

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchungen zum Einfluss humaner
Thrombozytenkonzentratlysate auf die Expression der
humanen β -Defensine-2 und -3 in Keratinozyten
in vitro und *in vivo***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Justus Lammel

aus Berlin

Kiel 2020

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Jürgen Harder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Martin Laudien, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,
Kopf- und Halschirurgie

Tag der mündlichen Prüfung:

19.08.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

18.06.2021

gez.

Prof. Dr. Jürgen Harder
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und Glossar	III
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	5
2.1 Allgemeine Erläuterungen	5
2.2 PRGF-Herstellung	5
2.3 Kultivierung humaner Zelllinien	7
2.3.1 Primäre Keratinozyten	7
2.3.2 Subkultivierung der Keratinozyten	8
2.4 Luziferase-Genreporter-Experimente	9
2.4.1 Verwendete Promotorkonstrukte	9
2.4.2 Transfektion der Keratinozyten	9
2.5 Stimulation mit PRGF <i>in vitro</i>	10
2.5.1 Antikörper	10
2.5.2 Ablauf	10
2.6 Semiquantitative Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion	11
2.6.1 Verwendete Primer	11
2.6.2 RNA-Isolierung	11
2.6.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	12
2.6.4 Reverse Transkription der RNA	12
2.6.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	13
2.7 HBD-2-ELISA	14
2.8 Luziferase-Genreporter-Experimente	15
2.8.1 Funktionsprinzip	15
2.8.2 Luziferase-Aktivitätsmessung	17
2.9 PRF-Studie <i>in vivo</i>	17
2.9.1 Allgemeines	17
2.9.2 Studiendesign	18
2.9.3 Verarbeitung der Biopsien	19
2.10 Statistische Auswertung	22
2.11 Darstellung der Ergebnisse	22
3 Ergebnisse	24
3.1 PRGF stimuliert konzentrationsabhängig die Expression von hBD-2 und hBD-3 in primären Keratinozyten	24

3.2	Die PRGF-vermittelte Expression von hBD-2 und hBD-3 ist am stärksten nach 24 bis 48 Stunden	27
3.3	Die durch PRGF induzierte Expression von hBD-2 und hBD-3 wird zum Teil über den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR, <i>epidermal growth factor receptor</i>) vermittelt	30
3.4	Die Stimulation primärer Keratinozyten mit PRGF führt zu einer frühen Expression von Interleukin-6	32
3.5	Die PRGF-induzierte Expression von hBD-2 und hBD-3 wird zum Teil durch den Interleukin-6-Rezeptor vermittelt	33
3.6	Die PRGF-vermittelte hBD-2-Expression ist abhängig vom Transkriptionsfaktor AP-1, jedoch nicht von NF- κ B	36
3.7	Stimulation mit PRGF führt zu einer Aktivierung der hBD-3-Promotorregion in primären Keratinozyten	38
3.8	Die Behandlung von Hautwunden mit Vivostat PRF [®] führt zu einer gesteigerten Expression von hBD-2 und hBD-3 in menschlicher Epidermis <i>in vivo</i>	39
4.	Diskussion	43
4.1	Neue Therapeutika zur Behandlung chronischer Wunden	43
4.2	Expression von hBD-2 und hBD-3 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	45
4.3	PRGF-vermittelte Expression von Interleukin-6 in Keratinozyten	48
4.4	Signaltransduktionswege der PRGF-vermittelten Expression von hBD-2 und hBD-3	50
4.4.1	Vermittlung über den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor	50
4.4.2	Die Rolle der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 in der PRGF-vermittelten hBD-2-Expression	52
4.5	Klinischer Bezug und Ausblick	55
5	Zusammenfassung	58
6	Literaturverzeichnis	60
7	Danksagung	69

Abkürzungsverzeichnis und Glossar

Englischsprachige Eigennamen wurden kursiv dargestellt und in Klammern bzw. im Abkürzungsverzeichnis und Glossar sinngemäß erläutert.

A	Desoxyadenin
Abb.	Abbildung
ABC	<i>avidin-biotin complex</i> / Avidin-Biotin-Komplex / Methode zur immunhistologischen Färbung
ABTS	Diammonium-2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure
AMP	antimikrobielle Peptide
ATF	<i>activating transcription factor</i> / Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1
ATP	Adenosintriphosphat / Energieträger
AP-1	<i>activator protein-1</i> / Eigenname eines Transkriptionsfaktors
BSA	<i>bovine serum albumin</i> / aus Rinderserum gewonnenes Albumin
bp	<i>base-pair</i> / Basen-Paare
C	Desoxycytidin
Dermicidin	von Schweißdrüsen sezerniertes antimikrobielles Peptid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> / Nährmedium für Zelllinien
cDNA	<i>mRNA complementary DNA</i> / zur mRNA komplementäre DNA
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> / epidermaler Wachstumsfaktor
E. coli	Escherichia coli
ELISA	<i>enzyme linked Immunosorbant assay</i> / Enzym-vermitteltes immunologisches Nachweisverfahren
ERK	<i>extracellular-related-kinase</i> / Extrazellulär-Signal gekoppelte Kinase
FCS	<i>fetal calf serum</i> / fetales Kälberserum
F-Primer	<i>foward-primer</i> / vorwärts gerichteter (sense) Primer
Fos	Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1
g	Erdbeschleunigung

G	Desoxyguanosin
hBD	humanes β -Defensin
IL	Interleukin
JAK	Januskinase / zytoplasmatische Tyrosinkinase
JNK	<i>c-Jun-N-terminal-kinase</i> / Charakterisierung einer Proteinkinase
Jun	Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1
kDa	kilo-Dalton
KGM	<i>keratinocyte growth medium</i> / Wachstumsmedium für Keratinozyten
LL-37	antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der Cathelicidine
Maf	Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1
MAPK	<i>mitogene-activated protein kinase</i> / Proteinkinasefamilie
MG132	Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ B
mRNA	<i>messenger RNA</i> / Boten-RNA
M	Mol
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i> / Eigenname eines Transkriptionsfaktors
NHEK	normale epidermale humane Keratinozyten
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> / Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
(q)PCR	<i>(quantitative) polymerase chain reaction</i> / (quantitative) Polymerase-Kettenreaktion
pGL3	Eigenname eines für das Enzym <i>Firefly</i> -Luziferase kodierenden Vektors
pGL4	Eigenname eines für das Enzym <i>Renilla</i> -Luziferase kodierenden Vektors
PRF	<i>platelet-rich fibrin</i> / thrombozytenreiches Fibrin
PRGF	<i>platelet-released growth factors</i> / aus Thrombozyten freigesetzte Wachstumsfaktoren
Psoriasin	antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der S100-Proteine
Rel	Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B
Ribonuklease 7	antimikrobielles Peptid aus der Gruppe der RNasen
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure

RP 38	ribosomales Protein 38
R-Primer	<i>reverse-primer</i> / reverser (antisense) Primer
SHP2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2</i> / Gruppe von Protein-Tyrosin-Phosphatasen
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i> / Transkriptionsfaktor-Familie
T	Desoxythymidin
Tab.	Tabelle
TBS / Tween®	<i>Tris-buffered saline with Tween® 20</i> / Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween® 20
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i> / Eigenname eines Zytokins
Tween® 20	Polysorbat 20 / nichtionisches Tensid

1 Einleitung

Die Integrität der Haut hat für das Überleben von Wirbeltieren eine zentrale Bedeutung. Sie schützt den Organismus vor schädlichen Umwelteinflüssen und mikrobiellen Gefahren, ermöglicht Stoffwechselfvorgänge sowie die Interaktion mit der Umgebung. In die aus diesen Gründen so wichtigen Reparatur- und Heilungsprozesse der Haut sind eine Vielzahl zellulärer, extrazellulärer und humoraler Komponenten eingebunden, die in verschiedenen Phasen der Wundheilung wirken (Falanga 2005). Ist das komplexe Zusammenspiel dieser Komponenten gestört und resultiert daraus eine verzögerte oder inkomplette Wundheilung, spricht man von einer chronischen Wunde (Mast und Schultz 1996, Rüttermann et al. 2013, Smola et al. 2001).

Die Behandlung solcher nicht-heilender, chronischer Wunden stellt eine wachsende Herausforderung für die moderne Medizin dar. Neben einer dadurch bedingten starken Einschränkung der Lebensqualität, ist die Behandlung solcher Wunden langwierig, auch sind die Kosten dafür enorm. Für die Behandlung eines Patienten, der an einem Ulcus cruris leidet – der häufigsten chronischen Hautwunde – fallen pro Jahr Kosten in Höhe von 8.000 bis 10.000 Euro an. Das führte bei etwa 330.000 behandelten Patienten im Jahr 2012 in Deutschland zu Gesamtkosten von schätzungsweise 3 Milliarden Euro (Chandan et al. 2009, Heyer et al. 2016). Zudem ist anzunehmen, dass die sozioökonomische Belastung auf Grund einer Zunahme der Prävalenz chronischer Wunden und der ihnen am häufigsten zu Grunde liegenden Erkrankungen, wie Diabetes mellitus und chronisch venöser Insuffizienz, weiter steigen wird (Heyer et al. 2016, Lawrence und Gazak 1998). Neben der Bekämpfung dieser und weiterer Ursachen chronischer Wunden, ist die Entwicklung und Erforschung von Konzepten zur Verbesserung einer gestörten Wundheilung essenziell, um die Rate der Komplikationen, z. B. Teilamputation der unteren Extremität oder septische Streuung bei infizierten Wunden, zu minimieren. Wichtige Aufgaben bestehen darin, die häufig unzureichende vaskuläre Versorgung des Wundgebiets zu verbessern, ein mangelndes Angebot an wachstumsregulierenden Proteinen auszugleichen und bakteriellen Infektionen entgegenzuwirken, die sowohl Ursache als auch Komplikation einer gestörten Wundheilung sein können (Agale 2013, Mast und Schultz 1996, Smola et al. 2001).

Körpereigene Bestandteile, die eine Vielzahl von Chemokinen, Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren enthalten und essenziell für den physiologischen Wundheilungsprozess sind, sind die Thrombozyten (Anitua et al. 2012, Eppley et al. 2004, Golebiewska und Poole 2015, Weibric et al. 2002). Aus diesem Grund werden seit einigen Jahren in verschiedenen Bereichen der Chirurgie, insbesondere der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, zur Verbesserung der Weichteil- und Knochenheilung und zur Verringerung des Auftretens von postoperativen lokalen Infektionen fibrinversetzte Thrombozytenkonzentrate eingesetzt (Pal et al. 2012, Whitman et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass solche thrombozytenhaltigen Formulierungen einerseits die Proliferation von Zellen und die Geweberegeneration stimulieren, andererseits modifizierend auf Zell- und Gewebedifferenzierung einwirken sowie die Angiogenese fördern (Graziani et al. 2006, Kakudo et al. 2008, Kawasumi et al. 2008, Kilian et al. 2004). Aus einer Übersichtsarbeit zur Rolle von thrombozytenreichem Fibrin (PRF, *platelet-rich Fibrin*) bei der Wundheilung von Weichgeweben geht hervor, dass in der Mehrzahl der erfassten Studien (27 von 31) ein positiver Effekt beobachtet werden konnte (Miron et al. 2017). So konnte in Tiermodellen etwa eine verbesserte Heilung von Wunden der Haut (Roy et al. 2011) und der Mukosa des Mundraums (Horii et al. 2014) erreicht werden. Bereits 1986 machten Knighton et al. darauf aufmerksam, dass die Anwendung von Thrombozyteninhaltsstoffen auf nicht-heilenden Wunden der unteren Extremitäten auch beim Menschen zu einem schnelleren Wundschluss führte (Knighton et al. 1986). Welche Effekte solche thrombozytären Stimuli jedoch auf die Proteinexpression der behandelten Zellen haben, ist bislang weitestgehend unklar.

Die Haut besitzt einen natürlichen Schutz vor infektiösen Gefahren in Form von sogenannten antimikrobiellen Peptiden (AMP). Diese induzierbaren oder konstitutiv exprimierten kleinen Proteine bestehen aus etwa 12-50 Aminosäuren und sind Teil unseres angeborenen, unspezifischen Immunsystems. Sie stellen seit Urzeiten ein effektives System zur Abwehr an Oberflächenepithelien dar, wo der Kontakt mit Mikroorganismen wie grampositiven und -negativen Bakterien, Pilzen und Viren zur Belastungsprobe für den Organismus wird (Auvynet und Rosenstein 2009, Harder 2008). Seit Michael Zasloff 1987 erstmals die Isolierung zweier Peptide, der Magainine (hebräisch: Schutzschild), aus der Haut des afrikanischen Krallenfroschs

(*Xenopus laevis*) gelang (Zasloff et al. 1987), wurden mehrere hundert solcher antimikrobiellen Peptide beschrieben. Ihre amphipathische Struktur, in der sowohl positiv geladene Aminosäuren, als auch elektroneutrale, hydrophobe Anteile des Moleküls enthalten sind, ermöglicht ihnen das Eindringen in mikrobielle Membranen – etwa der von Bakterien. Diese tragen – im Gegensatz zu mehrzelligen Organismen – die negativ geladenen Kopfgruppen ihrer Phospholipidmembran an der Zellaußenseite und bieten so Angriffspunkte für die kationischen Anteile antimikrobieller Peptide. Die Peptide können so durch räumliche Organisation innerhalb der Membran deren Integrität schädigen und zur Lyse des Bakteriums führen (Zasloff 2002, Cordes et al. 2014). Eine wichtige Gruppe der antimikrobiellen Peptide sind die Defensine, die durch zwischen drei Cysteinresten bestehende Disulfidbrücken charakterisiert werden. Anhand der Anordnung dieser Disulfidbrücken lassen sich die Defensine in α -, β - und θ -Defensine unterteilen (Ganz und Lehrer 1998, Auvynet und Rosenstein 2009). Während die humanen α -Defensine vornehmlich in neutrophilen Granulozyten und den Paneth-Zellen des Dünndarms zu finden sind und die θ -Defensine vom Menschen wie auch von Gorillas und Schimpansen nicht exprimiert werden (Li et al. 2014), finden sich die humanen β -Defensine (hBD) in verschiedenen Oberflächenepithelien des Menschen, unter anderem in der menschlichen Haut (Harder et al. 2008, Weinberg et al. 2012). Dort finden sich auch die bisher am intensivsten erforschten humanen β -Defensine 2 und 3, die vor etwa 20 Jahren erstmals aus psoriatischer Haut isoliert werden konnten (Harder 1997, Harder 2001). Während hBD-2 eine gute antimikrobielle Aktivität gegen Pilze und gramnegative, jedoch weniger gegen grampositive Bakterien besitzt (Harder et al. 1997, Harder et al. 2000, Singh et al. 1998), hat hBD-3 ein breiteres Wirkspektrum, das auch grampositive Erreger wie *Streptococcus pyogenes* und multiresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme einschließt (Harder 2001). Für hBD-2 und hBD-3 ließ sich vielfach eine Induzierbarkeit durch verschiedene bakterielle Stimuli und Zytokine, wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* oder IL-1 β nachweisen (Harder et al. 1997, Harder et al. 2001, Schröder und Harder 1999, Wehkamp et al. 2006). Zusammen mit hBD-2 und hBD-3 machen weitere antimikrobielle Peptide, wie das Cathelicidin LL-37, das S100-Protein Psoriasin, die Ribonuklease 7 und das Dermicidin, einen wichtigen Aspekt der chemischen Schutzbarriere der menschlichen Haut aus.

Im Zuge der Erforschung antimikrobieller Peptide stand ihre namensgebende Aktivität lange im Vordergrund. Es fanden sich jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass AMP als Mediatoren der Wundheilung aktiv sind. Dies weckte Interesse auf Grund des potenziellen therapeutischen Nutzens, der sich daraus ergibt. Beispielsweise sind hBD-2 und hBD-3 in der Lage Zytokine und Wachstumsfaktoren zu induzieren, welche die Migration und Proliferation von Keratinozyten fördern und chemotaktisch auf dendritische Zellen, T-Zellen und neutrophile Granulozyten wirken (Niyonsaba et al. 2005, Niyonsaba et al. 2007, Roupé et al. 2010, Sorensen et al. 2005). Zudem konnten verschiedene klinische und präklinische Studien zeigen, dass der therapeutische Einsatz antimikrobieller Peptide durchaus zu einer Verbesserung einer gestörten kutanen Wundheilung beitragen kann (Grönberg et al. 2014, Hirsch et al. 2009, Lipsky et al. 2008). Diese und weitere Studien lassen die Bedeutung von antimikrobiellen Peptiden mit Hinblick auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften, den Einfluss auf Zellmigration und -proliferation sowie als wichtige Effektormoleküle der Wundheilung erkennen.

Ziel der Untersuchungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, war es den Einfluss von humanen Thrombozytenkonzentratlysaten auf die Expressionsmuster antimikrobieller Peptide der Haut, insbesondere auf die humanen beta-Defensine-2 und -3, zu ergründen, um ein mögliches Schlüsselement für die verbesserte Geweberegeneration beim Einsatz solcher Lysate bei chronischen Wunden zu identifizieren. Dafür wurde der Einfluss von Thrombozytenkonzentratlysaten auf primäre Keratinozyten *in vitro* und auf experimentell gesetzte Hautwunden *in vivo* untersucht und verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Erläuterungen

Die Chemikalien wurden mit dem höchsten Reinheitsgrad (pro analysi) verwendet. Der Sitz des Herstellers wird jeweils nur in der ersten Erwähnung des jeweiligen Reagenz, Geräts oder Kits genannt. Soweit aus Verständnisgründen nicht auf die Nennung von produktspezifischen Eigennamen verzichtet werden konnte, wurden diese durch die Wahl eines *kursiven* Schriftsatzes kenntlich gemacht. Auch englischsprachige Eigennamen wurden *kursiv* dargestellt und in Klammern bzw. im Glossar und Abkürzungsverzeichnis erläutert. Die Position von kurzen Starter-Oligonukleotiden für die PCR (im folgenden „Primer“ genannt), die im Bereich des hBD-2- bzw. des hBD-3-Gens binden, wurden auf den Transkriptionsstart bezogen, das heißt das erste Nukleotid des abgelesenen Gens hat die Position +1, während das erste Nukleotid davor die Position -1 hat. Da der Promotorbereich eines Gens dem zu transkribierenden Bereich in Ableserichtung vorgeschaltet ist, erhalten dementsprechend alle Positionsangaben im Promotorbereich eine negative numerische Bezeichnung. Bei sämtlichen Reaktionen, die im Thermocycler durchgeführt wurden, wurde ein Wärmedeckel verwendet, dessen Temperatur konstant 8°C über der höchsten erreichten Temperatur lag.

2.2 PRGF-Herstellung

Die am Tag der Weiterverarbeitung gespendeten Thrombozytenkonzentrate wurden vom Blutspendedienst des UKSH Kiel mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Transfusionsmedizin bezogen. Die beinahe leukozytendepletierten Thrombozytenkonzentrate ($<1 \times 10^6$ Leukozyten auf 220 ml) (Transfusionsordnung Universitätsklinikum Schleswig-Holstein 2016) wurden dort mittels Hämapherese gewonnen. Jedes der Thrombozytenkonzentrate stammte von einem einzelnen Spender. Es fand keine Vermischung der Thrombozytenkonzentrate einzelner Spender statt, ebenso wurden die daraus gewonnenen wachstumsfaktorreichen Lysate, im Folgenden PRGF (*Platelet-released growth factors*) genannt, separat voneinander eingesetzt. Für die Herstellung von PRGF wurde der Teil der Thrombozytenkonzentrate verwendet, welcher nach der Hämapherese im dem zum

Sammelbeutel führenden Schlauch verblieben war. Das Ausgangsvolumen (je zwischen 5 und 12 ml) wurde notiert, das Konzentrat in ein konisches 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und anschließend für 10 min. bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Thrombozytenpräzipitat in einer zum Ausgangsvolumen äquivalenten Menge Natrium-Citrat-Puffer (11 mM, pH 5,5) durch sanftes Schwenken unvollständig resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min. bei 2000 x g) und Abnahme des Überstandes, wurde dieser Waschschrift wiederholt. Nun wurde die Resuspension des Präzipitats jedoch möglichst vermieden. Bis zu diesem Punkt im Herstellungsprozess ist der sorgfältige Umgang mit den Thrombozyten von besonderer Bedeutung, da eine vorzeitige Lyse und die damit verbundene Freisetzung der Inhaltsstoffe unbedingt verhindert werden soll. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Thrombozyten in der Hälfte des Ausgangsvolumens in *Keratinocyte Growth Medium 2* (KGM 2, PromoCell, Heidelberg, Germany) mit 0,06 mM Calciumchlorid(CaCl₂)-Zusatz durch Vortexen resuspendiert und auf Eis gelagert. Zur Lyse der Thrombozyten in den einzelnen Suspensionen wurden diese nun mit je 5 x 10 Ultraschallstößen behandelt und nach jeder der fünf Behandlungen auf Eis gelagert, um den für die Inhaltsstoffe potenziell schädlichen Wärmeeinfluss zu minimieren. Anschließend wurden die Suspensionen für 24 h bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde die Ultraschallbehandlung wiederholt und die Suspensionen erneut für 24 h bei -80°C gelagert. Abschließend wurde mikroskopisch überprüft, ob die Lyse der Thrombozyten erfolgreich war und es wurden die restlichen Zellbestandteile abzentrifugiert (1 min. bei 18000 x g). Der entstandene Überstand entspricht nun dem fertigen PRGF. Der Überstand wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Während des gesamten Herstellungsprozesses ist das Arbeiten unter sterilen Bedingungen bzw. das Vermeiden von Kontamination unumgänglich für den späteren Einsatz von PRGF in Zellkulturversuchen.

Die nach diesem Verfahren hergestellten PRGF dienten als Stimulus für alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche *in vitro*. Insgesamt wurden PRGF von 50 verschiedenen Spendern eingesetzt.

2.3 Kultivierung humaner Zelllinien

2.3.1 Primäre Keratinozyten

Für alle im Folgenden beschriebenen Zellkulturversuche wurden ausschließlich käuflich erworbene normale epidermale humane Keratinozyten (NHEK, PromoCell) verwendet. NHEK wurden durch medizinische Zirkumzisionen aus juvenilen Präputien verschiedener Patienten gewonnen, vereinigt und bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff kryopräserviert.

Zur erfolgreichen Kultivierung von Keratinozyten müssen Bedingungen vorliegen, die Wachstum, Adhäsion und Migration der Zellen ermöglichen. Dies wird *in vivo* vor allem durch den Kontakt verschiedener Adhäsionsproteine der Keratinozyten untereinander, mit der extrazellulären Matrix sowie mit der Basalmembran gewährleistet. Um diese Bedingungen zu simulieren wurden die Zellkulturflaschen mit Kollagen beschichtet, einem wesentlichen Bestandteil der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran (Mahrle et al. 1994).

Zur Kollagenisierung der Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm² (Sarstedt) wurde zunächst eine Lösung aus je 5 ml HCl (0,02 M) und 83,3 µl Rattenschwanzkollagen (3 mg/ml) (*Rat Tail Collagen I*, Life Technologies, New York, USA) hergestellt. Diese Lösung wurde nun durch Vortexen gemischt und in die Flaschen gegeben. Nach 24 h bei Raumtemperatur bzw. eine Stunde bei 37°C wurde die Lösung entfernt. Die Flaschen wurden zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (*Dulbecco's Phosphat buffered Saline*, PBS, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) gewaschen und abgesaugt und bis zur Benutzung bei Raumtemperatur gelagert. Die Keratinozyten wurden nun zunächst aufgetaut und je nach Bedarf in 20-30 ml auf 37°C erwärmtem KGM 2 +++ (s.u.) in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Je nach Bedarf wurden dem KGM 2 vor Benutzung 0,06 mM Calciumchlorid (CaCl₂) (KGM2 +-), ein definiertes Nährstoffgemisch (*SupplementMix*, PromoCell) (KGM2 ++-) und 50 U/ml Penicillin/Streptomycin (KGM2 +++) hinzugefügt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit serologischen Auslaufpipetten und sanftes Schwenken der Lösung wurden makroskopisch sichtbare Zellklumpen gelöst, bevor die Lösung zu je 10 ml auf die Zellkulturflaschen verteilt wurde. Durch mehrmaliges senkrechtes und waagerechtes Verschieben der Zellkulturflasche gegen den Untergrund, wurde eine

gleichmäßige Verteilung der Zellen im mikroskopischen Bild angestrebt. Die Keratinozyten wurden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten, 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Das Nährmedium wurde alle zwei Tage gewechselt bis eine Konfluenz der Zellen von etwa 90 % erreicht wurde. Es wurden NHEK zwischen der dritten und fünften Passage verwendet.

2.3.2 Subkultivierung der Keratinozyten

Bei adhärentem Wachstum und etwa 90 % Konfluenz wurden die Zellen vor der Subkultivierung in 12-Loch-Platten (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) zunächst mit 10 ml PBS gewaschen. Um die Zellen nun vom Flaschenboden zu lösen, wurden 5 ml einer auf 37°C erwärmten 0,05 % Trypsin/0,02 % Ethyendiamin-tetraessigsäure-Lösung pro Flasche hinzugegeben und für 5-7 min. bei 37°C inkubiert. Gegebenenfalls wurde das Ablösen durch vorsichtiges Anklopfen an die Flasche unterstützt, bis die vollständige Dissoziation eines Großteils der Zellen mikroskopisch erkennbar war. Durch Hinzugabe von 10 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, BioWest, Nuaille, Frankreich), inklusive 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Life Technologies) wurde die Trypsin-bedingte proteolytische Reaktion nun effektiv durch die im FCS enthaltenen Trypsin-Inhibitoren gestoppt. Der Flascheninhalt wurde nun bei 200 x g 5 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert und der entstehende Überstand verworfen. Das Zellpräzipitat wurde in 6 ml Volumen pro zu kultivierender 12-Loch-Platte resuspendiert. Anschließend wurden die Löcher der Platte erst mit je 0,5 ml KGM 2 +- und dann mit 0,5 ml der Zellsuspension befüllt. Die verwendeten Platten wurden vom Hersteller bereits entsprechend behandelt, sodass eine Beschichtung mit Kollagen vor Aussähen der Zellen nicht mehr notwendig war. Wie auch bei den Zellkulturflaschen (s.o.) wurde nun eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb der Löcher angestrebt. Das Nährmedium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Keratinozyten bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz unter den oben genannten Bedingungen inkubiert.

2.4 Luziferase-Genreporter-Experimente

2.4.1 Verwendete Promotorkonstrukte

Promotorkonstrukt	Fragmentlänge	Hersteller
hBD-2-luc-2338bp (hBD2f4r1-8b)	2338 bp	Arbeitsgruppe Harder
hBD2-Nf-κB-mut1+2+3-luc	2338 bp	Arbeitsgruppe Harder
hBD2-AP-1-mut-luc	2338 bp	Arbeitsgruppe Harder
hBD3-s3-2-1	2484 bp	Arbeitsgruppe Harder

Tab. 2.4-1 Übersicht über die in Genreporter-Experimenten verwendeten Promotorkonstrukte. Zur Untersuchung beteiligter Transkriptionsfaktoren an der PRGF-vermittelten hBD-2-Expression und zur Verifizierung der Induktion von hBD-3 durch PRGF, wurden Keratinozyten mit Reporter-Plasmiden transfiziert, die Fragmente der hBD-2- bzw. der hBD-3-Promotorsequenz beinhalten. Dabei trugen die Sequenzen des hBD-2-Promotors unterschiedliche Mutationen, die die Anbindung entweder des Transkriptionsfaktors NF-κB oder aber des Transkriptionsfaktors AP-1 verhinderten. Die Plasmide wurden im Rahmen früherer Arbeiten der Arbeitsgruppe Harder hergestellt (hBD-2: Wehkamp et al. 2006, hBD-3: Näbert 2006).

2.4.2 Transfektion der Keratinozyten

Die Transfektion der Keratinozyten mit Plasmidvektoren für Genreporter-Experimente in 12-Loch-Platten erfolgte bei 70-80 % Zellkonfluenz. Als Transfektionsreagenz wurde *Fugene 6*[®] (Roche GmbH, Mannheim, Deutschland) eingesetzt, welches den Eintritt der Vektoren in den Intrazellularraum ermöglichte. Der Eintritt der Vektoren in den Zellkern war für eine spätere Transkription des Luziferasegens (s.u.) notwendig, daher erfolgte die Transfektion bei oben genannter Zellkonfluenz, um eine weitere Teilung der Zellen und Aufnahme der Vektoren in den Zellkern zu erlauben. Pro Kavität wurden 100 µl Transfektionsansatz hergestellt, bestehend aus 1 µl *Fugene 6*[®], 0,3 µg des jeweiligen experimentellen *Firefly*-Luziferase-Vektors pGL-3 (Promega, Madison, USA; mit dem inklonierten hBD-2-Promotor mit jeweiligen Mutationen), 0,02 µg des *Renilla*-Kontrollvektors pGL4 (Promega) und dem nun noch fehlenden Volumen an KGM 2 +/- . Aus Kostengründen wurde hierbei von den Angaben des Herstellers abgewichen. In Vorversuchen wurde jedoch eine ausreichende Transfektionseffizienz mit diesen Mengen festgestellt. Durch einmaliges Invertieren und leichtes Anschnipsen des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde der Ansatz behutsam durchmischt und anschließend 15 min. bei

Raumtemperatur inkubiert. Vor Transfektion der Zellen wurden diese einmal mit 0,5 ml PBS gewaschen und dann 0,5 ml KGM 2 +- pro Kavität vorgelegt. Nun wurden 100 µl des Transfektionsansatzes pro Kavität unter leichtem Schwenken der Platte hinzugeträufelt. Eine weitere Durchmischung vor Hinzugabe des Transfektionsansatzes wurde nicht durchgeführt, um die gebildeten *Fugene 6*[®]-Vektor-Komplexe nicht zu zerstören. Nach 6 h Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank, wurde das Medium mit Transfektionsansatz von den Zellen entfernt und durch 0,5 ml KGM 2 +- ersetzt. Nach 24 h hatte sich nach mikroskopischem Eindruck ein Großteil der Keratinozyten ein weiteres Mal geteilt. Nun wurden die Zellen ein weiteres Mal mit 0,5 ml PBS gewaschen und anschließend stimuliert. Die Stimulationsdauer in Luziferase-Genreporter-Experimenten betrug ausnahmslos 24 h. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivitätsmessung durchgeführt (s.u.).

2.5 Stimulation mit PRGF *in vitro*

2.5.1 Antikörper

Antikörper	Hersteller
<i>Erbix</i> (<i>Cetuximab</i>)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>RoACTEMRA</i> (<i>Tocilizumab</i>)	Hoffmann - La Roche, Basel, Schweiz

Tab. 2.5-1 Übersicht über die in Stimulationsversuchen eingesetzten Rezeptor-Antikörper. Zur Untersuchung von Signaltransduktionswegen wurden Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*Cetuximab*) und den Interleukin-6-Rezeptor (*Tocilizumab*) eingesetzt. Die Antikörper wurden bei Stimulationen in einer Konzentration von 20 µg/ml (*Cetuximab*) und 50 µg/ml (*Tocilizumab*) im in dem Versuch verwendeten Medium eingesetzt.

2.5.2 Ablauf

Die Stimulation der Keratinozyten erfolgte stets in 12-Loch-Platten bei einer Zellkonfluenz von 90-100 %. Zunächst wurde das PRGF im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zur angezeigten Konzentration verdünnt. Als Verdünnungsmedium für die Stimulation wurde ausnahmslos KGM 2 +- verwendet. Nun wurde das alte Medium aus den Kavitäten entfernt und die Zellen einmal mit 0,5 ml PBS

gewaschen. Die Stimulation erfolgte mit 0,5 ml einer 10 % PRGF-Lösung über 24 h. Ausnahmen davon bildeten lediglich die Versuche zur Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der hBD-2- und hBD-3-Induktion. Die für diese Versuche festgesetzten Konzentrationen bzw. die Dauer der Stimulation sind in den dazugehörigen Abbildungen (s. Abb. 3.1-1 und Abb. 3.2-2) dargestellt. Gegebenenfalls wurde dem mit PRGF versetzten Medium zusätzlich ein Antikörper (s. 2.5.1) zugefügt. Die Beendigung der Stimulation erfolgte durch Abnahme und Aliquotierung der Zellüberstände, welche bei -20°C für die spätere Verwendung im ELISA gelagert wurden. Unmittelbar im Anschluss wurde die für das Folgeverfahren angezeigte Lyse der Zellen durchgeführt.

2.6 Semiquantitative Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

2.6.1 Verwendete Primer

Gen-mRNA	Primer	Sequenz
RP38	RP38-f1	5'-TCAAGGACTTCCTGCTCACA-3'
RP38	RP38-r1	5'-AAAGGTATCTGCTGCATCGAA-3'
hBD2	hBD2-for1	5'-GCCTCTTCCAGGTGTTTTTG-3'
hBD2	hBD2-ra	5'-GAGACCACAGGTGCCAATTT-3'
hBD3	hBD3-f2	5'-CGATCTGTTCCCTCCTTTGGA-3'
hBD3	hBD3-r2	5'-TCTTCCTGTTTTTGGTGCCT-3'
IL-6	IL-6-f2	5'-AGTGAGGAACAAGCCAGAGC-3'
IL-6	IL-6-r2	5'-GTCAGGGGTGGTTATTGCAT-3'
-	Oligo-(dT)	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Tab. 2.6-1 Sequenzen der Primer, die im Rahmen der semiquantitativen Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion verwendet wurden.

2.6.2 RNA-Isolierung

Zur Gewinnung von mRNA aus den Keratinozyten wurden die Zellen zunächst für 10 min. mit 0,5 ml *Crystal RNAmagic*-Reagenz (BiolabProducts, Bebensee, Deutschland) pro Kavität behandelt. *Crystal RNAmagic* enthält Guanidinisothiocyanat, welches die Keratinozyten lysiert und gleichzeitig RNasen

zerstört, sodass die mRNA der Zellen erhalten bleibt. Zusätzlich wurde durch 20-faches Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension die Lyse der Zellen auch mechanisch begünstigt. Die Zellsuspension wurde anschließend in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 100 µl Chloroform durch mehrfaches Invertieren durchmischt und 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation der Proben bei 12000 x g für 15 min. bei 4°C bildeten sich drei Phasen, von welchen die obere wässrige Phase die extrahierte RNA enthielt. Diese Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 250 µl Isopropanol für mindestens 10 min. bei Raumtemperatur belassen und so die Ausfällung der RNA abgewartet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 12000 x g für 10 min. bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das gelartige RNA-Präzipitat mit 0,5 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 12000 x g für 5 min. wurde dieser Waschschrift wiederholt. Schließlich wurde das RNA-Präzipitat für max. 10 min. luftgetrocknet und in 20 µl hochreinen Wassers aufgenommen. Die RNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung, jedoch nicht länger als 48 h, bei -80°C gelagert.

2.6.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit der einzelnen RNA-Lösungen wurde vor Verwendung für die Reverse Transkription mit dem Spektralphotometer (Nano Drop 1000 Spektralphotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

2.6.4 Reverse Transkription der RNA

Für die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde das *PrimeScript™ RT* Reagenzien Kit (*Perfect Real Time*) (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) genutzt. Es wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen gemäß Herstellerprotokoll zu 0,5 µg RNA 2 µl 5X *PrimeScript*-Puffer, 0,5 µl Enzym-Mix und 0,5 µl 50 µM Oligo-(dT) Primer hinzugefügt und mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Reverse Transkription erfolgte durch Inkubation für 15 min. bei 37°C im

Thermocycler T3 (Biometra, Göttingen, Deutschland), worauf eine Temperaturerhöhung von wenigen Sekunden auf 85°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase folgte, bis zur letztendlichen Abkühlung auf 4°C. Die so erhaltene cDNA-Lösung wurde durch Zugabe von 40 µl hochreinen Wassers verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) lässt sich eine Aussage über die Menge der untersuchten cDNA und somit über die Expression des dazugehörigen Proteins in den Keratinozyten treffen. Dies ist möglich, indem Fluoreszenzmarkierungen in die PCR-Produkte eingebaut und in Echtzeit detektiert werden. Die qPCR erfolgte im *StepOne Plus* Echtzeit-PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Als fluoreszierender Farbstoff wurde *SYBR® Green* (Applied Biosystems) verwendet, welcher sich in doppelsträngige DNA einlagert und dessen Fluoreszenz in jedem Zyklus am Ende der Elongation gemessen wurde. Da die Einlagerung in doppelsträngige DNA nicht spezifisch erfolgt, wurden zum Ausschluss falscher Amplifikationsprodukte Schmelzkurzvenanalysen durchgeführt. Zur qPCR wurden 10 µl Ansätze in 96-Loch-Platten (*Crystal PCR 96* Lochplatten, Biolab Products) hergestellt und mit selbstklebender Folie (*MicroAmp Optical Adhesive Film*, Applied Biosystems) bedeckt. Bei geringer Probenanzahl wurde auf PCR-Reaktionsgefäß-Streifen mit dazugehörigem Verschlussstreifen (*MicroAmp Fast Reaction Tubes* mit *MicroAmp Optical 8-Cap Strip*, Applied Biosystems) zurückgegriffen. Ein 10 µl Ansatz bestand aus 1 µl cDNA, 5,2 µl *SYBR® Premix Ex Taq™ II* (Takara Bio Inc.), 3 µl hochreinen Wassers und je 0,4 µl des jeweiligen 10 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimers. Eine Tabelle mit allen verwendeten Primerpaaren findet sich zu Anfang dieses Kapitels (2.6.1). Die Ansätze wurden durchgemischt und anschließend auf den Boden der 96-Loch-Platte zentrifugiert. Im PCR-System wurde ein Zweischnittprogramm durchgeführt, beginnend mit der Denaturierung der cDNA bei 95°C für 30 sek., gefolgt von der Anlagerung der Primer und der ersten Elongationsphase bei 66°C. Alle folgenden Denaturierungsphasen erfolgten für 5 sek. bei 95°C. Während der Zyklen 2-7 wurde die Temperatur der Elongationsphase jeweils um 1°C verringert bis schließlich die Elongationsphasen

der Zyklen 7-47 konstant bei 60°C erfolgten. Die Schmelzkurvenanalysen erfolgten im Anschluss an die qPCR durch schrittweise Temperaturerhöhung von 60 auf 95°C. Neben der jeweiligen cDNA eines antimikrobiellen Peptids wurde zusätzlich die des ribosomalen Proteins 38 (RP38) untersucht. Diese diente dabei als interne Kontrolle, da RP38 in Keratinozyten konstitutiv exprimiert wird. Die relative AMP-Expression ergab sich aus dem Quotient der gemessenen AMP- und RP38-Expression. Für alle verwendeten Primerpaare wurden vor der Verwendung Standardkurven erstellt.

2.7 HBD-2-ELISA

Zur Quantifizierung von hBD-2-Proteinkonzentrationen in Zellkulturüberständen wurde ein hochsensitiver "Sandwich"-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, Enzym-vermitteltes immunologisches Nachweisverfahren) durchgeführt, um Informationen über die hBD-2-Sekretion durch Keratinozyten zu erhalten. Die Keratinozyten wurden wie beschrieben in 12-Loch-Platten kultiviert, ggf. mit spezifischen Inhibitoren behandelt und stimuliert (s. 2.5). Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und bei -20°C bis zu ihrer Verwendung kryoasserviert. Für den ELISA wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten (*Nunc Maxisorp*TM, Thermo Fisher Scientific) mit 50 µl pro Loch eines affinitätsgereinigten, polyklonalen Ziegen-hBD-2-Antikörper beschichtet (PeproTech, Rocky Hill, USA) und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach Verwerfen der Flüssigkeit aus den Reaktionslöchern, wurden durch Hinzugabe von 200 µl einer 1 % bovinen Serumalbumin Lösung (BSA) in PBS pro Reaktionsloch bei 37°C für 10 min. unspezifische Proteinbindungsstellen geblockt. Die Flüssigkeit wurde erneut verworfen und die Reaktionslöcher dreimal mit Waschpuffer (0,05 % Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in PBS) in einem *ELx50* Streifenwascher (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) gewaschen. Nun wurden je 50 µl der zu testenden Zellkulturüberstände in die Reaktionslöcher gegeben sowie eine als Standard dienende hBD-2 Konzentrationsreihe mit sich in 6 Schritten jeweils halbierenden Konzentrationen angefangen bei 10,00 ng/ml sowie ein Reaktionsloch mit 0,00 ng/ml hBD-2. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Flüssigkeit verworfen und erneut dreimal mit oben genanntem Waschpuffer gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit 50 µl pro Loch eines biotinylierten Ziegen-hBD-2-

Antikörpers (PeproTech) für 30 min. bei 37°C. Daraufhin wurden die Reaktionslöcher erneut dreimal gewaschen und anschließend 50 µl pro Loch eines Streptavidin-Konjugats (Roche GmbH, 1:10000 in PBS + 0.1 % Tween® 20) hinzugefügt und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die an das Streptavidin gebundene Peroxidase ermöglicht durch Hinzugabe eines geeigneten Substrats die Quantifizierung des Enzyms, welche sich auf Grund des Einsatzes spezifischer hBD-2-Antikörper proportional zur Menge des vorhandenen hBD-2 zeigt. Zunächst wurde eine erneute dreimalige Waschung durchgeführt, bevor durch Hinzugabe von 50 µl Diammonium-2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure (ABTS) die Färbereaktion ausgelöst und durch eine Extinktionsmessung bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (*Sunrise*, Tecan, Crailsheim, Deutschland) unter Lichtausschluss quantifiziert wurde. Anhand der Standardkurve konnten so die hBD-2-Konzentrationen bestimmt werden.

Obwohl der ELISA als erprobtes Nachweisverfahren für hBD-2 für die Ergebnisergebnisgewinnung im Rahmen dieser Arbeit genutzt werden konnte, war im Falle von hBD-3 kein zuverlässiger Nachweis im ELISA möglich. Die auf wiederholten Tests beruhenden Erfahrungen der Arbeitsgruppe Harder der Universitätshautklinik Kiel haben gezeigt, dass selbst große Mengen hBD-3 (bis 100 ng/ml) nach Übernachtinkubation im ELISA nicht mehr messbar waren. Eine mögliche Erklärung dafür bieten die biochemischen Eigenschaften von hBD-3, welches als stark kationisches Peptid (Dhople et al. 2006) leicht an Kunststoffoberflächen, wie etwa Wände von Reaktionslöchern oder Eppendorf-Reaktionsgefäßen, bindet und so bereits vor der Detektion im ELISA aus dem Zellkulturüberstand entfernt werden könnte. Daher wurden zum Nachweis einer möglichen hBD-3-Expression durch Keratinozyten die im folgenden Abschnitt beschriebenen Genreporterexperimente durchgeführt.

2.8 Luziferase-Genreporter-Experimente

2.8.1 Funktionsprinzip

Zur weiteren Untersuchung der PRGF-vermittelten AMP-Expression bzw. der daran beteiligten Transkriptionsfaktoren, wurde die Aktivierung des hBD-2- bzw. hBD-3-Promotors in Genreporter-Experimenten genutzt. Grundsätzlich wurden die

Keratinozyten mit zwei verschiedenen Plasmiden nach zuvor beschriebenem Vorgehen transfiziert (s. 2.4.2). Der pGL4-Vektor (Promega) kodiert für die Renilla-Luziferase, ein Enzym isoliert aus der Korallenart *Renilla reniformis*. Durch die Eigenschaften des vorgeschalteten Promotors, wird dieses Enzym in den Zellen konstitutiv und unabhängig von äußeren Stimuli exprimiert. Der Renilla-Luziferase-Vektor wurde in alle Zellen eingebracht und dient somit als Kontrolle. Die Renilla-Luziferase katalysiert die Umsetzung von Coelenterazin zu Coelenteramid unter Verbrauch von Sauerstoff. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, welches in einem Luminometer quantifiziert werden kann. Bei einem Überangebot an Substrat ist die Menge des emittierten Lichts dabei direkt proportional zur Menge des vorhandenen Enzyms und der Zelldichte (Sherf et al. 1996).

Zusätzlich wurden die Keratinozyten mit einem zweiten Vektor transfiziert, welcher stets für das Enzym Firefly-Luziferase kodierte. Dem für die Firefly-Luziferase kodierenden Plasmidabschnitt, war dabei die hBD-2- bzw. die hBD-3-Promotorregion vorgeschaltet. Die verwendeten Promotorkonstrukte wurden von der Arbeitsgruppe Harder zur Verfügung gestellt. Die Einklonierung der verschiedenen Promotorregionen in den Plasmidvektor sowie die gezielte Mutation (*site-directed mutagenesis*) bestimmter Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen des hBD-2-Promotors wurde im Rahmen früherer Arbeiten der Arbeitsgruppe Harder durchgeführt (Näbert 2006, Wehkamp et al. 2006). Informationen zu den verwendeten Materialien und der angewandten Methodik sind dort zu entnehmen. Auf die weiteren, zum Verständnis wichtigen Vektor- und Promotoreigenschaften wird aus Gründen der Sinnerschließung erst im Ergebnisteil dieser Arbeit eingegangen werden.

Führt also ein externer Stimulus, in diesem Fall PRGF, zur Aktivierung der hBD-2- bzw. hBD-3-Promotorregion und leitet so die Transkription ein, wird die Firefly-Luziferase exprimiert. Die Firefly-Luziferase ist ein aus Leuchtkäfern (*Photinus pyralis*) isoliertes Enzym, welches in Anwesenheit von Magnesium sein Substrat D-Luciferin zu Oxyluciferin oxidiert und dabei ATP und Sauerstoff verbraucht. Während dieser Reaktion wird Licht emittiert, welches im Luminometer quantifiziert werden kann und somit Aufschluss über die Aktivierung der verwendeten Promotorkonstrukte gibt (Berger et al. 2008).

Die unterschiedlichen Substrate der beiden Enzyme machen es möglich ihre Aktivität unabhängig voneinander zu messen. Die Promotoraktivität wurde errechnet durch das Verhältnis der Aktivität von Firefly- zu Renilla-Luziferase in jeder Probe.

2.8.2 Luziferase-Aktivitätsmessung

Vor Beginn der Luziferase-Aktivitätsmessung wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit 0,5 ml PBS gewaschen. Nun wurden gemäß den Angaben des Herstellers 1 Teil zelllysisierenden Puffers (*Passive lysis buffer*, Promega) in 4 Teilen hochreinen Wassers verdünnt und 250 µl dieser Lösung in jede Kavität auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde die 12-Loch-Platte für mind. 30 min. bei mittlerer Stufe auf dem Schüttelinkubator (GFL, Burgwedel, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert, um eine ausreichende Lyse der Zellen zu gewährleisten. Die Luziferase-Aktivitätsmessung wurde nun nach Angaben des Herstellers mit Hilfe eines Luziferase-Reporter-Analysekits (*PromoKine Luciferase Reporter Assay Kit*, PromoCell) durchgeführt. Die Messung der Aktivität im Luminometer (*TD-20/20 luminometer*, Turner Design, San Jose, USA) erfolgte stets mit einer Verzögerung von 3 Sekunden über einen Zeitraum von 10 Sekunden. Die gewonnenen Daten wurden schließlich in eine *Excel*[®]-Datei übertragen und in Verhältnis zueinander gesetzt.

2.9 PRF-Studie *in vivo*

2.9.1 Allgemeines

Um die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse der *in vitro*-Versuchsreihen auf ihre Relevanz *in vivo* zu überprüfen, wurde eine Studie mit 5 Probanden durchgeführt. Das Patientenkollektiv bestand aus männlichen Nichtrauchern zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr, bei denen keinerlei Hauterkrankungen oder Allergien bekannt waren. Im Rahmen der Studie wurde an Stelle von PRGF sogenanntes Plättchen-reiches Fibrin der Firma Vivostat (*platelet-rich Fibrin*, Vivostat PRF[®], Alleroed, Dänemark) als Stimulus eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein autologes Thrombozytenkonzentrat in einer Fibrinmatrix. Die Konzentration der Thrombozyten ist dabei etwa 7-fach höher als im Vollblut des Spenders, liegt also bei gesunden

Probanden bei ≥ 1 Million Thrombozyten pro Mikroliter (Angaben des Herstellers) und somit im Bereich der zur PRGF-Herstellung verwendeten Thrombozytenkonzentrate. Das Fibrin gibt dem ansonsten flüssigen Konzentrat eine geleeartige Konsistenz, wodurch die Haftung am Ort der Applikation und somit die topische Wirkung verbessert werden soll. Zudem stabilisiert es die Thrombozyten, wodurch die Freisetzung der enthaltenen Wachstumsfaktoren über einen Zeitraum von mehreren Tagen hinweg erfolgt. Jedem Probanden wurden initial 120ml Blut abgenommen und durch einen automatischen Zentrifugationsprozess wurden im Vivostat PRF[®]-System daraus binnen 23 min. 5-6 ml PRF hergestellt. Dieses kann dann mit einem Sprühstift auf die Wunde aufgetragen werden. Zwischen den einzelnen Applikationen wurde das PRF bei -20°C gelagert.

Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel in Übereinstimmung mit den Helsinki-Leitlinien genehmigt. Alle Studienteilnehmer wurden über potentielle Risiken aufgeklärt und bestätigten schriftlich ihre Zustimmung zur Teilnahme.

2.9.2 Studiendesign

Zu Beginn der Studie (Tag 0) wurden allen Studienteilnehmern bilaterale gluteale Stanzbiopsien mit einem Durchmesser von 4 mm unter Lokalanästhesie entnommen. Die Entnahme erfolgte im oberen Drittel der Glutealregion etwa 10 cm lateral der Rima ani. Die Stanzbiopsien der einen Seite (links) wurden für die spätere RNA-Isolierung und Genexpressionsanalyse in einem RNA-stabilisierendem Reagenz (RNA^{later}[™], Qiagen, Hilden, Deutschland) bei -20°C präserviert. Die Stanzbiopsie der anderen Seite (rechts) wurde in Formalin für die spätere Immunhistochemie fixiert. Sobald nach Kompression der Wunde die Blutung abgeklungen war, wurde die linksseitige Wunde mit einigen Tropfen 0,9 % Natriumchlorid(NaCl)-Lösung behandelt, während auf die rechtsseitige Wunde mit dem Sprühstift des Vivostat-Systems 0,2 ml PRF[®] aufgetragen wurden. Beide Wunden wurden daraufhin mit einem Biatain[®]-Silikon Pflaster (Coloplast GmbH, Hamburg, Deutschland) und dieses wiederum mit einem Fixierpflaster (Fixomull[®] stretch, BSNmedical, Hannover, Deutschland) abgedeckt. Nach 5 Tagen (Tag 5) wurden die Wunden erneut mit NaCl-Lösung bzw. Vivostat PRF[®] behandelt und wie zuvor beschrieben abgedeckt.

Nach insgesamt 10 Tagen (Tag 10) wurden die Wundareale mit einer 6 mm durchmessenden Stanzbiopsie unter Lokalanästhesie entnommen und das entstandene ringförmige Biopsat mittig durchtrennt, sodass von der rechten und linken Seite je zwei halbkreisförmige Hautbiopsien vorlagen. Je ein halbkreisförmiges Biopsat wurde in RNA^{later}[®] und eines in Formalin für die weitere Aufarbeitung in der mRNA-Expressionsanalyse bzw. Immunhistochemie gelagert. Die frischen Wunden wurden durch eine Naht verschlossen und die Probanden nach 7 Wochen zur Kontrolle erneut einbestellt. Für den 10-tägigen Zeitraum der Studie verzichteten die Teilnehmer auf Sport und Badeaktivitäten. Bei keinem der Teilnehmer löste sich das Pflaster von der Wunde, noch kam es zu Komplikationen im Verlauf.

2.9.3 Verarbeitung der Biopsien

2.9.3.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA aus den gewonnen Biopsien wurde das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) verwendet. Die Biopsien wurden zunächst aufgetaut und durch vorsichtiges Abtupfen vom RNA^{later}[™] befreit. Die Dermis und das subkutane Fettgewebe wurden von der Epidermis getrennt und letztere mit dem Skalpell bestmöglich zerkleinert. Zur weiteren Auftrennung und Homogenisierung wurden die Proben gemäß Herstellerangaben mit 350 µl RLT-Puffer (Lysepuffer) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol für 30 sek. in *TissueRuptor-Tubes* im Rotationsschüttler lysiert und mit 350 µl 70 % Ethanol gemischt. Die entstandene Zelllysate-Lösung wurde gemäß Herstellerprotokoll durch verschiedene Wasch- und Filtrationsschritte aufgearbeitet bis schließlich die isolierte RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser aus dem bereitgestellten Filtersystem eluiert werden konnte. Die Konzentration der Proben wurde gemessen, die RNA in cDNA umgeschrieben und Genexpressionslevel mittels Echtzeit-PCR untersucht. (s. 2.6.3-2.6.5)

2.9.3.2 Immunhistochemie

2.9.3.2.1 Verwendete Antikörper

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
	HBD-2	Anti-Ziege biotinyliert
Spezies	Ziege	Kaninchen
Verdünnung	1:500	1:500
Hersteller	Pepero Tech Cell Concepts (Umkirch, Deutschland)	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
	HBD-3	Anti-Kaninchen biotinyliert
Spezies	Kaninchen	Schwein
Verdünnung	1:500	1:300
Hersteller	Pepero Tech Cell Concepts	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)

Tab. 2.9-1 Antikörper zur immunhistologischen Untersuchung von Hautbiopsien.

2.9.3.2.2 Prinzip und Ablauf

Die immunhistologische Färbung zum Nachweis der Expression von hBD-2 und hBD-3 in den entnommenen Hautbiopsien erfolgte nach dem Prinzip der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex). Dafür wurde zunächst ein Primärantikörper zur Markierung des entsprechenden antimikrobiellen Peptids eingesetzt, an den im nächsten Schritt ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet, an den wiederum enzymmarkierte Avidin-Biotin-Komplexe binden. Durch Hinzugabe eines Substrats des Enzyms Merrettichperoxidase erfolgt die Sichtbarmachung der Bindestellen.

Nach Entnahme wurden die in 4 % Formalin präservierten Hautbiopsien zunächst durch die histologische Abteilung der Universitätshautklinik Kiel in Paraffin eingebettet. Daraufhin wurden 6 µm dicke Feinschnitte der eingebetteten Biopsate mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt und auf Objektträger (SuperFrost Plus®, Braunschweig, Deutschland) übertragen. Die Objektträger wurden vor der weiteren Aufarbeitung für eine Stunde bei 63°C im Trockenschrank inkubiert. Durch zweimalige Inkubation in Xylolersatz (Roti® Histol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

für 10 min., gefolgt von je 2-minütiger Inkubation in abnehmend konzentriertem Alkohol (2 x 2 min. bei 100 %, 2 x 2 min. bei 96 %, 1 x 2 min. bei 80 %, 1 x 2 min. bei 70 %) und abschließender Inkubation in destilliertem Wasser für 10 min. wurden die Präparate vom Paraffin befreit. Anschließend wurde aus 0,01 M Citronensäure und 0,1 M Natriumcitrat ein 0,01 M Citratpuffer (pH 6,0) hergestellt, in welchem die Schnitte für 25 min. dampfgegart und so demaskiert wurden. Nach weiteren 60 min. wurden die Schnitte aus der abgekühlten Flüssigkeit entnommen und für 5 min. in einer TBS/Tween®-Lösung bestehend aus 90 ml Wasser, 10 ml TBS-Puffer (pH 7,5) (8,763 g NaCl (0,15 M), 7,88 g Tris/HCl (0,05 M), 6,5 ml NaOH (1 M)) und 50 µl Tween® 20 gewaschen.

Die Schnitte auf den Objektträgern wurden nun mit einem PAP-Stift eingekreist, um ein Abfließen der nachfolgend aufgetragenen Flüssigkeiten zu verhindern. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation der Schnitte mit TBS-Puffer inklusive 1 % BSA für 20 min. Nun wurden die Schnitte von der Lösung befreit, indem die Flüssigkeit durch Anhalten eines Labortuchs abgesaugt wurde. Nachfolgend wurden die Schnitte mit dem jeweiligen spezifischen polyklonalen primären Antikörper über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal für 3 min. in TBS/Tween®-Lösung gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Negativkontrollen wurden separat gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem jeweiligen polyklonalen Sekundärantikörper für 30 min. inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte erneut zweimal für 3 min. in TBS/Tween®-Lösung gewaschen. Die Auftragung des AB-Komplexes erfolgte, indem das VECTASTAIN® ABC Kit PK-6100 nach der Anleitung des Herstellers angesetzt und für 30 min. auf die Hautschnitte gegeben wurde. Es erfolgte die erneute Waschung der Schnitte in TBS/Tween®-Lösung für 2 x 3 Minuten. Nun wurde das Peroxidase-Substrat aufgetragen und für 4 min. in der Dunkelkammer inkubiert. Das Substrat entstammte dem Vector® NovaRED™ Peroxidase Substrate Kit SK-4800 (Vector, Burlingame, USA) und wurde unmittelbar zuvor nach den Angaben des Herstellers angesetzt. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min. in TBS/Tween®-Lösung gewaschen und kurz in destilliertes Wasser getaucht. Nun erfolgte die Gegenfärbung der Schnitte mit 30 % Hämalaun (Merck) in destilliertem Wasser für 30 sek. und anschließender Spülung mit fließendem Leitungswasser für 7 min.. Anschließend wurden die Schnitte in

aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und zweimal für je 2 min. in Xylolersatz inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte mit Eukitt® (Kindler, Freiburg, Deutschland) abgedeckt.

2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit der von *GraphPad Software* (San Diego, USA) kostenlos zur Verfügung gestellten Rechner (*QuickCalcs*, www.graphpad.com). Statistische Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden anhand des ungepaarten Studentischen t-Tests ermittelt. Die zur Analyse genutzten Messwerte entsprechen, sofern im Abbildungstext nicht ausdrücklich anders angegeben, Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen ($n = 3$). Methodische Zweifel an der Verwendung des t-Tests bei kleinen Stichprobengrößen (n) auf Grund einer niedrigen Teststärke ($1 - \beta$), gleichbedeutend mit einer hohen Wahrscheinlichkeit einen Fehler 2. Art zu begehen (β), der Gefahr also die Nullhypothese anzuerkennen, obwohl die Alternativhypothese korrekt ist, oder aber des Einbringens falsch-positiver Ergebnisse, welche zum Verwerfen der Nullhypothese und Anerkennen der Alternativhypothese führen können, dem Fehler 1. Art (α), sind fachgebietsübergreifend in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben worden. Jedoch konnte de Winter (2013) in einer Simulationsstudie zeigen, dass der t-Test auch bei extrem kleinen Stichprobengrößen bis hin zu ($n = 2$) ohne Bedenken verwendet werden kann, solange eine ausreichend große Effektstärke zu erwarten ist. Ähnliche Schlüsse konnte Janusonis (2009) zuvor für niedrige Fallzahlen ($n = 3-5$) in der neurobiologischen Forschung ziehen.

2.11 Darstellung der Ergebnisse

Die im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellten Abbildungen zu sämtlichen Experimenten mit primären Keratinozyten stellen repräsentative Ergebnisse für mehrfach durchgeführte unabhängige Versuche dar, die vergleichbare Resultate erbrachten. Versuchsreihen hingegen, welche in sich abweichende bzw. keine eindeutigen Resultate hervorbrachten, wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Als Fehlerbalken eingezeichnet sind die Standardabweichungen der Messdaten. Die

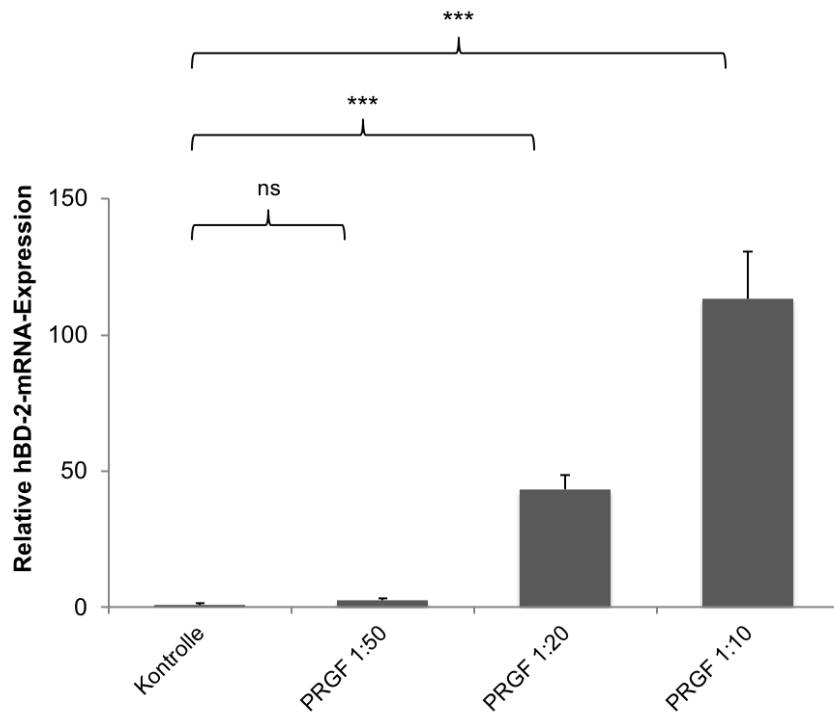
Abbildungen wurden mit dem Programm Excel® 2007 (Microsoft, Redmond, USA) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 PRGF stimuliert konzentrationsabhängig die Expression von hBD-2 und hBD-3 in primären Keratinozyten

Um die Hypothese der Induktion von hBD-2 und hBD-3 durch PRGF zu testen, wurden humane primäre Keratinozyten in Zellkulturversuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen von PRGF (1:10, 1:20 und 1:50) über 24 h hinweg stimuliert. Der Einfluss auf die Expression der beiden antimikrobiellen Peptide wurde anschließend auf mRNA-Ebene mittels Echtzeit-PCR, sowie im Fall von hBD-2 anhand der Menge von hBD-2 im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Auf Grund der im Methodikteil dieser Arbeit (s. 2.7) beschriebenen Problematik bezüglich der Nachweisbarkeit von hBD-3 im ELISA, ist zum weiteren Nachweis der hBD-3-Induktion eine Reihe von Genreporter-Experimenten durchgeführt worden, deren Ergebnisse in einem nachfolgenden Abschnitt (s. 3.7) beschrieben werden. Die stärkste Expression beider humaner beta-Defensine auf mRNA-Ebene zeigte sich bei einer PRGF-Konzentration von 10 %, mit einer etwa 110-fachen Induktion von hBD-2 und einer etwa 250-fachen Induktion von hBD-3. Eine deutliche, wenn auch wesentlich geringere Induktion beider Proteine war bei einer Konzentration von 5 % PRGF im Stimulationsmedium zu verzeichnen, während bei einer Konzentration von 2 % kein wesentlicher Anstieg der hBD-2- und hBD-3-Expression zu verzeichnen war. (Abb. 3.1-1) Diese Konzentrationsabhängigkeit zeigte sich auch an der im ELISA detektierten Menge von hBD-2 (Abb. 3.1-2). Die in den Stimulationsversuchen verwendeten PRGF-Überstände verschiedener Spender wurden mittels ELISA auf das Vorkommen von hBD-2 geprüft. Die Konzentrationen beider Proteine waren dabei stets nah an bzw. unter der Detektionsgrenze, so dass davon auszugehen ist, dass die gemessenen Konzentrationen beider Proteine auf die Expression in Keratinozyten und nicht auf das PRGF als solches zurückzuführen sind.

A



B

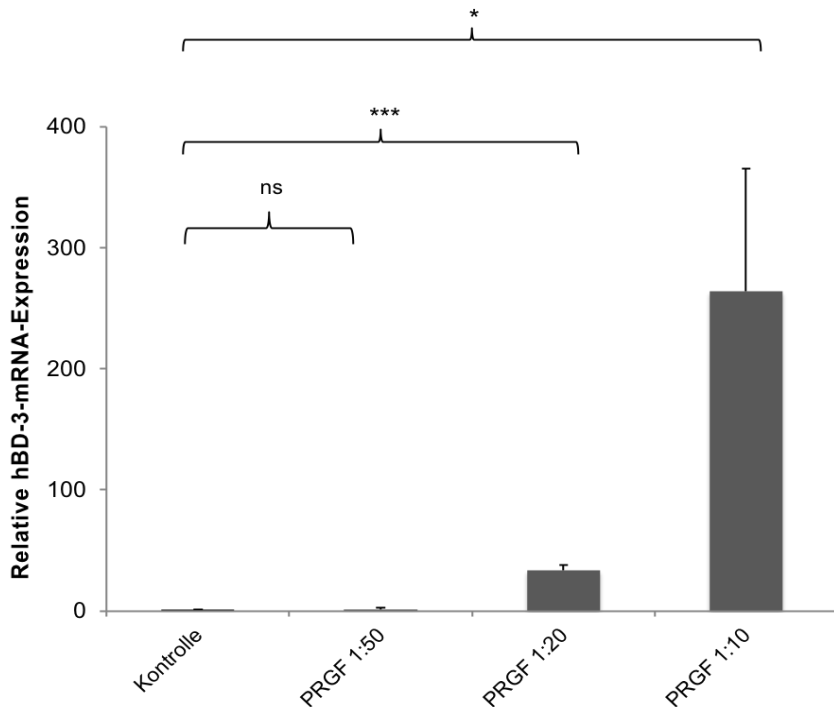


Abb. 3.1-1 Konzentrationsabhängige hBD-2- und hBD-3-Induktion durch PRGF Primäre Keratinozyten wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen PRGF stimuliert (1:50, 1:20 und 1:10 verdünnt in KGM 2 +-). Dargestellt ist die zu RP38 relativierte hBD-2- (A) bzw. hBD-3-mRNA-Expression (B) als Vielfaches zur Kontrolle (=1) mit Standardabweichungen

aus drei Parallelansätzen. Die Abbildung stellt repräsentativ das Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen dar. Es zeigt sich eine verstärkte Expression der hBD-2- bzw. hBD-3-mRNA mit zunehmender Konzentration des Stimulus PRGF. Die Unterschiede der hBD-2- bzw. hBD-3-mRNA-Expression in mit einer bestimmten PRGF-Konzentration stimulierten Zellen, im Vergleich zur Expression in unstimulierten Zellen (Kontrolle), wurden unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

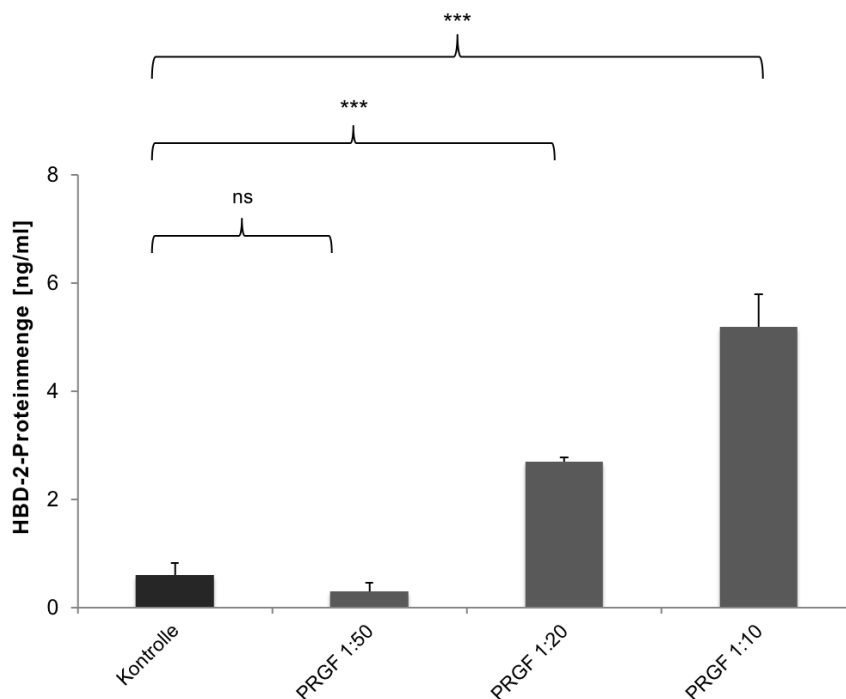
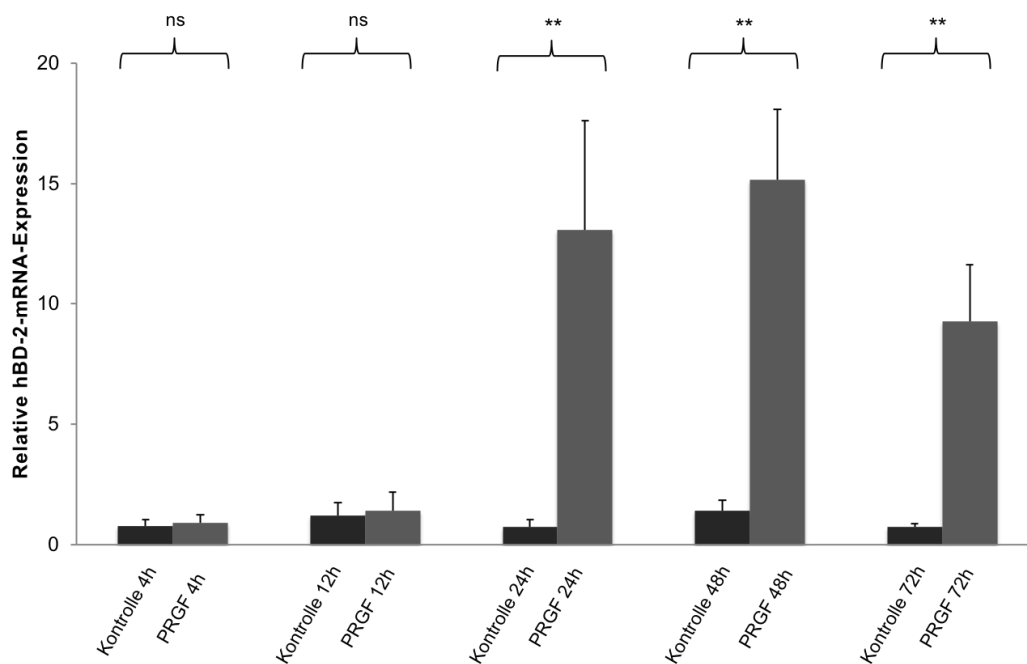


Abb. 3.1-2 Konzentrationsabhängige hBD-2-Sekretion durch Keratinozyten nach Stimulation mit PRGF Primäre Keratinozyten wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen PRGF stimuliert (1:50, 1:20 und 1:10 verdünnt in KGM 2 --). Anschließend wurde die hBD-2-Protein-Freisetzung in den Kulturmediumüberständen mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die hBD-2-Proteinkonzentration im Kulturmediumüberstand als Mittelwert dreier unabhängiger Proben eines Versuches mit Standardabweichung. Die Abbildung stellt repräsentativ das Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen dar. Es zeigt sich eine verstärkte Freisetzung von hBD-2 mit zunehmender Konzentration des Stimulus PRGF. Die Unterschiede der hBD-2-Protein-Freisetzung durch mit einer bestimmten PRGF-Konzentration stimulierte Zellen, im Vergleich zur Freisetzung durch unstimulierte Zellen (Kontrolle), wurden unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

3.2 Die PRGF-vermittelte Expression von hBD-2 und hBD-3 ist am stärksten nach 24 bis 48 Stunden

Um herauszufinden in welchem Zeitraum die PRGF-vermittelte hBD-2- und hBD-3-Expression am stärksten ist, wurden nun Stimulationsversuche mit PRGF-Überständen im Verhältnis 1:10 durchgeführt, welche entweder nach 4, 12, 24, 48 oder 72 Stunden beendet wurden. Dabei zeigte sich die stärkste Expression auf mRNA-Ebene nach 24 bis 48 Stunden für hBD-2 (Abb. 3.2-1A). Die größten Mengen des Proteins im hBD-2-ELISA ließen sich nach 48 bis 72 Stunden nachweisen (Abb. 3.2-2). Die hBD-3-mRNA-Expression war nach 24 Stunden signifikant erhöht, und hielt sich auf hohem Niveau auch bei Analyse nach 48 und 72 Stunden (Abb. 3.2-1B). Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle folgenden Stimulationsversuche über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt.

A



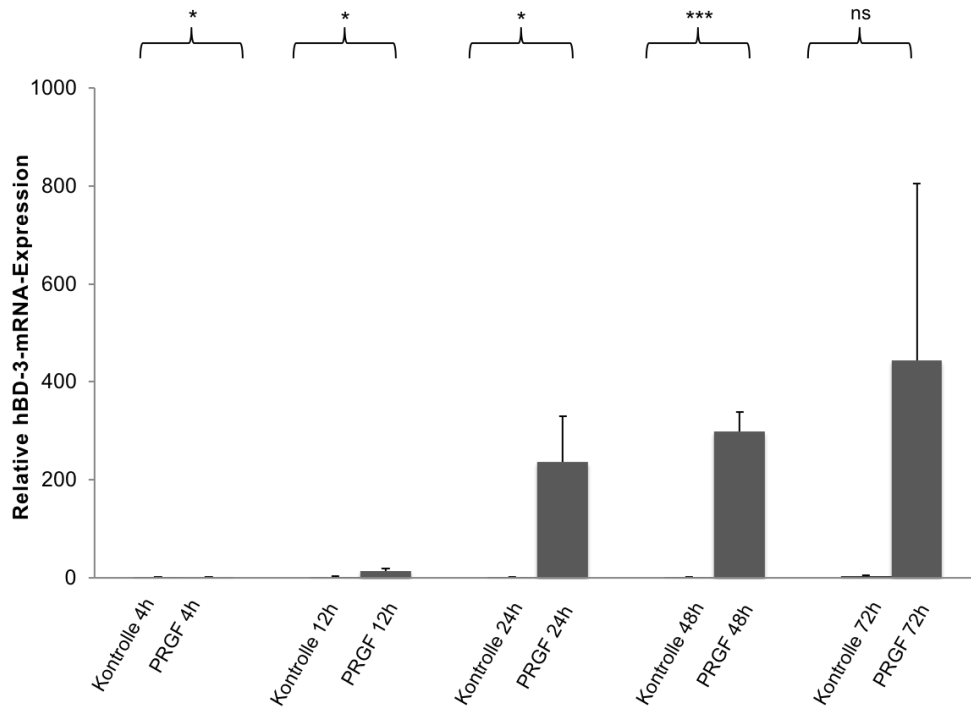
B

Abb. 3.2-1 Die PRGF-vermittelte Expression von hBD-2 und hBD-3 ist am stärksten nach 24 bis 72 h. Primäre Keratinozyten wurden mit PRGF (1:10 verdünnt in KGM 2 --) für 4, 12, 24, 48 und 72 h stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression mittels quantitativer Echtzeit-PCR gemessen. Dargestellt ist die zu RP38 relativierte hBD-2- (A) bzw. hBD-3-mRNA-Expression (B) als Vielfaches zur Kontrolle (=1) mit Standardabweichungen aus drei Parallelansätzen. Die Abbildung stellt repräsentativ das Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen dar. Die stärkste Expression der hBD-2- bzw. hBD-3-mRNA fand nach 24-72 h statt. Die Unterschiede der hBD-2- bzw. hBD-3-mRNA-Expression zu bestimmten Zeitpunkten, im Vergleich zur Expression in unstimulierten Zellen (Kontrolle) zum selben Zeitpunkt, wurden unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

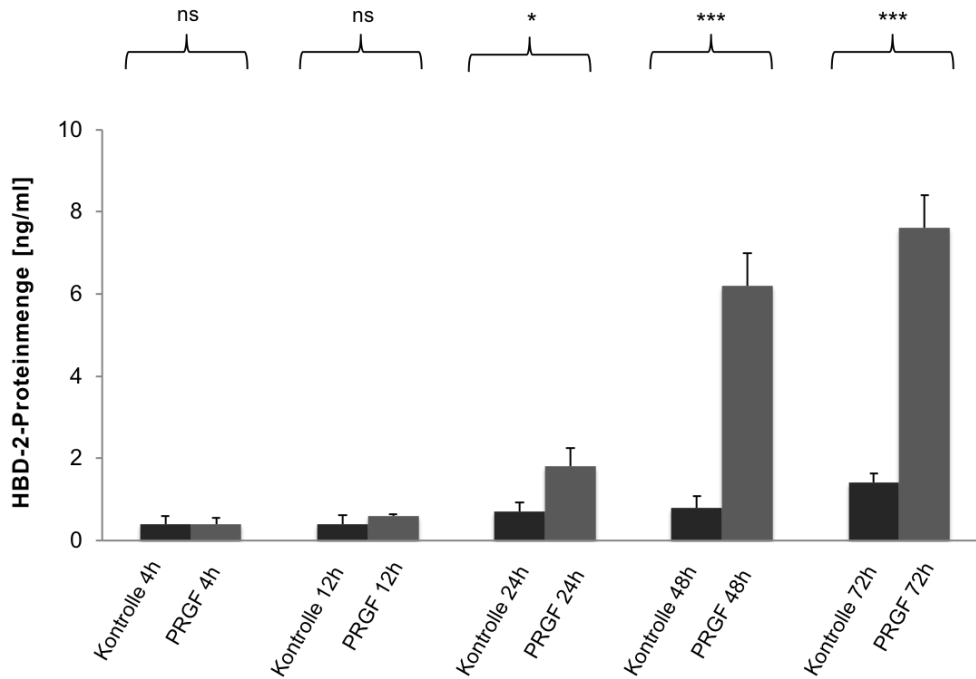
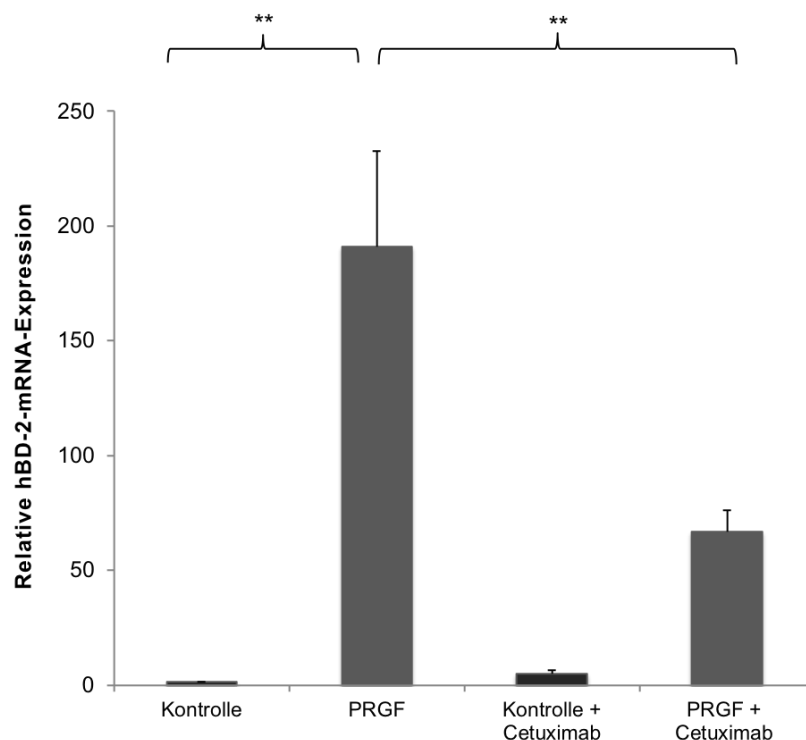


Abb. 3.2-2 Die hBD-2-Protein-Sekretion durch Keratinozyten nach Stimulation mit PRGF ist nach 48-72 h am stärksten. Primäre Keratinozyten wurden für 4, 12, 24, 48 und 72 h mit PRGF stimuliert (1:10 verdünnt in KGM 2 --). Anschließend wurde die hBD-2-Protein-Freisetzung in den Kulturmediumüberständen mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die hBD-2-Proteinkonzentration im Kulturmediumüberstand als Mittelwert dreier unabhängiger Proben eines Versuches mit Standardabweichung. Die Abbildung stellt repräsentativ das Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen dar. Die Freisetzung von hBD-2 aus den stimulierten Keratinozyten war nach 48-72 h am stärksten. Die Unterschiede der hBD-2-Protein-Freisetzung durch mit einer bestimmten PRGF-Konzentration stimulierte Zellen, im Vergleich zur Freisetzung durch unstimulierte Zellen (Kontrolle), wurden unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

3.3 Die durch PRGF induzierte Expression von hBD-2 und hBD-3 wird zum Teil über den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) vermittelt

Zur Identifizierung möglicher Signaltransduktionswege in der PRGF-vermittelten Expression der untersuchten antimikrobiellen Peptide, wurde in weiteren Stimulationsversuchen der monoklonale Antikörper *Cetuximab* eingesetzt. Dieser blockiert die Bindungsstelle des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors für seine zahlreichen potenziellen Liganden und verhindert somit die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. Unter diesen Bedingungen war eine signifikant verminderte Expression von hBD-2 und hBD-3 in den mit PRGF stimulierten Zellen, verglichen mit der Expression in mit PRGF stimulierten Zellen ohne Antikörperbehandlung zu verzeichnen (Abb. 3.3-1 und Abb. 3.3-2). Die PRGF-vermittelte hBD-2-mRNA-Expression und konsekutiv auch die hBD-2-Freisetzung aus den stimulierten Keratinozyten wurde in Anwesenheit von *Cetuximab* um mehr als 50 % inhibiert, während die hBD-3-mRNA-Expression beinahe vollständig gehemmt wurde.

A



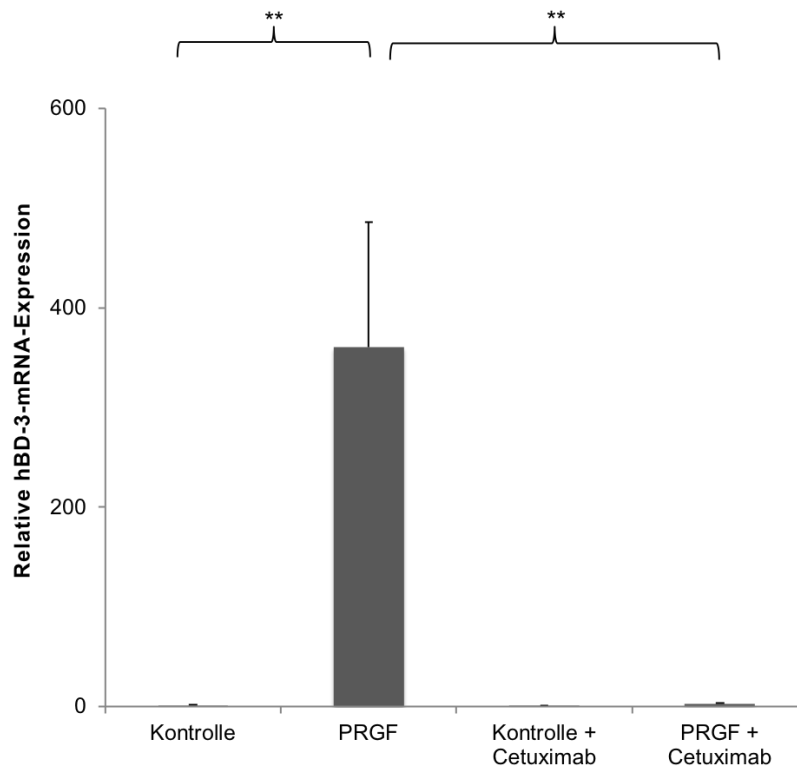
B

Abb. 3.3-1 Die durch PRGF induzierte hBD-2- und hBD-3-Expression wird über den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor vermittelt. Primäre Keratinozyten wurden mit PRGF (1:10 verdünnt in KGM 2 -+-) in An- und Abwesenheit des EGF-Rezeptor-Antikörpers *Cetuximab* (20 µg/ml) für 24 h stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression mittels quantitativer Echtzeit-PCR gemessen. Dargestellt ist die zu RP38 relativierte hBD-2- (A) bzw. hBD-3-mRNA-Expression (B) als Vielfaches zur Kontrolle (=1) mit Standardabweichungen aus drei Parallelansätzen. Die Abbildung stellt repräsentativ das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen dar. Die Unterschiede der hBD-2- bzw. hBD-3-mRNA-Expression in den mit PRGF stimulierten Zellen, im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Kontrolle) bzw. in den mit PRGF stimulierten und mit *Cetuximab* behandelten Zellen, im Vergleich zu den mit PRGF stimulierten Zellen ohne Antikörperzusatz, wurden unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

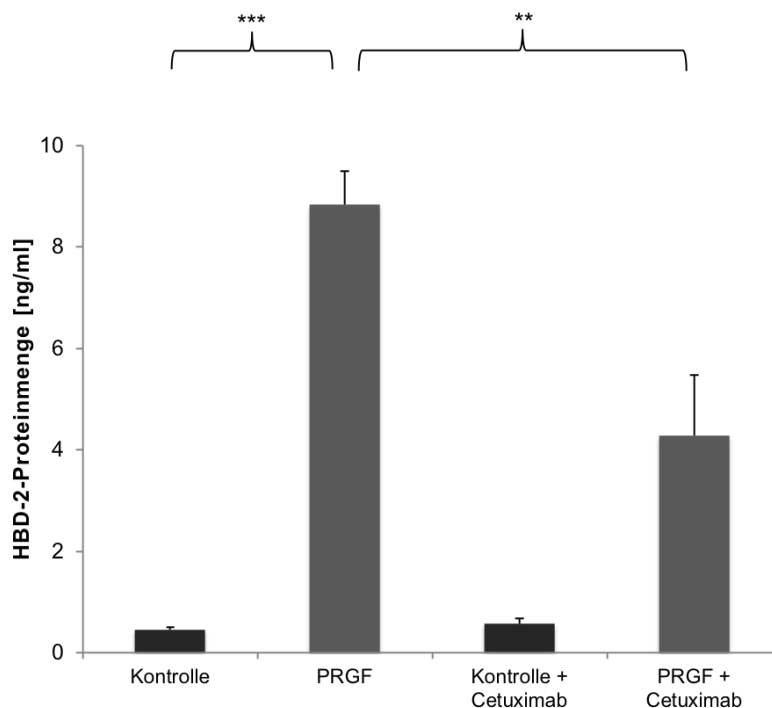


Abb. 3.3-2 Die durch PRGF induzierte hBD-2-Protein-Freisetzung aus Keratinozyten wird über den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor vermittelt. Primäre Keratinozyten wurden mit PRGF (1:10 verdünnt in KGM 2 --) in An- und Abwesenheit des EGF-Rezeptor-Antikörpers *Cetuximab* (20 µg/ml) für 24 h stimuliert. Anschließend wurde die hBD-2-Protein-Freisetzung in den Kulturmediumüberständen mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die hBD-2-Proteinkonzentration im Kulturmediumüberstand als Mittelwert dreier unabhängiger Proben eines Versuches mit Standardabweichung. Die Abbildung stellt repräsentativ das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen dar. Die Unterschiede der hBD-2-Protein-Freisetzung aus den mit PRGF stimulierten Zellen, im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Kontrolle) bzw. aus den mit PRGF stimulierten und mit *Cetuximab* behandelten Zellen, im Vergleich zu den mit PRGF stimulierten Zellen ohne Antikörperzusatz, wurden unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

3.4 Die Stimulation primärer Keratinozyten mit PRGF führt zu einer frühen Expression von Interleukin-6

Die Analyse der Genexpressionmuster von Zytokinen in Keratinozyten nach PRGF-Stimulation, zeigte eine zeitnah gesteigerte Expression von Interleukin-6 (IL-6). Bereits nach 4 Stunden war die IL-6-Expression um etwa den Faktor 20 gesteigert, nach 12 Stunden war die Expression ebenfalls noch deutlich erhöht, wenn auch rückläufig. Nach 24 Stunden war keine nennenswerte Expression von IL-6 mehr zu beobachten (Abb. 3.4).

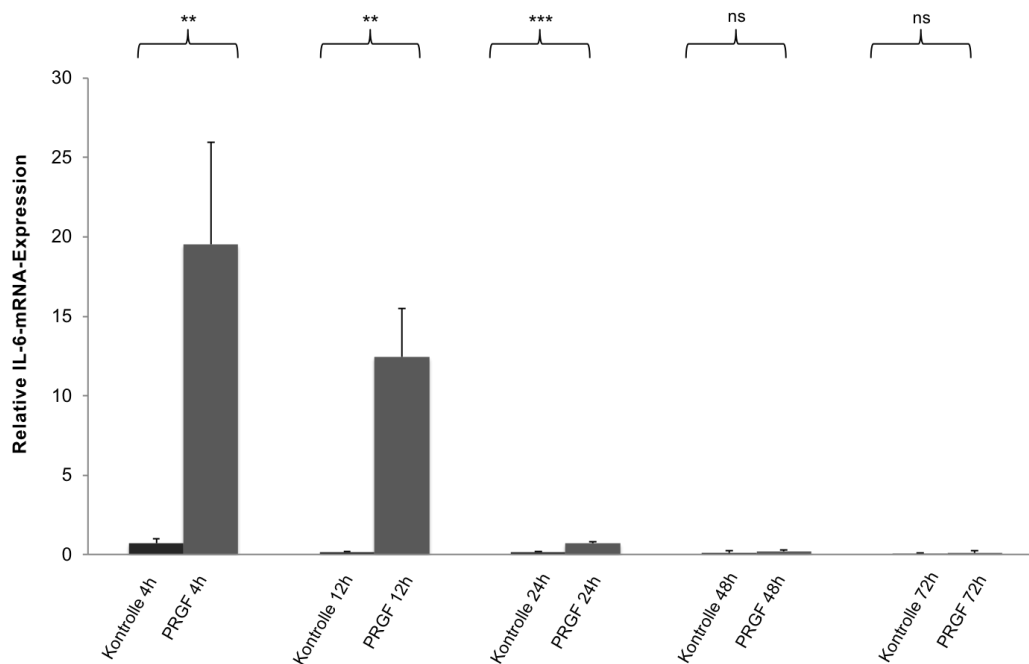


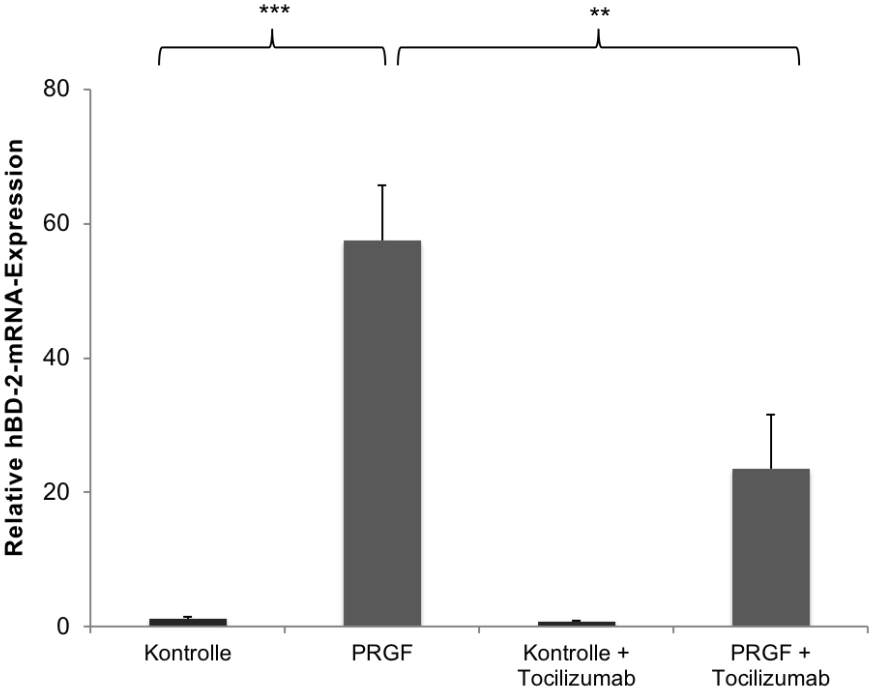
Abb. 3.4-1 Die Stimulation primärer Keratinozyten mit PRGF führt zu einer raschen Expression von Interleukin-6. Primäre Keratinozyten wurden für 4, 12, 24, 48 und 72 h mit PRGF stimuliert (1:10 verdünnt in KGM 2 +-). Anschließend wurde die IL-6-mRNA-Expression in den Kulturmedium-überständen mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die IL-6-Proteinkonzentration im Kulturmediumüberstand als Mittelwert dreier unabhängiger Proben eines Versuches mit Standardabweichung. Die Abbildung stellt repräsentativ das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen dar. Die Unterschiede der IL-6-Protein-Freisetzung durch die mit PRGF stimulierten Zellen, im Vergleich zur Freisetzung durch unstimulierte Zellen (Kontrolle) zum selben Zeitpunkt, wurden unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

3.5 Die PRGF-induzierte Expression von hBD-2 und hBD-3 wird zum Teil durch den Interleukin-6-Rezeptor vermittelt

Um die Auswirkungen der gesteigerten IL-6-Expression auf die Expression der untersuchten antimikrobiellen Peptide hBD-2 und hBD-3 zu untersuchen, wurden weitere Stimulationsversuche unter Einsatz des IL-6-Rezeptor-Antikörpers *Tocilizumab* durchgeführt. Dieser sorgt in ausreichend hoher Konzentration für eine kompetitive Blockade des löslichen sowie des membranständigen IL-6-Rezeptors und verhindert somit die Aktivierung des Rezeptors und der nachgeschalteten Signaltransduktionskette auch in der Anwesenheit von Interleukin-6. Bei Einsatz dieses Antikörpers ließ sich in den mit PRGF stimulierten Zellen eine signifikant

verminderte Expression von sowohl hBD-2, als auch hBD-3 um etwa die Hälfte in der quantitativen Echtzeit-PCR messen. In beiden Fällen trägt also die Aktivierung des IL-6-Rezeptors zumindest teilweise zu der gesteigerten Expression von hBD-2 und hBD-3 in Keratinozyten nach Stimulation mit PRGF bei.

A



B

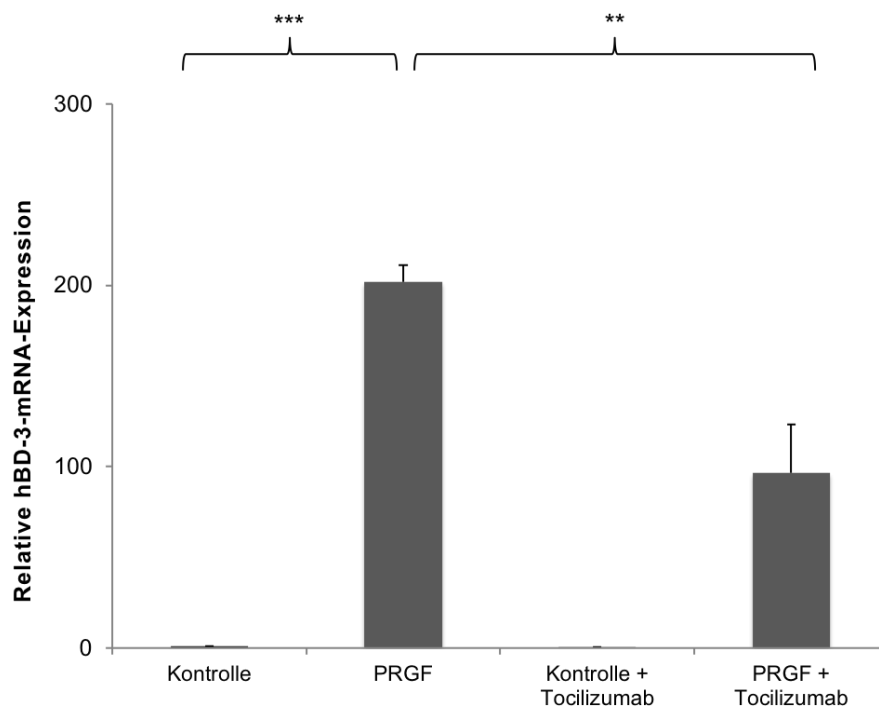


Abb. 3.5-1 Die durch PRGF induzierte hBD-2- und hBD-3-Expression wird über den IL-6-Rezeptor vermittelt. Primäre Keratinozyten wurden mit PRGF (1:10 verdünnt in KGM 2 - +-) in An- und Abwesenheit des IL-6-Rezeptor-Antikörpers *Tocilizumab* (50 µg/ml) für 24 h stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression mittels quantitativer Echtzeit-PCR gemessen. Dargestellt ist die zu RP38 relativierte hBD-2- (A) bzw. hBD-3-mRNA-Expression (B) als Vielfaches zur Kontrolle (=1) mit Standardabweichungen aus drei Parallelansätzen. Die Abbildung stellt repräsentativ das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen dar. Die Unterschiede der hBD-2- bzw. hBD-3-mRNA-Expression in den mit PRGF stimulierten Zellen, im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Kontrolle) bzw. in den mit PRGF stimulierten und mit *Tocilizumab* behandelten Zellen, im Vergleich zu den mit PRGF stimulierten Zellen ohne Antikörperzusatz, wurden unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

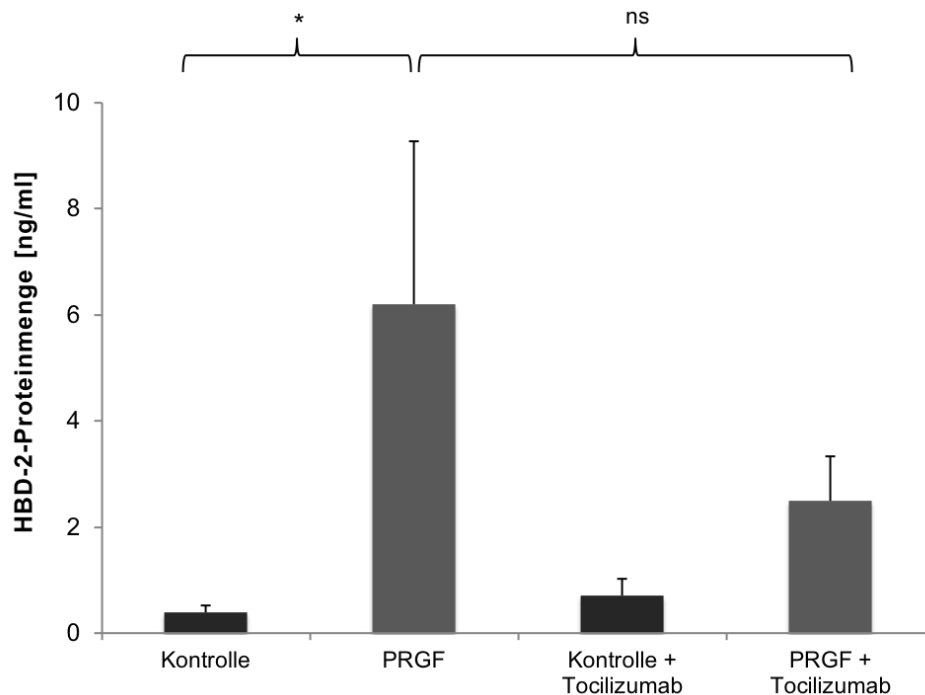


Abb. 3.5-2 Die durch PRGF induzierte hBD-2-Protein-Freisetzung aus Keratinozyten wird über den IL-6-Rezeptor vermittelt. Primäre Keratinozyten wurden mit PRGF (1:10 verdünnt in KGM 2 --) in An- und Abwesenheit des IL-6-Rezeptor-Antikörpers *Tocilizumab* (20 µg/ml) für 24 h stimuliert. Anschließend wurde die hBD-2-Protein-Freisetzung in den Kulturmediumüberständen mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die hBD-2-Proteinkonzentration im Kulturmediumüberstand als Mittelwert dreier unabhängiger Proben eines Versuches mit Standardabweichung. Die Abbildung stellt repräsentativ das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen dar. Die Unterschiede der hBD-2-Protein-Freisetzung aus den mit PRGF stimulierten Zellen, im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Kontrolle) bzw. aus den mit PRGF stimulierten und mit *Tocilizumab* behandelten Zellen, im Vergleich zu den mit PRGF stimulierten Zellen ohne Antikörperzusatz, wurden unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

3.6 Die PRGF-vermittelte hBD-2-Expression ist abhängig vom Transkriptionsfaktor AP-1, jedoch nicht von NF-κB

Um die Bedeutung bestimmter Transkriptionsfaktorbindungsstellen in der PRGF-vermittelten hBD-2-Expression zu ergründen, wurden verschiedene, teils durch gezielte Mutation modifizierte hBD-2-Promotor/Luziferasevektor-Konstrukte in Stimulationsversuchen eingesetzt. Die je 2338 Basenpaare langen hBD-2-Promotorkonstrukte trugen Mutationen entweder an drei Bindungsstellen des NF-κB

(*nuclear factor-κB*) Transkriptionsfaktors, an einer Bindungsstelle des AP-1 (*activator protein-1*) oder an keiner Transkriptionsfaktorbindungsstelle. Nach fehlender bzw. erfolgter Stimulation mit PRGF über 24 Stunden, wurde die Aktivität der Firefly-Luziferase aus den mit verschiedenen Vektoren transfizierten Keratinozyten miteinander verglichen. Die Zellen, die einen nicht-mutierten hBD-2-Promotor enthielten, zeigten dabei eine deutliche Aktivitätssteigerung des Luziferase-Gens. Zudem wurde deutlich, dass die Mutation der drei NF-κB-Bindungsstellen keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des Promotors haben, während eine mutierte AP-1-Bindungsstelle eine beinahe vollständige Hemmung der Luziferase-Expression nach sich zog.

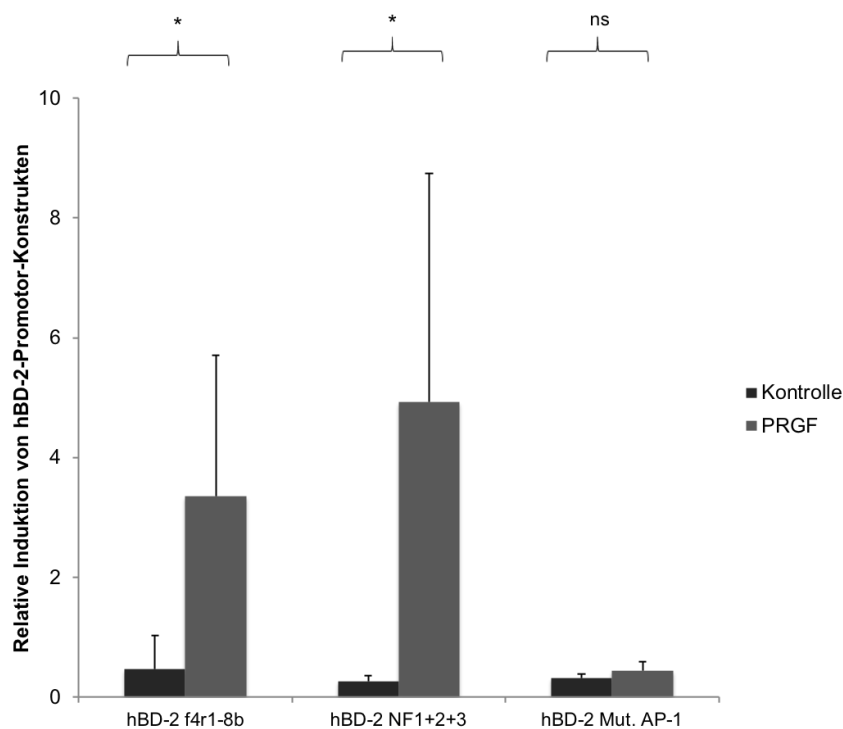


Abb. 3.6-1 Die PRGF-vermittelte hBD-2-Expression ist abhängig von AP-1, jedoch nicht von NF-κB. Primäre Keratinozyten wurden mit Mutations-Fragmenten eines 2338 bp langen hBD-2-Promotorfragments (einkloniert in ein Luziferase-Reporter-Plasmid) transient transfiziert und anschließend für 24 h mit PRGF stimuliert. Das einklonierte Fragment enthielt entweder Mutationen von drei potentiellen Bindungsstellen für NF-κB (Positionen -193 bp (1), -593 bp (2) und -2192 bp (3)) oder eine Mutation einer potentiellen Bindungsstelle für AP-1 (Position -126 bp). Dargestellt sind die relativen Aktivierungen des Reporter-Plasmids im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle des gleichen Plasmids (x-fache Aktivierung) mit Standardabweichungen aus drei Parallelansätzen. Der Versuch wurde noch zweimal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. Die Unterschiede der relativen Aktivierung des Reporter-Plasmids in den mit PRGF stimulierten Zellen, im Vergleich zu den unstimulierten Zellen

(Kontrolle), wurden unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

3.7 Stimulation mit PRGF führt zu einer Aktivierung der hBD-3-Promotorregion in primären Keratinozyten

Im Rahmen weiterer Luziferase-Genreporter-Experimente wurde außerdem ein hBD-3-Promotorkonstrukt eingesetzt, um den Einfluss von PRGF auf die hBD-3-Expression in primären Keratinozyten weitergehend zu untersuchen. Auf Grund der zuvor beschriebenen Schwierigkeiten beim Nachweis von hBD-3 aus den Kulturmediumüberständen im ELISA (s. 2.7), sollten dabei die Aussagen der mittels Echtzeit-PCR ermittelten Ergebnisse zur PRGF-vermittelten hBD-3-Expression überprüft werden. Das dafür in die Keratinozyten eingebrachte Reporter-Plasmid kodierte für die Firefly-Luziferase, dessen Gen am 3'-Ende in Ableserichtung der 2484 bp langen Promotorregion des hBD-3-Gens vorgeschaltet war. Die relative Aktivierung des Reporter Plasmids in den mit PRGF stimulierten und in den nicht-stimulierten Zellen wurde anschließend miteinander verglichen. Dabei zeigte sich eine etwa 6-fache Erhöhung der hBD-3-Promotoraktivität bei Stimulation mit PRGF über 24 h im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

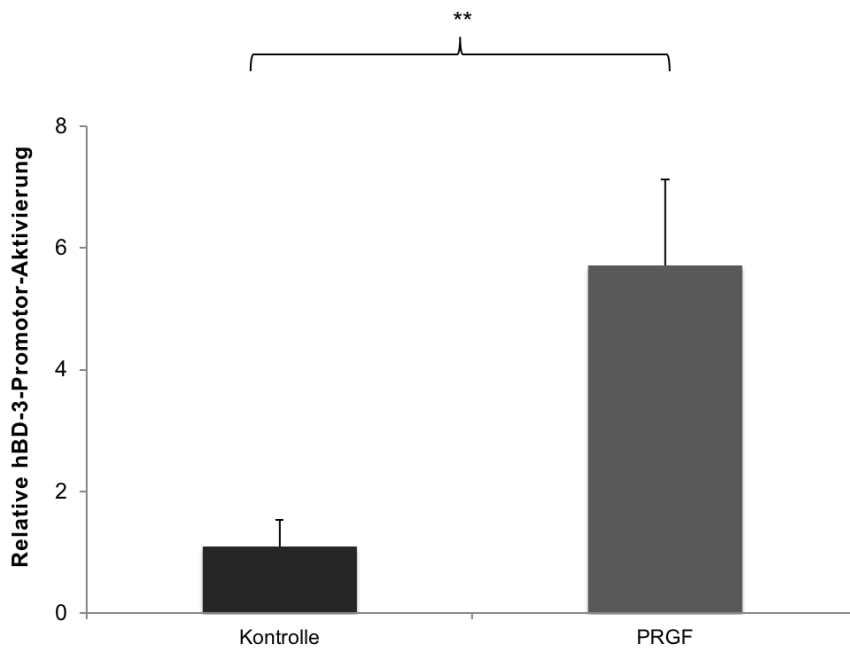


Abb. 3.7-1 Stimulation mit PRGF führt zu einer Aktivierung der hBD-3-Promotorregion in primären Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden mit einem 2474 bp langen hBD-3-Promotor-Vektor-Konstrukt (der Promotor einkloniert in ein Luziferase-Reporter-Plasmid) transient transfiziert und anschließend für 24 h mit PRGF stimuliert. Dargestellt sind die relativen Aktivierungen des Reporter-Plasmids im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle des gleichen Plasmids (x-fache Aktivierung) mit Standardabweichungen aus drei Parallelansätzen. Der Versuch wurde noch zweimal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. Der Unterschied der relativen Aktivierung des Reporter-Plasmids in den mit PRGF stimulierten Zellen, im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Kontrolle), wurde unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

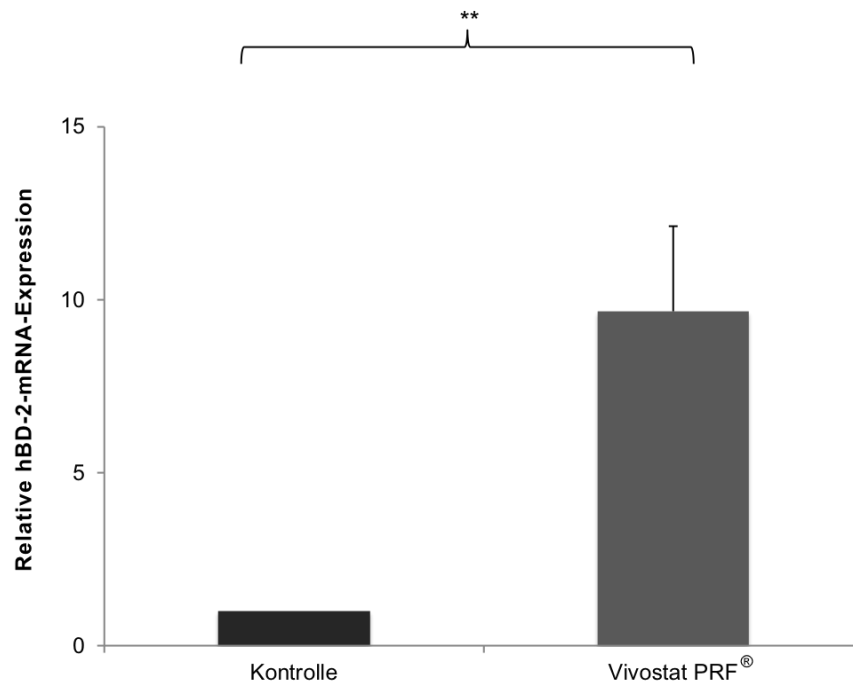
3.8 Die Behandlung von Hautwunden mit Vivostat PRF® führt zu einer gesteigerten Expression von hBD-2 und hBD-3 in menschlicher Epidermis *in vivo*

Um die Relevanz und Übertragbarkeit der *in vitro* erhobenen Ergebnisse zu ergründen, wurde eine Studie zum Einfluss von Vivostat PRF®, eines für den klinischen Gebrauch konzipierten Thrombozytenkonzentrat-Applikationssystems, auf die Expressionsmuster von hBD-2 und hBD-3 in kutanen Wunden *in vivo* durchgeführt. Dafür wurden bei 5 männlichen Probanden experimentelle gluteale Wunden mittels 4 mm durchmessender Stanzbiopsie gesetzt. Direkt nach der Wundsetzung und an Tag 5 der Studie wurde die eine Wunde mit Vivostat PRF® behandelt, die andere mit isotonischer Kochsalzlösung. An Tag 10 nach

Wundsetzung wurden die Wundränder mit einer 6 mm durchmessenden Stanzbiopsie reseziert und zur Hälfte zur RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Auswertung mittels quantitativer Echtzeit-PCR genutzt, zur anderen Hälfte zur immunhistochemischen Untersuchung auf hBD-2 und hBD-3 verwendet.

Dabei zeigte sich, dass die Expression von hBD-2 an Tag 10 in den mit Vivostat PRF[®] behandelten Wunden im Vergleich zu den mit Kochsalz behandelten und als Kontrolle dienenden Wunden etwa um den Faktor 10 gesteigert war. Die Expression von hBD-3 war ebenfalls deutlich, etwa um den Faktor 7, gesteigert (Abb. 3.8-1). Zudem zeigte die Auswertung, dass auch in den Wunden ohne Behandlung mit Vivostat PRF[®] ein deutlicher Anstieg sowohl der hBD-2- als auch der hBD-3-Expression zu verzeichnen war (Daten hier nicht abgebildet). Die immunhistologische Untersuchung der an Tag 0 und Tag 10 entnommenen Hautbiopsien erbrachten kongruente Ergebnisse. Hier zeigte sich für hBD-2, wie auch hBD-3 eine geringe Färbung der epidermalen Schichten an Tag 0 verglichen mit den an Tag 10 entnommenen Biopsien. Die mit 0,9 % NaCl-Lösung behandelte und an Tag 10 entnommene Haut ließ sich im Vergleich mit der an Tag 0 entnommenen Biopsie deutlich stärker anfärben. Im Fall der hBD-2-Immunhistologie war die Färbung insbesondere in der äußeren Epidermis unter Aussparung des Stratum corneums festzustellen. Die hBD-3-Immunhistologie erbrachte ein homogeneres Färbungsbild innerhalb der Epidermis mit Anfärbung aller Schichten, allerdings ebenfalls unter Aussparung der äußersten Hornlamellen. Die mit Vivostat PRF[®] behandelte Haut hingegen, zeigte eine tiefrote Färbung mit Zunahme in Richtung der äußeren epidermalen Schichten bis in das Stratum corneum hinein (Abb. 3.8-2).

A



B

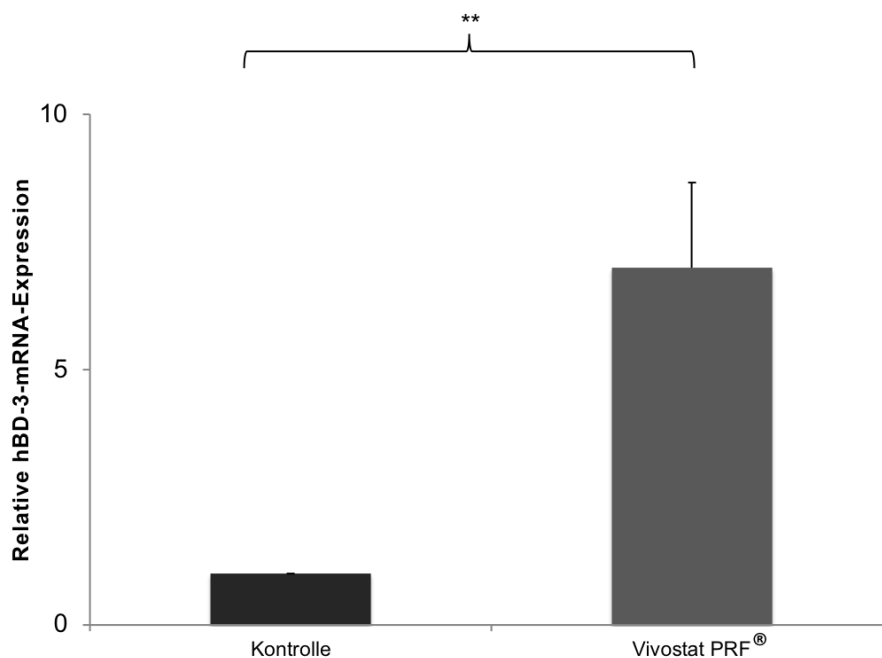
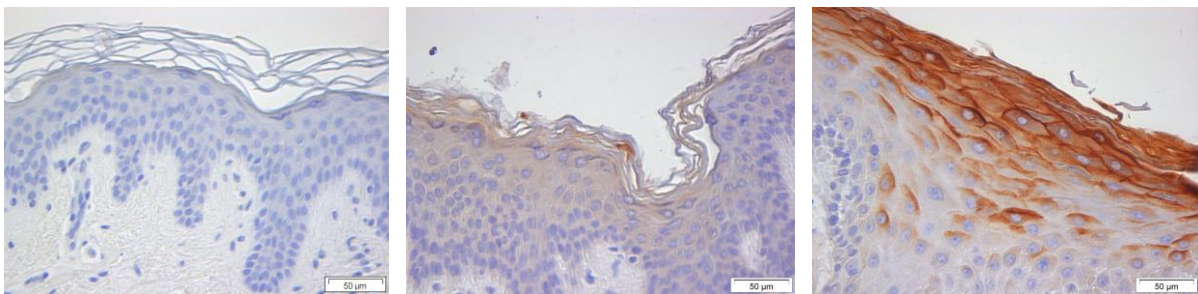


Abb. 3.8-1 Die Behandlung von Hautwunden mit Vivostat PRF® induziert hBD-2 und hBD-3 in menschlicher Epidermis *in vivo*. Experimentell gesetzte Hautwunden (\varnothing 4 mm) gesunder, männlicher Probanden zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr wurden mit Vivostat PRF® bzw. mit 0,9 % NaCl-Lösung (Kontrolle) behandelt. Nach 10 Tagen wurden die

behandelten Areale per Stanzbiopsie (\varnothing 6 mm) entnommen und die hBD-2- und hBD-3-mRNA-Expression darin mittels quantitativer Echtzeit-PCR gemessen. Dargestellt ist die zu RP38 relativierte hBD-2- (A) bzw. hBD-3-mRNA-Expression (B) als Vielfaches zur Kontrolle an Tag 10 (=1) mit Standardabweichungen aus den 5 untersuchten Hautbiopsien. Der Unterschied der hBD-2- bzw. hBD-3-mRNA-Expression in den mit Vivostat PRF[®] behandelten Zellen, im Vergleich zu den mit NaCl-Lösung behandelten Zellen (Kontrolle), wurde unter Verwendung des Studentischen T-Tests statistisch analysiert (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant).

A (hBD-2)

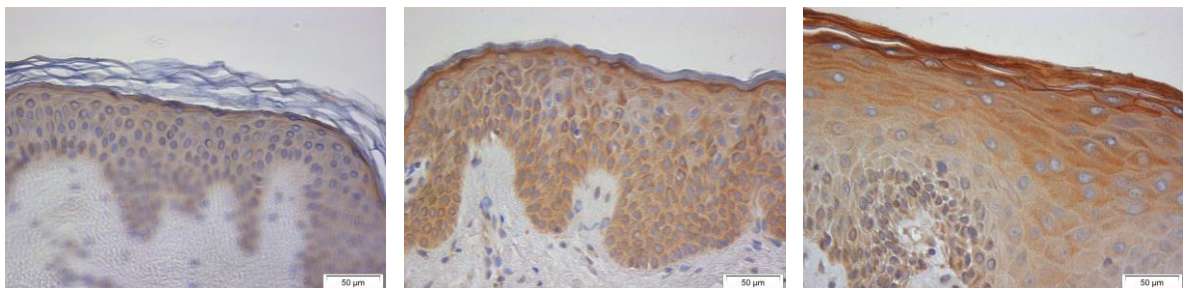


Tag 0

Tag 10, Kontrolle

Tag 10, Vivostat PRF[®]

B (hBD-3)



Tag 0

Tag 10, Kontrolle

Tag 10, Vivostat PRF[®]

Abb. 3.8-2 Immunhistologische Untersuchung der im Rahmen der Vivostat PRF[®]-Studie entnommenen Hautbiopsien. Es wurden bigluteale Stanzbiopsien (\varnothing 4 mm) bei 5 gesunden männlichen Probanden zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr gesetzt. Anschließend wurde eine der Wunden für 10 Tage mit 0,9 % NaCl-Lösung (Kontrolle), die andere mit Vivostat PRF[®] behandelt und die behandelten Areale daraufhin erneut durch eine Stanzbiopsie (\varnothing 6 mm) entnommen. Die anfänglichen Biopsien, sowie die an Tag 10 entnommenen Biopsien wurden im Anschluss immunhistologisch auf die Expression von hBD-2 (A) und hBD-3 (B) untersucht. Abgebildet sind repräsentative Ausschnitte der immunhistologischen Präparate von einem der Probanden.

4. Diskussion

4.1 Neue Therapeutika zur Behandlung chronischer Wunden

Die 1986 erstmals beschriebene Heilungstendenz chronischer Wunden nach Applikation von Thrombozyteninhaltsstoffen, konnte seitdem in zahlreichen Studien sowie in der klinischen Praxis der gefäßchirurgischen Abteilung dieser Universitätsklinik belegt werden. Knighton et al. haben gezeigt, dass der Einsatz von sogenannten Thrombozytenwundheilungsfaktoren (PDWHF, *platelet-derived wound healing factors*) bei der Behandlung nicht-heilender Wunden der unteren Extremität unterschiedlichster Pathoätiologie zu einem schnelleren Abschluss der Wundheilung führt (Knighton et al. 1986). In einer retrospektiven Analyse der Behandlung von 13 chronischen Hautwunden verschiedener Entitäten mit Vivostat PRF®, einem mit Fibrin versetztem Thrombozytenkonzentrat für den klinischen Gebrauch, konnte ein kompletter Verschluss von 8 dieser Wunden und eine deutliche Verkleinerung von 3 weiteren berichtet werden (Steenvoorde et al. 2008). Im selben Jahr wurden im Rahmen einer prospektiven Studie insgesamt 21 Patienten mit venösen und nicht-venösen Ulzera mit einer thrombozytenreichen Fibrinmatrix behandelt. Alle Patienten hatten zuvor eine prolongierte Standardtherapie erhalten, welche ohne Erfolg blieb. Am Ende der 16-wöchigen Beobachtungsphase hatten 2 von 3 (64,7%) der venösen Ulzera und 2 von 5 (31,0%) der nicht-venösen Ulzera einen vollständigen Wundverschluss erreicht (O'Connell et al. 2008). Untersuchungen an der *Kansai Medical University* in Japan zeigten die Wirksamkeit von autologen Thrombozytenkonzentraten bei der Abheilung chronischer Ulzera verschiedener Ätiologien, wobei der Therapie mit PRP (*Platelet-rich Plasma*, Plättchen-reichem Plasma) – einem aus autologen Thrombozyten hergestelltem Gel – teils eine ausgedehnte, doch erfolglose Standardtherapie vorausgegangen war. Bei 3 der 5 Patienten kam es zum vollständigen Wundverschluss binnen 4 Wochen, während sich die Wunden der übrigen Patienten deutlich verkleinerten (Kakudo et al. 2012).

Auf Grund geringer Fallzahlen oder fehlender Kontrollen lassen sich die Ergebnisse vieler Studien einzeln betrachtet nur eingeschränkt beurteilen. Im Ergebnis einer Zusammenschau wird jedoch klar, dass thrombozytenhaltige Formulierungen bei der Versorgung chronischer Wunden ein bisher nicht ausgeschöpftes und größtenteils noch unverstandenes Potenzial in sich bergen. Denn während sich bisherige Studien auf die Vorteile und Wirksamkeit solcher Formulierungen konzentrieren, ist bislang

wenig über ihren Einfluss auf Keratinozyten *in vitro* bekannt (Molina-Miñano et al. 2009, Barsotti et al. 2013, Xian et al. 2015).

Allgemein bekannt ist hingegen, dass Produkte aus humanen Thrombozytenkonzentraten eine Vielzahl an Chemokinen, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und anderen Proteinen enthalten. Zu ihnen zählen unter anderem die Wachstumsfaktoren EGF, HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*), TGF- α (*transforming growth factor alpha*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) und auch der Plättchenwachstumsfaktor PDGF (*platelet-derived growth factor*), welcher aus A- (AA) oder B-Ketten (BB) oder in einer Mischform (AB) bestehen kann und in den α -Granula von Thrombozyten enthalten ist (Eppley et al. 2004, Weibric et al. 2002, Yazawa et al. 2003, Anitua et al. 2004, Van den Dolder et al. 2006). Deshalb und auf Grund ihrer Rolle im physiologischen Wundheilungsprozess wurden Thrombozyten in den letzten Jahrzehnten zunehmend zur Verbesserung der Gewebeheilung genutzt. Während Nomenklatur und Herstellungsprozess der eingesetzten Formulierungen oft uneinheitlich sind (López-Journet et al. 2009, Barsotti et al. 2013), lässt sich überwiegend ein deutlich positiver Einfluss auf die Regeneration verschiedener Gewebe feststellen (Anitua et al. 2008, Orcajo et al. 2011).

Parallel zur zunehmenden Nutzung von Thrombozytenkonzentratprodukten wurde auch die Rolle antimikrobieller Peptide für eine funktionierende Wundheilung immer deutlicher wahrgenommen. Einerseits ist in chronischen Wunden unterschiedlicher Pathoätiologien ein relativer Mangel verschiedener antimikrobieller Peptide festzustellen, andererseits verbessert ein adäquater Einsatz von AMP die gestörte Wundheilung teils in erheblichem Ausmaß. Beispielsweise ist die Expression des Cathelicidins LL-37 in chronischen diabetischen Fußulzera im Vergleich zu gesunden Kontrollen stark reduziert (Rivas-Santiago et al. 2012). Dies ergänzt die Beobachtung, dass die lokale Anwendung von LL-37 bei nicht-infizierten venösen Beinulzera einen beschleunigten Abschluss der Wundheilung zur Folge hatte, wobei die Therapie sehr gut verträglich war (Grönberg et al. 2014). Das synthetisch hergestellte antimikrobielle Peptid Pexiganan, ein Analogon zum Magainin 2 des Afrikanischen Krallenfrosches, hatte eine dem Antibiotikum Ofloxacin gleichwertige Wirksamkeit bei der Therapie infizierter diabetischer Fußulzera, wobei Pexiganan zu

deutlich weniger Nebenwirkungen führte und Resistenzbildungen vermieden werden konnten (Lipsky et al. 2008). Eine Arbeitsgruppe der *Harvard Medical School* zeigte, dass die lokale Induktion von hBD-3 in infizierten Wunden auf der Haut von diabetischen Schweinen zu einem signifikant schnelleren Wundverschluss und stark verringertem Bakterienwachstum führte (Hirsch et al. 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei diabetischer Stoffwechsellage signifikant weniger hBD-2 und hBD-3 exprimiert werden (Lan et al. 2011, Lan et al. 2012). Daraus geht bei Vergleich mit normalen Wunden eine deutlich erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit *Staphylococcus aureus* hervor (Hirsch et al. 2008). Studien am Menschen hingegen zeigen, dass die meisten β -Defensine in diabetischen und venösen Ulzera im Vergleich zu normalen Wunden vermehrt exprimiert werden (Butmarc et al. 2004, Dressel et al. 2010, Galkowska et al. 2005). Diese Expression scheint jedoch unzureichend zu sein und kann deshalb in chronischen Wundverhältnissen nicht zur Verbesserung der Geweberegeneration beitragen (Dressel et al. 2010, Galkowska et al. 2005) und bei Kontakt mit pathogenen Erregern keinen Schutz vor einer Infektion gewährleisten (Rivas-Santiago et al. 2012); eine Beobachtung, die anhand der klinischen Häufigkeit solcher Infektionen nachvollziehbar scheint. Infektionen von diabetischen Ulzera, oft zuerst durch Gram-positive Bakterien, im Verlauf jedoch häufig polymikrobiell, bleiben häufige Gründe für Krankenseinweisungen von Diabetes-Patienten und Teilamputationen von Extremitäten im Verlauf (Hunt 2009, Richard et al. 2011). Der Ausgleich eines absoluten oder relativen AMP-Mangels könnte daher ein interessanter Ansatz sein, um dieser Entwicklung entgegenzuwirken.

Nach Wissen des Autors liefern die für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen die ersten Erkenntnisse über den Einfluss von PRGF und Vivostat PRF® auf die Expression antimikrobieller Peptide in Keratinozyten *in vitro* und *in vivo*.

4.2 Expression von hBD-2 und hBD-3 *in vitro* und *in vivo*

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte PRGF als starker Induktor von hBD-2 und hBD-3 in Keratinozyten identifiziert werden. Dies zeigte sich sowohl auf mRNA-Ebene, als auch für hBD-2 an der im ELISA ermittelten Menge des Peptids im Zellüberstand. Im Falle von hBD-3 wurde dies durch die Aktivierung der hBD-3-

Promotorregion in Genreporterexperimenten bestätigt. Die Expression beider antimikrobieller Peptide zeigte dabei eine Zeitabhängigkeit mit Höchstwerten nach 24 bis 72 Stunden. Diese Erkenntnisse lassen sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen vereinbaren, die zeigten, dass Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- α und IGF-1, welche auch in Thrombozyten enthalten sind, in der Lage sind antimikrobielle Peptide zu exprimieren (Martin 1997, Sørensen et al. 2003, Roupé et al. 2010).

In Zellkulturversuchen stieg die Expression von hBD-2 und hBD-3 nach Stimulation mit PRGF stets deutlich über das Niveau der Kontrollen an. Jedoch fiel auf, dass das Ausmaß variierte, mit dem die PRGF-Bestände die antimikrobiellen Peptide induzierten. Während des PRGF-Herstellungsprozesses fand eine Vermischung von Spenderthrombozyten nur in Ausnahmefällen statt, nämlich dann, wenn dadurch der Verlust überschüssiger Mengen der Thrombozytenkonzentrate vermieden werden konnte. So war das für eine bestimmte Anzahl von Versuchen eingesetzte PRGF in der großen Mehrzahl der Fälle einzelnen Spendern zuzuordnen. Es fiel auf, dass PRGF vom selben Spender ein sehr ähnliches, von unterschiedlichen Spendern jedoch zum Teil ein sehr unterschiedliches Induktionspotenzial zeigte. Nach Erhalt der Thrombozytenkonzentrate aus der Blutbank erfolgte die Lagerung stets lichtgeschützt und temperaturkonstant. Die Konzentrate wurden umgehend nach einem gleichbleibenden Standard zu PRGF verarbeitet (Vgl. 2.2). Die Suche nach eventuellen Störfaktoren im Verarbeitungsprozess blieb ergebnislos. Daher ist zu vermuten, dass hier interindividuelle Unterschiede und nach Erhalt der Thrombozytenkonzentrate nicht näher einzugrenzende Faktoren, wie beispielsweise Alter und gesundheitlicher Status der Spender, für das unterschiedliche Induktionspotential verantwortlich sind.

Trotz dieser Variabilität, konnte PRGF generell als potenter Induktor von hBD-2 und hBD-3 ermittelt werden. Diese *in vitro*-Daten konnten durch *in vivo*-Experimente bestätigt werden. Bei 4 von 5 Probanden wurde bereits in der Analyse der mit isotonischer Kochsalzlösung behandelten Kontrollwunde eine deutlich gesteigerte Expression von hBD-2 und hBD-3 beobachtet. Diese Expressionsniveaus sind bei 3 der 4 Probanden in der mit Vivostat PRF[®] behandelten Wunde um ein Vielfaches übertroffen worden. So ist anzunehmen, dass in gesunder Haut eine deutliche

Steigerung der AMP-Expressionslevel durch Inhaltsstoffe von Thrombozyten mit Sicherheit möglich, vielleicht aber sogar die Regel ist. Die Analyse derjenigen Komponenten, die in Wunden zu Veränderungen der AMP-Expression führen und mögliche Umstände unter denen diese Effekte gehemmt oder gefördert werden, bieten interessante Fragestellungen für weitere Untersuchungen.

Bei einem der 5 Probanden ließ sich in der Kontrollwunde kein Anstieg der hBD-2- oder hBD-3-Expression beobachten. Anders aber in der mit Vivostat PRF® behandelten Wunde, hier war ein deutlicher Anstieg beider antimikrobieller Peptide zu verzeichnen. Das lässt einerseits vermuten, dass eine Gewebeschädigung nicht bei allen Individuen zur Expression von hBD-2 und hBD-3 führt, was in diesem Fall, eine gesteigerte Anfälligkeit für Infektionen bedeuten könnte. Andererseits ist zu vermuten, dass individuelle Unterschiede in der Empfänglichkeit der Haut für den thrombozytären Stimulus bestehen oder aber eine Variabilität bezüglich des Potenzials der eigenen Thrombozyten solch eine Wirkung zu entfalten, wie sie auch anhand der Versuche *in vitro* vermutet wurde. Die Analyse derjenigen Thrombozyteninhaltsstoffe, welche in Wunden zu Veränderungen der AMP-Expression führen und mögliche Umstände unter denen diese Effekte gehemmt oder gefördert werden, scheinen interessante Aspekte und Fragestellungen für weitere Untersuchungen zu bieten. Das Ausbleiben einer gesteigerten AMP-Expression durch die Gewebsschädigung scheint dabei kein Ausschlusskriterium für eine starke Induktion nach Stimulation mit Vivostat PRF® zu sein. Diese Vermutungen können jedoch nur mit Vorsicht geäußert werden, da die geringe Probandenzahl (n=5) eine Generalisierung verbietet.

Des Weiteren ist anzumerken, dass die hBD-2-Expressionslevel in den Kontrollwunden um ein Vielfaches höher waren als die von hBD-3. Das antimikrobiell breiter wirksame hBD-3 (Harder et al. 2001, Kawachi et al. 2006, Kisich et al. 2007, Zanger et al. 2011) scheint demnach in nicht-infizierten Wunden gesunder Haut geringfügiger exprimiert zu werden. Es ist bekannt, dass sich hBD-2 und hBD-3 positiv auf die Migration und Proliferation von Keratinozyten auswirken, hBD-3 jedoch bereits in geringerer Konzentration sein Wirkmaximum entfaltet (Niyonsaba et al. 2007). Daher dürfen die hier beobachteten quantitativen Unterschiede nicht dazu

verleiten, hBD-2 zwangsweise eine bedeutendere Stellung im Wundheilungsprozess der Haut einzuräumen.

Für die hier durchgeführten Analysen wurde die Haut junger gesunder Probanden untersucht, deren Wundheilungsprozesse nicht beeinträchtigt sein sollten. Dies könnte erklären warum keine makro- oder mikroskopischen Unterschiede im Wundschluss beobachtet werden konnten. Es bleibt hier offen, inwiefern die mitgeteilten Beobachtungen auf chronische Wunden mit ihrem, im Rahmen von Begleiterkrankungen veränderten AMP-Expressionsmustern (Lan et al. 2011, Lan et al. 2012, Rivas-Santiago et al. 2012) übertragbar sind.

4.3 PRGF-vermittelte Expression von Interleukin-6 in Keratinozyten

Es ist bekannt, dass verschiedene Zytokine in der Lage sind, antimikrobielle Peptide in Keratinozyten zu induzieren (Harder et al. 2000). Die Untersuchung der Zytokinexpressionsmuster von Keratinozyten nach Stimulation mit PRGF, zeigte einen starken Anstieg der mRNA-Konzentration von Interleukin-6 (IL-6) bereits 4 Stunden nach Stimulation.

Das Zytokin IL-6 wurde erstmals 1980 in zwei scheinbar unabhängig voneinander entstandenen Veröffentlichungen beschrieben, als neuartige mRNA, die als Variante des Interferon beta – produziert von humanen Fibroblasten – gedeutet wurde (Weissenbach et al. 1980, Sehgal und Sagar 1980). In den folgenden Jahren wurde dasselbe Protein, bestehend aus 212 Aminosäuren und einer von seiner Glykosylierung abhängigen molekularen Masse von 21-26 kDa, mehrfach in verschiedenen Zusammenhängen beschrieben, bis es schließlich als dasselbe Peptid erkannt und mit dem Namen Interleukin-6 versehen wurde (Mihara et al. 2012). Beim gesunden Menschen finden sich nur sehr geringe Mengen (1-5 pg/ml) im Blut. Bei nahezu allen entzündlichen Zuständen wird IL-6 jedoch vermehrt vorgefunden, ob systemisch oder im betroffenen Gewebe (Wolf et al. 2014). Dazu zählen beispielsweise die rheumatoide Arthritis, der systemische Lupus erythematoses, der M. Crohn, die systemische juvenile idiopathische Arthritis oder die Sepsis, aber auch physiologische Entzündungsprozesse wie die initiale, inflammatorische Phase der Wundheilung (Mihara et al. 2012, Tanaka et al. 2014).

Seine inflammatorische Wirkung entfaltet IL-6 vor allem über die Aktivierung des membrangebundenen IL-6-Rezeptors. Dieser bewirkt eine Homodimerisierung des Glykoproteins gp130 und konsekutiv die Aktivierung des JAK/STAT-, SHP2/ERK- und/oder MAPK-Signalwegs. Eine weitere Möglichkeit der Wirkung von IL-6 ist das sogenannte „Trans-Signaling“. Dieser Weg verläuft über die Aktivierung des löslichen (*soluble*) IL-6-Rezeptors, welcher in gelöster Form vorliegt und prinzipiell an allen Zellen wirken kann, da das zu dimerisierende gp130 von allen Zellen exprimiert wird. Diesem zweiten Signalweg werden vornehmlich antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Jedoch kann diese Einteilung in pro- und antiinflammatorisch nur grob sein, da die Wirkungen einer komplexen Modulation durch andere Zytokine, Proteasen und intrazellulärer Signalkaskaden unterliegen (Wolf et al. 2014). Beide Rezeptorsysteme lassen sich durch den humanisierten monoklonalen Antikörper Tocilizumab inhibieren, der auch für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche eingesetzt wurde.

IL-6 ist beteiligt an einer Vielzahl von Vorgängen, dazu zählen unter anderem die Regulation der Immunantwort, der Hämatopoese, der Akute-Phase-Antworten und Entzündungen. Zudem ist bekannt, dass IL-6 die Proliferation von Keratinozyten unterstützt (Grossman et al. 1989). Eine Hemmung von IL-6 führt im Mausmodell zu einer gestörten intestinalen Wundheilung auf Grund einer verringerten epithelialen Proliferation (Kuhn et al. 2014). Auf der anderen Seite kann durch einen Überschuss an IL-6 die Wundheilung im Kornea-Wundheilungsmodell beschleunigt werden (Arranz-Valsero et al. 2014). Zudem könnte IL-6 auch eine Rolle in der epidermalen Immunantwort spielen, da Keratinozyten nach Exposition gegenüber Exfoliatin A, einem *Staphylococcus aureus*-Toxin, das Zytokin vermehrt exprimieren (Rolle et al. 2013).

Diese und weitere Studien gaben Anlass zu der Vermutung, dass IL-6 auch an der PRGF-vermittelten hBD-2- und hBD-3-Expression beteiligt sein könnte. Der klare Anstieg der IL-6-Expression kurze Zeit nach der Stimulation der Keratinozyten ließ dies ebenfalls vermuten. Zudem ist bekannt, dass die hBD-2-Promotorregion drei *nuclear factor*(NF)-IL-6-ähnliche Konsensusmotive besitzt und somit prinzipiell eine Induktion durch IL-6 möglich sein könnte (Harder et al. 2000). Deshalb wurde der IL-6-Rezeptor-Antikörper Tocilizumab eingesetzt, um den IL-6-Rezeptor-Signalweg zu

inhibieren. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion der hBD-2- und hBD-3-Expression nach Stimulation der Keratinozyten mit PRGF. Somit ist anzunehmen, dass IL-6 eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der angeborenen Immunantwort und Heilung von epidermalen Wunden einnimmt. Dies lässt sich gut in Einklang mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen anderer Arbeiten bringen. Jedoch scheint dieser Effekt gewebeabhängig zu sein. Beispielsweise ist IL-6 in humanem respiratorischem Epithel nicht in der Lage, hBD-2 zu induzieren (Harder et al. 2000). Es wäre auch denkbar, dass das Vorhandensein weiterer Zytokine oder bestimmter Kofaktoren notwendig ist, um diesen Effekt zu erzielen. Daher scheint in diesem Zusammenhang die Identifizierung entscheidender PRGF-Inhaltsstoffe und ihrer Wechselwirkungen von besonderer Bedeutung zu sein und könnte in zukünftigen Arbeiten thematisiert werden.

4.4 Signaltransduktionswege der PRGF-vermittelten Expression von hBD-2 und hBD-3

4.4.1 Vermittlung über den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor

Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass der EGF-Rezeptor (EGFR) und seine Liganden eine zentrale Rolle bei der Expression von hBD-3 spielen (Firat et al. 2014, Muhammad et al. 2016). Die hBD-2-Expression in Wunden ist zwar ebenfalls vom EGF-Rezeptor abhängig (Roupe et al. 2010, Niyonsaba et al. 2007), jedoch scheint dabei einerseits die Anwesenheit von Interleukin-1 β notwendig und andererseits der Einfluss des EGFR schwächer als im Falle von hBD-3 zu sein (Sørensen et al. 2005, Johnston et al. 2011). Interleukin-1 β ist neben bakteriellen Stimuli wie etwa *Pseudomonas aeruginosa* (Wehkamp et al. 2006) oder *Escherichia coli* Nissle 1917 (Wehkamp et al. 2004), ein potenter Induktor der hBD-2-Expression in unterschiedlichen Geweben (Harder et al. 1997, Harder et al. 2000, Sørensen et al. 2005, Pahl et al. 2011, Streubesand et al. 2009).

Der EGF-Rezeptor steuert Zellproliferation und -differenzierung. Er gehört zur erbB-Familie, welche eine Gruppe von Tyrosinkinaserzeptoren darstellt (Herbst 2004). Die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors ist Bindungsstelle für zahlreiche Liganden wie etwa EGF, TGF- α , Amphiregulin oder Betacellulin (Carpenter und Cohen 1979, Salomon et al. 1995), von denen einige auch in Wundflüssigkeit in

hoher Konzentration vorhanden sind (Mast und Schultz 1996). Die extrazelluläre Domäne ist über eine in der Membran verankerte, hydrophobe Region mit der zytoplasmatischen Domäne verbunden, welche ihrerseits Tyrosinkinaseaktivität besitzt (Carpenter und Cohen 1990, Yarden et al. 2001). Eine Überexpression des EGF-Rezeptors lässt sich in verschiedenen Tumorentitäten finden, weshalb seit einiger Zeit spezifische Inhibitoren ergänzend zur zytostatischen Behandlung eingesetzt werden. Neben Molekülen, welche die Autophosphorylierung der Tyrosinkinase und damit ihre Aktivierung verhindern, werden dabei vor allem monoklonale Antikörper zur Blockierung der extrazellulären Ligandenbindungsstelle eingesetzt (Herbst et al. 2002, Langer 2004).

Um die Bedeutung des EGF-Rezeptors für die PRGF-vermittelte Expression von hBD-2 und hBD-3 zu untersuchen, wurde ein solcher EGF-Rezeptor-Antikörper mit dem Namen *Cetuximab* eingesetzt. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der hBD-2-, wie auch der hBD-3-Expression in den betroffenen Zellen. Es war festzustellen, dass die hBD-3-Expression durch Blockade des EGF-Rezeptors auf dem Niveau der Kontrollen verblieb und somit vollständig inhibiert wurde. Daraus ist abzuleiten, dass auch im Falle der durch PRGF induzierten hBD-3-Expression der EGF-Rezeptor eine zentrale Stellung einnimmt, während die Expression von hBD-2 in geringerem Maße vom EGF-Rezeptor abhängig ist. Das lässt sich mit den Beobachtungen anderer Forschungsgruppen in Übereinstimmung bringen, die dem EGF-Rezeptor eine kritische Rolle in der hBD-3-Expression nach Wundsetzung (Sørensen et al. 2006) oder nach mikrobieller Belastung nachweisen konnten (Firat et al. 2014, Muhammad et al. 2016), während für die Expression von hBD-2 andere Mechanismen bedeutsamer waren (Sørensen et al. 2005). Es zeigte sich in unseren Versuchen keine vermehrte Induktion von Interleukin-1 β in den mit PRGF stimulierten Keratinozyten *in vitro*. Eine Abhängigkeit der EGFR-vermittelten hBD-2-Expression von Interleukin-1 β , wie sie von Sørensen et al. beschrieben wurde, scheint damit in diesem Zusammenhang keine Rolle zu spielen.

Es ist möglich, dass die Aktivierung des EGF-Rezeptors direkt durch Liganden in Form von PRGF-Inhaltsstoffen erfolgt. Eine auto- oder parakrine Aktivierung von möglichen Liganden mit Hilfe von Metalloproteinasen der ADAM-Familie (*A Disintegrin And Metalloproteinase*), durch sogenanntes *Shedding*, gewissermaßen

ein „Zurechtschneiden“ der Liganden, ist ebenfalls ein möglicher Mechanismus der EGF-Rezeptoraktivierung (Edwards et al. 2008). In welchem Ausmaß die PRGF-vermittelte Aktivierung des EGF-Rezeptors von einem dieser beiden Mechanismen abhängig ist, gilt es in weiteren Arbeiten zu untersuchen. Die Identifikation der Liganden des EGF-Rezeptors und der beteiligten Kofaktoren sind dabei wichtige Elemente in der Ergründung der PRGF-vermittelten Wundheilungsförderung.

4.4.2 Die Rolle der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 in der PRGF-vermittelten hBD-2-Expression

Nachdem der IL-6- und der EGF-Rezeptor als wichtige Komponenten in der Signaltransduktion von extra- nach intrazellulär identifiziert werden konnten, sollte nun in Luziferase-Genreporter-Experimenten die Bestimmung beteiligter Transkriptionsfaktoren erfolgen. Es ist bekannt, dass die hBD-2-Promotorregion unter anderem Konsensussequenzen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) und AP-1 (*activating protein-1*) enthält (Harder et al. 2000).

Die NF- κ B/Rel-Familie umfasst Proteine, die als Dimere an die κ B-Motive der Promotorregion von Zielgenen binden und so deren Transkription regulieren können. Sie besteht aus fünf Untereinheiten, welche homo- oder heterodimerisieren können: NF- κ B1 (auch p50) und NF- κ B2 (auch p52), welche aus der Proteolyse der Vorläuferproteine p105 bzw. p100 entstehen, sowie RelA (auch p65), RelB und c-Rel, welche nicht aus Vorläuferproteinen hergestellt werden. Im Zytoplasma sind diese Untereinheiten an inhibitorische I- κ B-Komplexe gebunden und können somit nicht in den Zellkern übertreten. Bei der Aktivierung von NF- κ B durch vielfältige exo- und endogene Stimuli kommt es durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung des NF- κ B/I- κ B-Komplexes zur proteolytischen Freisetzung von NF- κ B. Nun erfolgt die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Nukleus und die Anlagerung an die DNA (Lee und Burckart 1998, Li und Verma 2002).

AP-1 ist ebenfalls ein Überbegriff für eine Gruppe homo- oder heterodimerer Transkriptionsfaktoren, die sich aus einer Vielzahl von Untereinheiten aus den Gruppen Jun, Fos, ATF (*activating transcription factor*), Maf und anderen zusammensetzen können. Die Regulationswege der AP-1-Aktivität sind vielfältig und

reichen von Unterschieden in der Transkription der für AP-1-Untereinheiten kodierenden Gene bis zu Interaktionen mit anderen Transkriptions- und Kofaktoren. Der am besten untersuchte Mechanismus ist die Regulierung durch sogenannte MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*, Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen), zu denen vor allem die ERK (*extracellular signal-regulated kinases*, extrazellulär-Signal-regulierten-Kinasen), die p38-MAP-Kinase und die c-Jun-N-terminale-Kinase (JNK) zählen (Karin et al. 1997, Hess 2004).

Beide Transkriptionsfaktoren kommen ubiquitär vor und regulieren eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Gene. So reguliert NF- κ B beispielsweise die Expression von Wachstumsfaktoren, einiger Chemo- und Zytokine wie IL-2, IL-6 und TNF- α , sowie von Akute-Phase-Proteinen, Transkriptionsfaktoren, Immunrezeptoren oder Enzymen wie die Cyclooxygenase-2 (Lee und Burckart 1998). AP-1 trägt unter anderem zur Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und der Apoptose von Zellen bei (Shaulian und Karin 2001).

Der Einfluss dieser beiden Transkriptionsfaktoren auf die hBD-2-Induktion durch verschiedene Stimuli wurde bereits mehrfach untersucht und diskutiert. Deshalb ist zunächst festzuhalten, dass in den meisten Fällen sowohl NF- κ B, als auch AP-1 entscheidenden Einfluss auf die Vermittlung der hBD-2-Induktion haben. Beispielsweise induzieren *Escherichia coli* Nissle 1917 und eine Reihe anderer probiotischer Bakterien hBD-2 NF- κ B- und AP-1-abhängig in Darmepithelzellen (Wehkamp et al. 2004). In einer weiteren Arbeit wurde die zentrale Bedeutung einer AP-1-Bindestelle sowie dreier NF- κ B-Bindestellen in der *Pseudomonas aeruginosa*- und IL-1 β -vermittelten Expression von hBD-2 in Keratinozyten festgestellt (Wehkamp et al. 2006). Diese Ergebnisse konnten durch den Einsatz von Plasmiden erlangt werden, welche ein 2338 Basenpaare langes Fragment der hBD-2-Promotorsequenz trugen (s. 2.4). Natürlicherweise kommen auf diesem Abschnitt des hBD-2-Promotors drei Konsensussequenzen für NF- κ B sowie eine für AP-1 vor. Von diesen wurden jeweils eine, zwei oder drei der NF- κ B-Motive oder aber die AP-1-Konsensussequenz durch Mutation ausgeschaltet (Wehkamp et al. 2004, Wehkamp et al. 2006). Die im Zuge dieser Arbeiten hergestellten Plasmide wurden auch zur Ermittlung der Beteiligung von NF- κ B und AP-1 an der PRGF-vermittelten hBD-2-Expression verwendet. Dabei wurden jedoch lediglich hBD-2-Promotorsequenzen mit

entweder drei, also ausnahmslos mutierten NF- κ B-Konsensussequenzen oder aber einer mutierten AP-1-Konsensussequenz eingesetzt.

Die Genreporter-Experimente zeigten, dass AP-1 ein wichtiger Faktor für die Aktivierung der hBD-2-Promotorregion ist, die Mutation von NF- κ B-Motiven hingegen keinerlei negative Auswirkung auf die Promotoraktivierung, ja sogar eine geringe Steigerung der Promotoraktivierung zur Folge hatten. Dies überrascht im Vergleich mit Ergebnissen anderer Untersuchungen. Für starke Induktoren der hBD-2-Expression wie IL-1 β , *Pseudomonas aeruginosa* (Wehkamp 2006) oder *E. coli*-Stämmen (Wehkamp 2004), konnte in verschiedenen Zelllinien eine Beteiligung von NF- κ B-Untereinheiten bei der Aktivierung des hBD-2-Promotors festgestellt werden. Außerdem scheint die hBD-2-Expression im Ösophagusepithel nach Kontakt mit *Candida albicans* (Streubesand et al. 2009), wie auch die hBD-2-Expression in pulmonalen Epithelzellen nach Stimulation mit *Legionella pneumophila* (Scharf et al. 2010a) sowohl von NF- κ B als auch von AP-1 abhängig zu sein. Andere Autoren berichten über die hBD-2-Induktion durch *Helicobacter pylori* (Wada et al. 2001) oder *Salmonella enteridis* (Ogushi et al. 2001), welche nicht von AP-1, sondern vor allem von NF- κ B abhängig ist. So auch Yoon et al., welche mit Hilfe der von unserer Forschungsgruppe hergestellten und oben näher beschriebenen Plasmide (Vgl. 2.4.1), zeigen konnten, dass die hBD-2-Expression in Darmepithelzellen nach Stimulation mit dem Enterotoxin von *Bacteroides fragilis* sich auf NF- κ B, jedoch nicht auf AP-1 stützt (Yoon et al. 2010). Im Gegensatz dazu, gibt es nach Wissen des Autors lediglich einen Bericht, in dem die MAP-Kinase-Signalwege und AP-1 als essenziell, NF- κ B hingegen als nicht relevant für die hBD-2-Expression in humanen Zahnfleischepithelzellen nach bakterieller Stimulation durch *Fusobacterium nucleatum* beschrieben wird. Bei Einsatz des NF- κ B-Inhibitors MG132 kam es dort sogar zu einer gesteigerten Induktion von hBD-2. Als mögliche Gründe dafür werden einerseits Besonderheiten des Zahnfleischepithels wie seine Mehrschichtigkeit und die Abwesenheit eines Stratum corneums, andererseits die Verwendung eines kommensalen, nur selten pathogenen Bakteriums als Stimulus genannt, welcher lediglich zu einer eingeschränkten Immunantwort des angeborenen Immunsystems führt (Krisanaprakornkit et al. 2002).

Die vermehrte PRGF-vermittelte hBD-2-Induktion in Keratinozyten trotz der Mutation von 3 NF- κ B-Bindestellen bleibt dennoch auffällig. Die Gründe für diese Beobachtung müssen im Allgemeinen andere sein, als die von Krisanaprakornkit et al. angeführten, da es sich bei PRGF um einen nicht-bakteriellen Stimulus und bei den stimulierten Zellen um Keratinozyten handelt. In Zusammenschau der Studien scheint die Beteiligung von NF- κ B und AP-1 prinzipiell je nach Zellart und Stimulus zu variieren, wobei dabei keine generelle Unterscheidung zwischen bakteriellen Stimuli und Zytokinen getroffen werden kann. Bei der Vielzahl der im PRGF enthaltenen Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren (s. 4.1) scheint auch unter diesem Aspekt die Identifikation der ausschlaggebenden Komponenten des PRGF von großer Relevanz. So könnte sich die Zahl derjenigen Studien vergrößern, welche mit Hinblick auf den eingesetzten Stimulus vergleichbar sind.

Es bleibt festzuhalten, dass die hBD-2-Induktion in diesem Fall im Wesentlichen von AP-1 abhängig ist. In welcher Form die vorgeschalteten MAP-Kinase-Signalwege und AP-1-Untereinheiten in die Aktivierung des Transkriptionsfaktors involviert sind, gilt es in weiteren Studien zu ergründen.

Da die Diskussion der für die Transkription entscheidenden Faktoren und Signalwege nicht das primäre Ziel dieser Arbeit war, ist die Erforschung der für die Expression von hBD-3 relevanten Transkriptionsfaktoren hier nicht erfolgt und bietet daher einen weiteren interessanten Ansatzpunkt für neue Arbeiten. Auch für hBD-3, konnte die Relevanz von AP-1 und NF- κ B als Transkriptionsfaktoren in zahlreichen Studien ermittelt werden. Dabei scheint vor allem AP-1 eine tragende Rolle zu spielen (Näbert 2005, Streubesand et al. 2009, Kanda et al. 2010, Scharf et al. 2010b, Scharf et al. 2012).

4.5 Klinischer Bezug und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen einen Zusammenhang zwischen zwei vergleichsweise neuen Therapieansätzen bei der Behandlung chronischer Hautwunden nahe.

Die Therapie mit thrombozytenkonzentrathaltigen Formulierungen hat sich in den letzten Jahren immer mehr als vielversprechende Alternative zur klassischen

Wundbehandlung erwiesen (Knighton et al. 1986, Miron et al. 2014, Steenvorde et al. 2008). Es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass auch in Fällen in denen eine prolongierte Standardtherapie versagte, durch eine solche Behandlung maßgebliche Erfolge erzielt werden konnten (Kakudo et al. 2012, O'Connell et al. 2008). Zudem ist eine solche Therapie kosteneffektiv, einfach in der Handhabung und risikoarm, da die körpereigenen Thrombozyten ein äußerst geringes Potenzial für Komplikationen und Nebenwirkungen besitzen. Auch deswegen werden thrombozytenhaltige Formulierungen wie PRGF, PRP (Plättchen-reiches Plasma, *platelet-rich plasma*), oder Vivostat PRF® in der klinischen Praxis immer häufiger eingesetzt.

Auf der anderen Seite werden große Hoffnungen in die therapeutische Nutzbarmachung antimikrobieller Peptide gesetzt. Ihre antimikrobielle Wirksamkeit selbst gegen multiresistente Bakterienstämme, wie z.B. von *Acinetobacter baumannii* oder *Staphylococcus aureus* (Maisetta et al. 2006, Routsias et al. 2010, Supp et al. 2009), sind ein Lichtblick in Zeiten der Zunahme bakterieller Multiresistenzen. Doch auch als Mediatoren der Wundheilung sind antimikrobielle Peptide in den letzten Jahren stärker in den Vordergrund gerückt. So konnten beispielsweise diabetische und infizierte Wunden mit Hilfe von hBD-3, LL-37 und Pexiganan effektiv behandelt werden (Grönberg et al. 2014, Hirsch et al. 2009, Lipsky et al. 2008).

Es lässt sich auf Grund der hier beschriebenen Ergebnisse vermuten, dass antimikrobielle Peptide in der Behandlung chronischer Wunden mit Thrombozytenkonzentratprodukten ein bisher übersehener, benefizieller Faktor sein könnten, was einerseits die positiven klinischen Effekte solcher Produkte erklären, andererseits aber auch die Stellung antimikrobieller Peptide als wundheilungsfördernde Substanzen weiter stärken würde. Mit humanen Thrombozytenkonzentratprodukten wie Vivostat PRF® ist ein Stimulus gefunden, der zu einer Induktion der antimikrobiell breit wirksamen humanen β -Defensin-2 und -3 führt. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe unter Prof. Dr. Harder zeigen, dass PRGF auch zu einer vermehrten Expression des antimikrobiellen Peptids Psoriasin, auch bekannt unter dem Namen S100A7, führt und zudem die Differenzierung von Keratinozyten unterstützt (Bayer et al. 2017a, Bayer et al. 2017b). Außerdem führt PRGF zu einer Hemmung der Proliferation von Keratinozyten. Dies überrascht nicht, wenn man bedenkt, dass sich differenzierende Keratinozyten ihre Fähigkeit zu proliferieren verlieren (Bayer et al.

2017c, Eckert et al. 1997). Andere Zelltypen, wie etwa Tenozyten oder Fibroblasten, werden hingegen zur Proliferation angeregt (Tohidnezhad et al. 2011, Anitua et al. 2016).

Die Gesamtheit dieser Effekte trägt aller Wahrscheinlichkeit nach zum Erfolg von PRGF und ähnlichen Formulierungen bei der Behandlung chronischer Hautwunden und anderer Gewebe bei. Es ist anzunehmen, dass auch pathologisch veränderte Haut antimikrobielle Peptide nach Stimulation mit Vivostat PRF® produziert. Dennoch sollte untersucht werden, wie stark sich antimikrobielle Peptide in erkrankter Haut induzieren lassen, um den tatsächlichen Effekt auf die Wundheilung einschätzen zu können. Zudem sollte großer Wert darauf gelegt werden, dass durch die zunehmende therapeutische Nutzung antimikrobieller Peptide keine Selektion von Bakterienstämmen mit reduzierter Sensibilität gegenüber diesen uralten „körpereigenen Antibiotika“ begünstigt wird (Cordes et al. 2014). Die Gefahr der Resistenzentwicklung ist auch bei der PRGF-induzierten Erhöhung lokaler AMP-Konzentrationen vorhanden, jedoch scheint diese Gefahr, ebenso wie die Gefahr möglicher lokaler Nebenwirkungen, durch den Einsatz eines autologen Stimulus zur körpereigenen AMP-Expression, verglichen mit der Anwendung synthetischer oder allogener isolierter Peptide, deutlich reduziert.

5 Zusammenfassung

Chronische Wunden sind nicht nur eine schwerwiegende Belastung für den Patienten, sondern auch eine zunehmende sozioökonomische Belastung und stellen damit eine große Herausforderung für die Medizin dar. Mit der Anwendung von Produkten aus Thrombozytenkonzentraten konnten in den letzten Jahren maßgebliche Erfolge bei der Behandlung solcher Wunden erzielt werden. Es ist bekannt, dass Thrombozyten eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Zytokinen enthalten, jedoch ist ihr Effekt auf die Zellen der Haut, die Keratinozyten, weitgehend unklar. Diese Zellen exprimieren sogenannte antimikrobielle Peptide, unter anderem die humanen beta-Defensine-2 und -3 (hBD-2, -3), welche der Haut einen wichtigen Schutz gegen pathogene Bakterien, Viren und Pilze verleihen. Inzwischen ist klar, dass diese Peptide auch als Mediatoren im physiologischen Wundheilungsprozess fungieren. Es scheint so zu sein, dass unter Bedingungen, die eine Wundheilungsstörung begünstigen, ein relativer Mangel an antimikrobiellen Peptiden besteht. Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkung von thrombozytenkonzentrathaltigen Formulierungen wie PRGF (*platelet-released growth factors*/ aus Thrombozyten freigesetzte Wachstumsfaktoren) oder Vivostat PRF® (*platelet-rich fibrin*/ thrombozytenreiches Fibrin) auf die Expression von hBD-2 und hBD-3 in Keratinozyten *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen und dadurch einen möglichen Grund für den günstigen Effekt der thrombozytären Produkte auf die Wundheilung zu identifizieren. Des Weiteren sollten mögliche Signaltransduktionswege in diesem Zusammenhang untersucht werden.

Dazu wurden Keratinozyten *in vitro* mit PRGF stimuliert und experimentelle Hautwunden an gesunden Probanden (n=5) mit Vivostat PRF® behandelt. Die mRNA-Expression von hBD-2 und hBD-3 wurde mittels semiquantitativer Echtzeit-PCR ermittelt. Ergänzend dazu wurde die hBD-2-Proteinexpression im ELISA bzw. die hBD-2- und hBD-3-Promotoraktivierung in Genreporter-Experimenten bestimmt. Dabei zeigte sich *in vitro* und *in vivo* für beide Proteine eine ausgeprägte Induktion, die in Zellkulturversuchen nach 24-72 Stunden am höchsten ausfiel. Die Analyse der Zytokinexpression nach Stimulation mit PRGF *in vitro* ergab zudem eine frühe Expression von Interleukin-6 durch die Keratinozyten. Inhibitionsversuche mit dem IL-6-Rezeptorantikörper *Tocilizumab* zeigten, dass IL-6 für die PRGF-vermittelte hBD-2- und hBD-3-Expression als auto- bzw. parakriner Stimulus mitverantwortlich

ist. Zudem konnte mittels des Antikörpers *Cetuximab* eine Abhängigkeit der Expression beider Peptide vom epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ermittelt werden, die vor allem für hBD-3 sehr ausgeprägt besteht. Durch die Transfektion von Plasmiden, die punktuell mutierte Sequenzen des hBD-2-Promotors enthielten, in Keratinozyten und die anschließende Stimulation mit PRGF, konnte gezeigt werden, dass die Expression von hBD-2 in diesem Zusammenhang vom Transkriptionsfaktor AP-1, jedoch nicht von NF- κ B abhängig ist.

Zusammenfassend zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass PRGF bzw. Vivostat PRF[®] die antimikrobiellen Peptide hBD-2 und hBD-3 in Keratinozyten stark induzieren, wobei diese Induktion sowohl vom auto- bzw. parakrin aktivierten IL-6-Rezeptor, als auch vom epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor abhängig ist. Für die PRGF-vermittelte hBD-2-Expression scheint zudem der Transkriptionsfaktor AP-1 wichtig zu sein, nicht jedoch NF- κ B. Diese Prozesse könnten in Zusammenhang mit der verbesserten Heilungstendenz chronischer Wunden stehen, die nach Applikation von PRGF bzw. Vivostat PRF[®] beobachtet wurde.

6 Literaturverzeichnis

Agale, S.V. (2013): Chronic leg ulcers: epidemiology, aetiopathogenesis and management. *Ulcers*, 2013, 413604.

Anitua, E., Aguirre, J.J., Algorta, J., Ayerdi, E., Cabezas, A.I., Orive, G., Andia, I. (2008): Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 84, 415-421.

Anitua, E., Alonso, R., Girbau, C., Aguirre, J.J., Muruzabal, F., Orive, G. (2012): Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clin Exp Dermatol*, 37, 652-657.

Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., Nurden, A. T. (2004): Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 91, 4-15.

Anitua, E., Pino, A., Orive, G. (2016): Plasma rich in growth factors promotes dermal fibroblast proliferation, migration and biosynthetic activity. *J Wound Care*, 25, 680-687.

Arranz-Valsero, I., Soriano-Romaní, L., García-Posadas, L., López-García, A., Diebold, Y. (2014): IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vivo scratch assay. *Exp Eye Res*, 125, 183-192.

Auvynet, C., Rosenstein, Y. (2009): Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS J*, 276, 6497-6508.

Barsotti, M.C., Losi, P., Briganti, E., Sanguinetti, E., Magera, A., Al Kayal, T., Feriani, R., Di Stefano, R., Soldani, G. (2013): Effect of platelet lysate on human cells involved in different phases of wound healing. *PLoS One*, 8, e94753.

Bayer, A., Lammel, J., Lippross, S., Klüter, T., Behrendt, P., Tohidnezhad, M., Pufe, T., Cremer, J., Jahr, H., Rademacher, F., Gläser, R., Harder, J. (2017a): Platelet-released growth factors induce psoriasis in keratinocytes: Implications for the cutaneous barrier. *Ann Anat*, 213, 25-32.

Bayer, A., Tohidnezhad, M., Berndt, R., Lippross, S., Behrendt, P., Klüter, T., Pufe, T., Jahr, H., Cremer, J., Rademacher, F., Simanski, M., Gläser, R., Harder, J. (2017c): Platelet-released growth factors inhibit proliferation of primary keratinocytes in vitro. *Ann Anat*, 215, 1-7.

Bayer, A., Tohidnezhad, M., Lammel, J., Lippross, S., Behrendt, P., Klüter, T., Pufe, T., Jahr, H., Cremer, J., Rademacher, F., Gläser, R., Harder, J. (2017b): Platelet-released growth factors induce differentiation of primary keratinocytes. *Mediators Inflamm*, 2017, 5671615.

Berger, F., Paulmurugan, R., Bhaumik, S., Gambhir, S.S. (2008): Update kinetics and biodistribution of ¹⁴C-D-luciferin – a radiolabeled substrate for the firefly luciferase catalyzed bioluminescence reaction: impact on bioluminescence based reporter gene imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35, 2275-2285.

- Butmarc, J., Yufit, T., Carson, P., Falanga, V. (2004): Human beta-defensin-2 expression is increased in chronic wounds. *Wound Repair Regen*, 12, 439-443.
- Carpenter, G., Cohen, S. (1979): Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem*, 48, 193-216.
- Carpenter, G., Cohen, S. (1990): Epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 265, 7709-7712.
- Cordes, J., Wittersheim, M., Harder, J., Gläser, R. (2014): Hauteigene Antibiotika. Wichtige Erkenntnisse über antimikrobielle Peptide für Klinik und Praxis. *Hautarzt*, 65, 50-55.
- De Winter, J.C.F. (2018): Using the Student's t-test with extreme small sample sizes. *Practical Assessment, Research & Evaluation*, 18, 10.
- Dhople, V., Krukemeyer, A., Ramamoorthy, A. (2006): The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 1499-1512.
- Dressel, S., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Meyer-Hoffert, U., Sunderkötter, C., Gläser, R. (2010): Differential expression of antimicrobial peptides in margins of chronic wounds. *Exp Dermatol*, 19, 628-632.
- Eckert, R. L., Crish, J. F., Robinson, N. A. (1997): The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev*, 77, 397-424.
- Edwards, D. R., Handsley, M. M., Pennington, C. J. (2008): The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, 29, 258-289.
- Eppley, B.L., Woodell, J. E., Higgins, J. (2004): Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 114, 1502-1508.
- Falanga, V. (2005): Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*, 366, 1736-1743.
- Firat, Y. H., Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Brasch, J., Harder, J. (2014): Infection of keratinocytes with *Trichophyton rubrum* induces epidermal growth factor-dependent RNase 7 and human beta-defensin-3 expression. *PLoS One*, 9, e93941.
- Galkowska, H., Olszewski, W. L., Wojewodzka, U. (2005): Expression of natural antimicrobial peptide beta-defensin-2 and Langerhans cell accumulation in epidermis from human non-healing leg ulcers. *Folia Histochem Cytobiol*, 43, 133-136.
- Ganz, T., Lehrer, R. I. (1998): Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol*, 10, 41-44.
- Golebiewska, E. M., Poole, A. W. (2015): Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*, 29, 153-162.
- Graziani, F., Ivanovski, S., Cei, S., Ducci, F., Tonetti, M., Gabriele, M. (2006): The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res*, 17, 212-219.

- Grönberg, A., Mahlapuu, M., Ståhle, M., Whately-Smith, C., Rollmann, O. (2014): Treatment with LL-37 is safe and effective in enhancing healing of hard-to-heal venous leg ulcers: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Wound Repair Regen*, 22, 613-621.
- Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B., Gottlieb, A. B. (1989): Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6367-6371.
- Harder, J. (2008): Antimicrobial peptides: ancient molecules as modern therapeutics? *Expert Rev Dermatol*, 3, 1-5.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J. M. (1997): A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387, 861.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J. M. (2001): Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 276, 5707-5713.
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S., Schröder, J. M. (2000): Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 22, 714-721.
- Herbst, R. S. (2004): Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59, 21-26.
- Herbst, R. S., Shin, D. M. (2002): Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer*, 94, 1593-1611.
- Hess, J., Angel, P., Schorpp-Kistner, M. (2004): AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, 117, 5965-5973.
- Heyer, K., Protz, K., Augustin, M., Herberger, K. (2016): Epidemiologie und Versorgungssituation chronischer Wunden in Deutschland. *Phlebologie*, 45, 75-80.
- Hirsch, T., Spielmann, M., Zuhaili, B., Fossum, M., Metzigg, M., Koehler, T., Steinau, H. U., Yao, F., Onderdonk, A. B., Steinstraesser, L., Eriksson, E. (2009): Human beta-defensin-3 promotes wound healing in infected diabetic wounds. *J Gene Med*, 11, 220-228.
- Hirsch, T., Spielmann, M., Zuhaili, B., Koehler, T., Fossum, M., Steinau, H. U., Yao, F., Steinstraesser, L., Onderdonk, A. B., Eriksson, E. (2008): Enhanced susceptibility to infections in a diabetic wound healing model. *BMC Surg*, 8, 5.
- Horii, K., Kanayama, T., Miyamoto, H., Kohgo, T., Tsuchimochi, T., Shigetomi, T., Yokoi, M. (2014): Platelet-rich fibrin has a healing effect on chemotherapy-induced mucositis in hamsters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 117, 445-53.
- Hunt, D. (2009): Diabetes: foot ulcers and amputations. *BMJ Clin Evid*, 2009, 0602.

Janušonis, S. (2009): Comparing two small samples with an unstable, treatment-independent baseline. *J Neurosci Methods*, 179, 173–178.

Johnston, A., Gudjonsson, J. E., Aphale, A., Guzman, A. M., Stoll, S. W., Elder, J. T. (2011): EGFR and IL-1 signaling synergistically promote keratinocyte antimicrobial defenses in a differentiation-dependent manner. *J Invest Dermatol*, 131, 329-337.

Kakudo, N., Kushida, S., Ogura, T., Hara, T., Suzuki, K., Kusumoto, K. (2012): The use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of intractable skin ulcer: a case series. *J Regen Med*, 1, 29-32.

Kakudo, N., Minakata, T., Mitsui, T., Kushida, S., Notodihardjo, F. Z., Kusumoto, K. (2008): Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg*, 122, 1352-1360.

Kanda, N., Ishikawa, T., Watanabe, S. (2010): Prostaglandin D2 induces the production of human beta-defensin-3 in human keratinocytes. *Biochem Pharmacol*, 79, 982-989.

Karin, M., Liu, Z. G., Zandi, E. (1997): AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 240-246.

Kawasumi, M., Kitoh, H., Siwicki, K. A., Ishiguro, N. (2008): The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. *J Bone Joint Br*, 90, 966-972.

Kawauchi, K., Yagihashi, A., Tsuji, N., Uehara, N., Furuya, D., Kobayashi, D., Watanabe, N. (2006): Human beta-defensin-3 induction in *H. pylori*-infected gastric mucosal tissues. *World J Gastroenterol*, 12, 5793-5797.

Kilian, O., Flesch, I., Wensch, S., Taborski, B., Jork, A., Schnettler, R., Jonuleit, T. (2004): Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *Eur J Med Res*, 9, 337-344.

Kisich, K. O., Howell, M. D., Boguniewicz, M., Heizer, H. R., Watson, N. U., Leung, D. Y. (2007): The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on beta-defensin 3. *J Invest Dermatol*, 127, 2368-2380.

Knighton, D. R., Ciresi, K. F., Fiegel, V. D., Austin, L. L., Butler, E. L. (1986): Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg*, 204, 322-330.

Krisanaprakornkit, S., Kimball, J. R., Dale, B. A. (2002): Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family. *J Immunol*, 168, 316-324.

Kuhn, K. A., Manieri, N. A., Liu, T. C., Stappenbeck, T. S. (2014): IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury. *PLoS One*, 9, e114195.

Lan, C. C. E., Wu, C. S., Huang, S. M., Kuo, H. Y., Wu, I. H., Liang, C. W., Chen, G. S. (2012): High-glucose environment reduces human β -defensin-2 expression in human keratinocytes: implications for poor diabetic wound healing. *Br J Dermatol*, 166, 1221-1229.

- Lan, C. C. E., Wu, C. S., Huang, S. M., Kuo, H. Y., Wu, I. H., Wen, C. H., Chai, C. Y., Fang, A. H., Chen, G. S. (2011): High-glucose environment inhibits p38MAPK signaling and reduces human β -3 expression in keratinocytes. *Mol Med*, 17, 771-779.
- Langer, C. J. (2004): Emerging role of epidermal growth factor receptor inhibition in therapy for advanced malignancy: focus on NSCLC. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58, 991-1002.
- Lawrence, P. F., Gazak, C. E. (2000): Epidemiology of Chronic Venous Insufficiency. In: Ballard, J.L., Bergan, J.J. (Hrsg.) *Chronic Venous Insufficiency*, S. 3-8, Springer, London.
- Lee, J. I., Burckart, G. J. (1998): Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol*, 38, 981-993.
- Li, D., Zhang, L., Yin, H., Xu, H., Trask, J. S., Smith, D. G. et al (2014): Evolution of primate α and θ defensins revealed by analysis of genomes. *Mol Biol Rep*, 41, 3859-3866.
- Li, Q., Verma, I. M. (2002): NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2, 725-734.
- Lipsky, B. A., Holroyd, K. J., Zasloff, M. (2008): Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clin Infect Dis*, 47, 1537-1545.
- López-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., Molina-Miñano, Vicente-Ortega, V. (2009): Effects of plasma rich in growth factors on wound healing of the tongue. Experimental study in rabbits. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 14, e425-e428.
- Maisetta, G., Batoni, G., Esin, S., Florio, W., Bottai, D., Favilli, F., Campa, M. (2006): In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 806-809.
- Martin, P. (1997): Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276, 75-81.
- Mast, B. A., Schultz, G. S. (1996): Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen*, 4, 411-420.
- Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., Shiina, M. (2012): IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 122, 143-159.
- Miron, R. J., Fujioka-Kobayashi, M., Bishara, M., Zhang, Y., Hernandez, M., Choukroun, J. (2017): Platelet-rich fibrin and soft tissue wound healing: a systematic review. *Tissue Eng Part B Rev*, 23, 83-99.
- Molina-Miñano, F., López-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., Vicente-Ortega, V. (2009): The use of plasma rich in growth factors on wound healing in the skin: experimental study in rabbits. *Int Wound J*, 6, 145-148.
- Muhammad, J. S., Zaidi, S. F., Zhou, Y., Sakurai, H., Sugiyama, T. (2016): Novel epidermal growth factor receptor pathway mediates release of human β -defensin 3 from *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Pathog Dis*, 74, pii: ftv128.

- Näbert, K. (2006): Untersuchungen zur molekularen Regulation der Transkription des humanen Beta-Defensin-3 in Keratinozyten. Med. Diss., Kiel.
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Okumura, K., Ogawa, H. (2005): The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol*, 175, 1776-1784.
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., Nagaoka, I., Okumura, K., Ogawa, H. (2007): Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol*, 127, 594-604.
- O'Connell, S. M., Impeduglia, T., Hessler, K., Wang, X. J., Carroll, R. J., Dardik, H. (2008): Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers. *Wound Repair Regen*, 16, 749-756.
- Ogushi, K., Wada, A., Niidome, T., Mori, N., Oishi, K., Nagatake, T., Takahashi, A., Asakura, H., Makino, S., Hojo, H., Nakahara, Y., Ohsaki, M., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Kurazono, H., Moss, J., Hirayama, T. (2001): Salmonella enteritidis FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J Biol Chem*, 276, 30521-30526.
- Orcajo, B., Muruzabal, F., Isasmendi, M. C., Gutierrez, N., Sánchez, M., Orive, G., Anitua, E. (2001): The use of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) in the treatment of a severe mal perforant fulcr in the foot of a person with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 93, e65-e67.
- Pahl, R., Brunke, G., Steubesand, N., Schubert, S., Böttner, M., Wedel, T., Jürgensen, C., Hampe, J., Schäfer, H., Zeissig, S., Schreiber, S., Rosenstiel, P., Reiss, K., Arlt, A. (2011): IL-1 β and ADAM17 are central regulators of β -defensin expression in *Candida esophagitis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300, G547-G553.
- Pal, U. S., Mohammad, S., Singh, R. K., Das, S., Singh, N., Singh, M. (2012): Platelet-rich growth factor in oral and maxillofacial surgery. *Natl J Maxillofac Surg*, 3, 118-123.
- Richard, J. L., Sotto, A., Lavigne, J. P. (2011): New insights in diabetic foot infection. *World J diabetes*, 2, 24-32.
- Rivas-Santiago, B., Trujillo, V., Montoya, A., Gonzalez-Curiel, I., Castañeda-Delgado, J., Cardenas, A., Rincon, K., Hernandez, M. L., Hernández-Pando, R. (2012): Expression of antimicrobial peptides in diabetic foot ulcer. *J Dermatol Sci*, 65, 19-26.
- Roupé, K. M., Nybo, M., Sjöbring, U., Alberius, P., Schmidtchen, A., Sørensen, O. E. (2010): Injury is a major inducer of epidermal innate immune responses during wound healing. *J Invest Dermatol*, 130, 1167-1177.
- Routsias, J. G., Karagounis, P., Parvulesku, G., Legakis, N. J., Tsakris, A. (2010): In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides*, 31, 1654-1660.

- Roy, S., Driggs, J., Elgharably, H., Biswas, S., Findley, M., Khanna, S., Gnyawali, U., Bergdall, V. K., Sen, C. K. (2011): Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. *Wound Repair Regen*, 19, 753-766.
- Rüttermann, M., Maier-Hasselmann, A., Nink-Grebe, B., Burckhardt, M. (2013): Klinische Leitlinie: Lokalthherapie chronischer Wunden. Bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit, chronisch-venöser Insuffizienz und Diabetes mellitus. *Dtsch Arztebl Int*, 3, 25-31.
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., Normanno, N. (1995): Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 19, 183-232.
- Scharf, S., Hippenstiel, S., Flieger, A., Suttorp, N., N'Guessan, P. D. (2010a): Induction of human β -defensin-2 in pulmonary epithelial cells by *Legionella pneumophila*: involvement of TLR2 and TLR5, p38 MAPK, JNK, NF- κ B, and AP-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 298, L687-L695.
- Scharf, S., Vardarova, K., Lang, F., Schmeck, B., Opitz, B., Flieger, A., Heuner, K., Hippenstiel, S., Suttorp, N., N'Guessan, P. D. (2010b): *Legionella pneumophila* induces human beta Defensin-3 in pulmonary cells. *Respir Res*, 11, 93.
- Scharf, S., Zahlten, J., Szymanski, K., Hippenstiel, S., Suttorp, N., N'Guessan, P. D. (2012): *Streptococcus pneumoniae* induces human β -defensin-2 and -3 in human lung epithelium. *Exp Lung Res*, 38, 100-110.
- Scholz, J., Görg, S. (2016): Transfusionsordnung. Anweisung für die Durchführung von Bluttransfusionen. Universitätsklinikum Schleswig-Holstein. Internetlink: https://www.uksh.de/uksh_media/Dateien_Kliniken_Institute+/Diagnostikzentrum/Transfusion_smedizin/Dokumente/Transfusionsordnung-p-18942.pdf
- Schröder, J. M., Harder, J. (1999): Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 31, 645-651.
- Sehgal, P. B., Sagar, A. D. (1980): Heterogeneity of poly(I) x poly(C)-induced human fibroblast interferon mRNA species. *Nature*, 288, 95-97.
- Sen, C. K., Gordillo, G. M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T. K. et al. (2009): Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Rep Reg*, 17, 763-771.
- Shaulian, E., Karin, M. (2001): AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20, 2390-2400.
- Sherf, B. A., Navarro, S. L., Hannah, R. R., Wood, K. V. (1996): Dual-LuciferaseTM reporter assay: an advanced co-reporter technology integrating firefly and *Renilla* luciferase Assays. *Promega Notes Magazine*, 57, 2.
- Singh, P. K., Jia, H. P., Wiles, K., Hesselberth, J., Lius, L., Conway, B. A., Greenberg, E. P., Valore, E. V., Welsh, M. J., Ganz, T., Tack B. F., McCray, P. B. Jr. (1998): Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14961-14966.
- Smola, H., Eming, S. A., Hess, S., Werner, S., Krieg, T. (2001): Wundheilung und Wundheilungsstörungen. *Moderne Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie*. *Dtsch Arztebl*, 98, A 2802–2809.

Sørensen, O. E., Cowland, J. B., Theilgaard-Mönch, K., Liu, L., Ganz, T., Borregaard, N. (2003): Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol*, 170, 5583-5589.

Sørensen, O. E., Thapa, D. R., Rosenthal, A., Liu, L., Roberts, A. A., Ganz, T. (2005): Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol*, 174, 4870-4979.

Sørensen, O. E., Thapa, D. R., Roupé, K. M., Valore, E. V., Sjöbring, U., Roberts, A. A., Schmidtchen, A., Ganz, T. (2006): Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest*, 116, 1878-1885.

Steen Voorde, P., van Doorn, L. P., Naves, C., Oskam, J. (2008): Use of autologous platelet-rich fibrin on hard-to-heal wounds. *J Wound Care*, 17, 60-63.

Steubesand, N., Kiehnke, K., Brunke, G., Pahl, R., Reiss, K., Herzig, K. H., Schubert, S., Schreiber, S., Fölsch, U. R., Rosenstiel, P., Arlt, A. (2009): The expression of the beta-defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF-kappaB and MAPK/AP-1 pathways in an in vitro model of *Candida esophagitis*. *BMC Immunol*, 10, 36.

Supp, D. M., Gardner, J., Klingenberg, J. M., Neely, A. N. (2009): Antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* does not impact sensitivity to human beta defensin 4. *Burns*, 35, 949-955.

Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T. (2014): IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a016295.

Tohidnezhad, M., Varoga, D., Wruck, C. J., Brandenburg, L. O., Seekamp, A., Shakibaei, M., Sönmez, T. T., Pufe, T., Lippross, S. (2011): Platelet-released growth factors can accelerate tenocyte proliferation and activate the anti-oxidant response element. *Histochem Cell Biol*, 135, 453-460.

Van den Dolder, J., Mooren, R., Vloon, A. P. G., Stoeltinga, P. J. W., Jansen, J. A. (2006): Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng*, 12, 3067-3073.

Wada, A., Ogushi, K., Kimura, T., Hojo, H., Mori, N., Suzuki, S., Kumatori, A., Se, M., Nakahara, Y., Nakamura, M., Moss, J., Hirayama, T. (2001): *Helicobacter pylori*-mediated transcriptional regulation of the human beta-defensin 2 gene requires NF-kappaB. *Cell Microbiol*, 3, 115-123.

Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schröder, J. M., Stange, E. F. (2004): NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun*, 72, 5750-5758.

Wehkamp, K. (2005): Untersuchungen zur molekularen Regulation der Transkription des humanen Beta-Defensin-2 in epidermalen Keratinozyten. *Med. Diss., Kiel*.

- Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., Schröder, J. M., Harder, J. (2006): Pseudomonas aeruginosa- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. *J Invest Dermatol*, 126, 121-127.
- Weibric, G., Buch, R. S. R., Kleis, W. K. G., Hafner, G., Hitzler, W. E., Wagner, W. (2002): Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth Factors*, 20, 93-97.
- Weinberg, A., Jin, G., Sieg, S., McCormick, T. S. (2012): The yin and yang of human beta-defensins in health and disease. *Front Immunol*, 3, 294.
- Weissenbach, J., Chernajovsky, Y., Zeevi, M., Shulman, L., Soreq, H., Nir, U., Wallach, D., Perricaudet, M., Tiollais, P., Revel, M. (1980): Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 7152-7156.
- Whitman, D. H., Berry, R. L., Green, D. M. (1997): Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*, 55, 1294.
- Wolf, J., Rose-John, S., Garbers, C. (2014): Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*, 70, 11-20.
- Xian, L. J., Chowdhury, S. R., Bin Saim, A., Idrus, R. B. (2015): Concentration-dependent effect of platelet-rich plasma on keratinocyte and fibroblast wound healing. *Cytotherapy*, 17, 293-300.
- Yarden, Y. (2001): The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 37, 3-8.
- Yazawa, M., Ogata, H., Najakjima, T., Mori, T., Watanabe, N., Handa, M. (2003): Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. *Cell Transplant*, 12, 509-518.
- Yoon, Y. M., Lee, J. Y., Yoo, D., Sim, Y. S., Kim, Y. J., Oh, Y. K., Kang, J. S., Kim, S., Kim, J. S., Kim, J. M. (2010): Bacteroides fragilis enterotoxin induces human beta-defensin-2 expression in intestinal epithelial cells via a mitogen-activated protein kinase/ I kappaB kinase/NF-kappaB-dependent pathway. *Infect Immun*, 78, 2024-2033.
- Zanger, P., Nurjadi, D., Vath, B., Kremsner, P. G. (2011): Persistent nasal carriage of Staphylococcus aureus is associated with deficient induction of human beta-defensin 3 after sterile wounding of healthy skin in vivo. *Infect Immun*, 79, 2658-2662.
- Zasloff, M. (1987): Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 5449-53.
- Zasloff, M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-95.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Regine Gläser danken, die mir freundlicherweise die Möglichkeit zur Teilnahme an diesem Forschungsprojekt verschaffte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Harder und Herrn PD Dr. Andreas Bayer für die herausragende Anleitung und Unterstützung in theoretischen und praktischen Belangen sowie für die motivierenden und lehrreichen Gespräche, welche neben wissenschaftlichem Interesse stets von wohlwollender Freundlichkeit geprägt waren.

Des Weiteren möchte ich Heilwig, Conny und Franzi herzlich danken, deren Hilfsbereitschaft und persönliches Engagement mir bei der experimentellen Arbeit von großer Hilfe waren.

Allen bisher genannten danke ich für Ihre nette und humorvolle Art, die die Zeit im Labor auch zu einer persönlich sehr angenehmen Erfahrung für mich machte.

Als treue Begleiter meines Studiums, während der langen Stunden in der Bibliothek und im Leben danke ich meinen Freunden und meiner Marie.

Immerwährender Dank gilt meiner Familie, deren Liebe und Unterstützung das Fundament für alles bildet.