
Cdo1	-1.81	-0.86	Defb3	1.57	0.65	Fbxo40	3.09	1.63
Cfd	-1.70	-0.77	Defb4	1.07	0.10	Ffar2	-1.73	-0.79
Ch25h	1.70	0.77	Des	2.69	1.43	Fgf10	-1.98	-0.98
Chi3l3	1.77	0.83	Dhrs7c	3.96	1.99	Fgf11	1.56	0.65
Chpt1	-1.54	-0.62	Dlk1	2.44	1.29	Fgf23	1.75	0.81
Chrd	1.52	0.60	Dmbt1	-1.74	-0.80	Fgfr1	-1.51	-0.59
Chrna1	1.70	0.77	Dmd	1.59	0.67	Fgl2	1.50	0.59
Cidec	-1.97	-0.98	Dnajc27	1.57	0.65	Fhl1	1.91	0.93
Cilp	1.54	0.62	Dnajc6	-1.55	-0.63	Filip1	1.60	0.68
Ckm	3.13	1.65	Dok7	2.18	1.13	Fitm1	2.81	1.49
Ckmt2	3.67	1.88	Dpp4	1.67	0.74	Flg	-1.69	-0.76
Clca1	-1.56	-0.64	Dpysl5	1.25	0.32	Flg	-1.60	-0.68
Clen1	3.11	1.64	Dtna	2.12	1.08	Finc	1.90	0.93
Clec3b	1.67	0.74	Dusp13	2.24	1.16	Fmr1	-1.55	-0.64
Clic5	1.80	0.85	Dusp27	2.45	1.30	Fndc5	2.39	1.26
Clstn2	-1.57	-0.65	Dusp9	-1.70	-0.76	Fras1	2.10	1.07
Clstn3	-1.57	-0.65	E130317F20Ri	-1.55	-0.63	Fsd2	1.99	0.99
Cmya5	3.16	1.66	Ear2	1.70	0.77	Fxyd1	1.75	0.81
Cnksr1	1.60	0.68	Eef1a2	2.86	1.52	Fxyd6	1.32	0.40
Cnr1	-1.72	-0.78	Efemp1	1.55	0.63	G0s2	-1.79	-0.84
Col14a1	1.78	0.83	Efhd1	1.82	0.86	Galnt1	1.82	0.86
Col6a5	4.48	2.16	Egf	2.03	1.02	Gck	2.48	1.31
Comp	2.41	1.27	Elf3	1.53	0.61	Gfpt2	1.67	0.74
Coro6	1.99	1.00	Elfn1	1.69	0.76	Ghr	-1.53	-0.62
Cox6a2	3.92	1.97	Emr1	-1.08	-0.12	Glb1l2	-1.80	-0.85
Cox7a1	2.18	1.13	Emr4	-1.51	-0.59	Glt8d2	1.83	0.87
Cox8b	3.27	1.71	Eno3	2.62	1.39	Glyctk	-1.59	-0.67
Cpa2	-2.23	-1.16	Epdr1	1.58	0.66	Gpc3	1.87	0.90
Crhr2	2.01	1.01	Ephx2	-2.15	-1.10	Gpd1	-1.97	-0.98
Crlf1	-1.77	-0.83	Epm2a	1.69	0.76	Gpm6a	2.39	1.26
Crtac1	-2.13	-1.09	Epor	-1.84	-0.88	Gpr1	1.85	0.89
Cryab	1.83	0.87	Esrrg	2.78	1.47	Gpr133	1.59	0.67
Csrp3	2.32	1.22	Evi2a	-1.02	-0.03	Gpr64	1.57	0.65
Cth	-1.51	-0.60	Expi	1.75	0.81	Gpr81	-2.15	-1.10
Ctxn3	2.11	1.08	Eya2	-1.70	-0.77	Gpt	-1.69	-0.75
Cxcl13	-2.49	-1.32	Eya4	1.82	0.87	Grid1	-1.54	-0.62
Cxcl14	-1.91	-0.93	Fabp3	3.47	1.80	Grip2	1.62	0.70
Cxcr7	1.79	0.84	Fabp4	-1.98	-0.99	Gstz1	-1.52	-0.60
Cyp2e1	-1.64	-0.71	Fads3	-1.62	-0.70	Gys1	1.55	0.63
Cyp4f18	-1.66	-0.73	Fah	-1.58	-0.66	Gys2	-2.51	-1.33
D3Bwg0562e	-2.37	-1.25	Fam70a	1.67	0.74	H19	1.74	0.80
Dact2	1.75	0.81	Fasn	-1.56	-0.64	Has1	1.53	0.61
Dbi	-1.58	-0.66	Fbp2	1.79	0.84	Hcn4	2.29	1.19
Ddit4l	1.89	0.92	Fbxo27	-1.59	-0.67	Hfe2	3.06	1.61

VIII Anhang

Fortsetzung

Hhat1	3.18	1.67	Kcnk3	-2.07	-1.05	Mef2c	1.74	0.80
Hoxa10	-2.23	-1.16	Kcnma1	1.52	0.61	Meg3	1.52	0.60
Hoxa9	-1.76	-0.82	Kcnn3	1.98	0.99	Mettl22	1.64	0.71
Hoxb9	-1.77	-0.82	Kcnq5	1.88	0.91	Mgl2	2.13	1.09
Hpd1	-1.72	-0.79	Klb	-1.98	-0.98	Mgp	1.55	0.63
Hpx	-2.64	-1.40	Klhdc7a	-1.53	-0.62	Miat	1.79	0.84
Hrasls	1.66	0.73	Klhl30	2.40	1.26	Mirg	1.64	0.71
Hrc	2.10	1.07	Klhl31	2.70	1.43	Mlf1	3.20	1.68
Hrct1	-1.78	-0.83	Klhl33	1.83	0.87	Mllt11	1.65	0.72
Hspb2	1.61	0.69	Klhl34	4.01	2.00	Mmd	-1.72	-0.78
Hspb6	2.49	1.31	Klk12	1.56	0.64	Mme	-1.83	-0.88
Hspb7	2.40	1.26	Klra17	-1.74	-0.80	Mmp27	1.73	0.79
Ifi205	1.28	0.36	Krt19	3.76	1.91	Mmp28	-1.50	-0.59
Igfals	-2.16	-1.11	Lbp	1.50	0.59	Mosc1	-2.93	-1.55
Igfbp6	1.68	0.75	Lce1h	-1.01	-0.01	Mpz	1.70	0.77
Igfn1	12.79	3.68	Lcn2	-1.06	-0.09	Mrap	-2.39	-1.26
Igj	-1.90	-0.93	Lctl	-1.73	-0.79	Mrc1	1.34	0.42
Il13ra2	1.90	0.93	Ldb3	2.62	1.39	Mrgprg	2.41	1.27
Il4ra	1.25	0.32	Lep	-2.06	-1.04	Msln	2.70	1.43
Illdr2	1.56	0.64	Lepr	1.69	0.75	Mt1	1.52	0.60
Ip6k3	2.05	1.03	Lgals12	-1.84	-0.88	Mt2	1.68	0.75
Ipp	1.07	0.10	Lhx8	-2.21	-1.14	Mtap4	2.41	1.27
Irf4	1.32	0.40	Lipe	-1.84	-0.88	Mtap7d2	-1.67	-0.74
Irs3	-2.03	-1.02	Lipf	-2.91	-1.54	Mtap9	-1.53	-0.61
Islr2	1.87	0.90	Lmed1	1.96	0.97	Mtfp1	1.92	0.94
Itgad	-2.10	-1.07	Lmod2	2.87	1.52	Murc	1.76	0.82
Itgb1	-1.01	-0.01	Lmod3	2.43	1.28	Musk	2.15	1.11
Itgb1bp2	1.75	0.81	Lpgat1	-1.59	-0.67	Mustn1	1.55	0.63
Itgb1bp3	2.41	1.27	Lpl	-1.67	-0.74	Myadml2	3.22	1.69
Itgb6	1.29	0.36	Lrrc2	3.27	1.71	Mybpc1	2.56	1.35
Jph1	2.11	1.08	Lrrc20	1.51	0.60	Mybpc2	5.35	2.42
Jph2	2.24	1.16	Lrrc3	-1.51	-0.59	Myf6	2.10	1.07
Jsrp1	2.80	1.48	Lrrc30	3.21	1.68	Myh1	2.37	1.24
Kbtbd10	1.89	0.92	Lrrn1	1.91	0.93	Myh11	-1.03	-0.04
Kbtbd5	2.18	1.13	Lrrn4cl	1.97	0.98	Myh13	2.44	1.29
Kcna7	3.57	1.84	Lrtm1	1.58	0.66	Myh2	2.50	1.32
Kcnb1	-1.65	-0.73	Lsm10	1.07	0.10	Myh4	1.99	0.99
Kcnc1	1.73	0.79	Ltc4s	-1.64	-0.71	Myh6	415.10	8.70
Kcnc2	-1.62	-0.70	Lynx1	1.62	0.70	Myh7	699.36	9.45
Kcnc4	2.36	1.24	Macrodl	1.96	0.97	Myl1	2.44	1.29
Kcne4	1.75	0.81	Mapt	1.76	0.82	Myl2	246.51	7.95
Kcnh2	-1.56	-0.64	Marco	-2.58	-1.37	Myl3	189.70	7.57
Kcnj11	2.94	1.55	Mb	2.74	1.45	Myl6b	2.37	1.24
Kcnj12	2.36	1.24	Mc2r	-2.06	-1.04	Mylk2	3.30	1.72
Kcnj14	-2.06	-1.04	Me3	2.44	1.28	Mylk4	5.21	2.38

VIII Anhang

Fortsetzung

Mylpf	2.23	1.15	Pde4dip	2.96	1.57	Rbp7	-1.65	-0.72
Myo18b	2.83	1.50	Pdk2	1.56	0.64	Rcan2	1.79	0.84
Myoc	2.49	1.31	Pdlim3	1.84	0.88	Reep1	1.60	0.68
Myod1	2.16	1.11	Pex5l	-1.74	-0.80	Reg3g	-1.52	-0.61
Myom1	2.57	1.36	Pfkm	2.31	1.21	Retn	-1.79	-0.84
Myom2	2.57	1.36	Pfn2	1.64	0.72	Retsat	-1.70	-0.76
Myom3	2.14	1.10	Pgam2	2.50	1.32	Rgs9bp	-1.57	-0.65
Myot	2.79	1.48	Pgf	1.95	0.96	Ric3	-1.69	-0.76
Myoz1	3.09	1.63	Phka1	1.98	0.99	Rims4	-1.63	-0.70
Myoz2	3.67	1.88	Phkg1	2.78	1.47	Rpl3l	3.33	1.74
Myoz3	1.91	0.94	Pi16	2.08	1.06	Rragd	2.54	1.34
Mypn	2.92	1.55	Pkhd11l	4.87	2.28	Rspo1	1.89	0.92
Naca	1.61	0.68	Pkia	2.10	1.07	Rtn2	1.75	0.81
Ncan	-2.29	-1.20	Pkp2	-1.64	-0.71	Rtp3	-1.59	-0.67
Nctc1	2.84	1.50	Pla1a	1.64	0.72	Ryr1	2.97	1.57
Ndrg2	1.70	0.76	Pla2g4d	1.66	0.73	Saa1	1.91	0.93
Neb	2.75	1.46	Plac8	1.74	0.80	Saa3	1.59	0.66
Neur11a	2.05	1.04	Plekhb1	2.21	1.14	Sbk2	1.71	0.77
Nexn	2.25	1.17	Plin1	-2.19	-1.13	Sca1	1.28	0.36
Ngp	-1.67	-0.74	Plin4	-1.79	-0.84	Scara3	1.60	0.68
Nnat	-2.48	-1.31	Pnpla2	-1.70	-0.76	Scd1	-2.21	-1.15
Nos2	2.87	1.52	Pnpla3	-1.56	-0.64	Scn2a1	1.68	0.75
Nov	1.66	0.73	Popdc2	2.05	1.04	Scn4a	2.80	1.48
Npr3	-1.94	-0.95	Ppapdc3	1.83	0.87	Scn4b	3.22	1.69
Nr1h3	-1.52	-0.60	Ppargc1a	1.72	0.78	Scn8a	-1.66	-0.73
Nrap	2.90	1.54	Ppp1r27	7.62	2.93	Scx	1.66	0.73
Nrk	2.46	1.30	Ppp1r3a	1.81	0.85	Sdpr	-1.76	-0.82
Nts	-1.75	-0.81	Ppp1r3c	2.51	1.33	Sdsl	-2.52	-1.34
Nxn11	-1.86	-0.89	Prg4	2.20	1.14	Sema3b	1.57	0.65
Obscn	2.78	1.48	Prkaa2	2.21	1.14	Sema6c	1.57	0.65
Opcml	1.62	0.70	Prkar2b	-1.97	-0.98	Serpina3c	-1.57	-0.65
ORF63	1.72	0.78	Psca	1.65	0.72	Serpina3m	2.12	1.08
Otop1	-3.67	-1.87	Ptgis	2.89	1.53	Serpina2	2.17	1.12
Oxtr	-2.22	-1.15	Ptpn	-1.65	-0.72	Serpina6e	1.77	0.82
P2rx6	1.51	0.59	Ptx3	2.56	1.36	Setdb2	-1.06	-0.09
Padi2	1.86	0.90	Pvalb	4.37	2.13	Sfrp2	1.53	0.62
Pamr1	1.94	0.95	Pydc4	1.50	0.59	Sfrp4	2.02	1.02
Paqr9	-2.39	-1.26	Pygm	3.25	1.70	Sfrp5	-1.55	-0.63
Park2	1.59	0.67	Rapsn	1.64	0.71	Sgca	2.11	1.07
Pbk	-1.07	-0.10	Rasd1	-1.80	-0.85	Sgcg	1.51	0.59
Pcdh20	1.58	0.66	Rasd2	2.03	1.02	Sh3bgr	2.46	1.30
Pck1	-2.17	-1.12	Rasl11a	1.65	0.72	Shisa4	2.32	1.22
Pcx	-1.54	-0.62	Raver2	-1.55	-0.63	Shroom1	1.62	0.69
Pde3b	-1.58	-0.66	Rbfox1	2.25	1.17	Sik2	-1.50	-0.59
Pde4d	1.56	0.64	Rbm24	2.09	1.06	Slc22a3	-2.09	-1.06

VIII Anhang

Fortsetzung

Slc25a10	-1.67	-0.74	Tacc2	1.54	0.62	Trim72	2.25	1.17
Slc25a4	1.72	0.78	Tacr1	1.50	0.59	Tshr	-1.87	-0.90
Slc27a1	-1.67	-0.74	Tas1r3	-1.50	-0.59	Tspan12	-1.61	-0.68
Slc36a2	-2.12	-1.09	Tbce	-1.02	-0.03	Tst	-1.03	-0.04
Slc38a3	3.01	1.59	Tcap	3.65	1.87	Ttn	3.25	1.70
Slc39a4	-1.56	-0.64	Tcea3	2.32	1.22	Tusc5	-1.93	-0.95
Slc40a1	-1.52	-0.61	Tceal5	1.70	0.77	Txlnb	3.18	1.67
Slc47a1	1.88	0.91	Tfcp2l1	1.54	0.62	Ubd	-2.43	-1.28
Slc5a3	-1.57	-0.65	Thbd	1.51	0.60	Ucp1	-8.90	-3.15
Slc5a7	-1.99	-0.99	Thbs3	1.54	0.62	Unc45b	1.54	0.62
Slc6a13	-1.80	-0.85	Thbs4	1.82	0.86	Unc79	-1.64	-0.71
Slc7a10	-1.76	-0.82	Thrsp	-1.52	-0.60	Upk3b	37.88	5.24
Slc7a2	1.73	0.79	Tifab	-1.07	-0.10	Usp13	2.40	1.26
Slc8a3	1.99	0.99	Timp4	-1.81	-0.86	Usp28	1.34	0.42
Slit1	1.55	0.63	Tmem100	1.83	0.87	Vegfa	1.53	0.61
Sln	2.66	1.41	Tmem117	1.67	0.74	Vgl2	3.38	1.76
Smarcd3	1.67	0.74	Tmem120a	-1.51	-0.60	Vsnl1	-1.51	-0.59
Smoc1	-2.08	-1.05	Tmem179	-2.55	-1.35	Vwa3a	-1.52	-0.60
Smpx	2.67	1.42	Tmem233	3.45	1.79	Wdr92	1.52	0.60
Smtnl1	3.37	1.75	Tmem38a	2.57	1.36	Wdr93	-2.18	-1.13
Smtnl2	2.47	1.31	Tmem52	2.57	1.36	Wfdc1	2.21	1.14
Smyd1	2.65	1.40	Tmod1	1.69	0.76	Wfdc3	1.69	0.76
Sncg	-2.01	-1.01	Tmod4	2.58	1.37	Wnt2	2.47	1.30
Sobp	1.96	0.97	Tnfaip6	2.07	1.05	Wnt3	-1.01	-0.01
Sorbs1	-1.55	-0.63	Tnfrsf11b	1.58	0.66	Xirp1	1.96	0.97
Spatc1	-1.50	-0.59	Tnfrsf9	3.29	1.72	Xirp2	2.54	1.35
Speg	2.24	1.16	Tnmd	1.54	0.62	Xk	1.51	0.59
Spic	-1.84	-0.88	Tnnc2	2.88	1.53	Yipf7	2.60	1.38
Spnb1	2.32	1.21	Tnni1	6.45	2.69	Zfp641	1.79	0.84
Srl	2.40	1.26	Tnni2	2.48	1.31	Zmynd17	6.75	2.76
Srpk3	2.09	1.06	Tnnt1	9.14	3.19			
Stac3	2.29	1.20	Tnnt3	2.58	1.37			
Stbd1	1.56	0.64	Tph2	-1.95	-0.96			
Stk36	1.25	0.32	Tpm1	1.87	0.91			
Sucnr1	-1.95	-0.97	Tpm2	2.07	1.05			
Sycp3	-2.39	-1.26	Tpm3	2.35	1.23			
Syn1	-1.57	-0.65	Trdn	3.17	1.67			
Sync	1.73	0.79	Treml4	-1.92	-0.94			
Synm	2.76	1.46	Trfr2	-1.91	-0.93			
Synpo2	1.61	0.69	Trhde	-1.77	-0.83			
Synpo21	2.32	1.21	Trim54	2.92	1.55			
Syp	-2.08	-1.06	Trim55	1.99	0.99			
Syp12	2.66	1.41	Trim63	2.10	1.07			
Syt7	-1.71	-0.77	Trim67	-2.28	-1.19			

7.5 Publikationen

7.5.1 Publikationen

Goren I, Lee SY, Maucher D, Nüsing R, Schlich T, Pfeilschifter J, Frank S - Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 activity in keratinocytes inhibits PGE2 formation and impairs VEGF release and neovascularization in skin wounds. *Int Wound J*, 2015 (in press)

7.5.2 Posterbeiträge

Maucher D, Schürmann C, Engelmann-Pilger K, Schmid R, Hildebrandt T, Mark M, Klein T, Reif K, Frank S – Biologically Active Wound Dressing Improves Wound Healing in Diabetic *db/db* mice; American Diabetes Association 72nd Scientific Session, June 8-12 2012; Philadelphia, USA

7.5.3 Vorträge

Maucher D, Schürmann C, Goren I, Frank S – Living human keratinocytes as a therapeutic option to improve diabetic ulceration; 50th EASD Annual Meeting, September 15-19 2014; Wien, Österreich

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Keratinocytenbasierte Wundauflage zur Förderung der diabetischen Wundheilungsstörung

in dem Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Stefan Frank ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, 10.12.2015

.....

Damian Maucher

Revidierte Fassung:

Frankfurt am Main, 10.04.2017

.....

Damian Maucher