

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für
Technische Orthopädie und Rehabilitation
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. H. Wetz -

Molekulare Risikofaktoren für Dekubitus bei Querschnittsgelähmten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des **doctor medicinae dentium**

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Kahlke, Sven
aus Gütersloh
2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Thomas Meiners
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Henning Wetz

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für
Technische Orthopädie und Rehabilitation
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. H. Wetz -

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Meiners
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Henning Wetz

Zusammenfassung

Molekulare Risikofaktoren für Dekubitus bei Querschnittsgelähmten

Kahlke, Sven

Zur Lokalisierung molekularer Risikofaktoren wurden Gewebeproben von querschnittsgelähmten Patienten, welche an Dekubitus leiden, mittels PAI/L Bioassay und histologischen Färbungen untersucht und Kontrollgeweben gesunder Patienten gegenübergestellt. Die Gewebeproben stammen zum einen vom direkten Wundrand des Dekubitus und zum anderen von einer nicht verletzten Stelle, ca. 10 cm von der Wunde entfernt. Die Kontrollgewebe kommen von gesunden, nicht gelähmten Patienten, aber aus derselben Hautregion wie die Proben der verletzten Haut.

Es wurde gezielt nach dem Wachstumsfaktor Transforming growth factor beta (TGF- β) und dessen Aktivität gesucht. Die Hypothese war, dass es durch die fehlende bzw. fehlgeleitete Nervenaktivität bei den querschnittsgelähmten Patienten zur Ausbildung von Ödemen kommt und dadurch feste Blutbestandteile in das interstitielle Gewebe vordringen können. Von diesen Blutzellen stellen gerade die Thrombozyten eine Hauptquelle von TGF- β dar.

Während der Anstieg der TGF- β -Aktivität in Druckgeschwüren, verglichen mit normaler Haut, zu erwarten war, fiel auf, dass die TGF- β -Werte in unverletzter, gelähmter Haut nahezu doppelt so hoch waren wie in nicht gelähmter, unverletzter Haut. Im Vergleich mit unverletzter, gesunder Haut waren die TGF- β -Werte der wundnahen Proben fast vierfach erhöht.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2011

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung		Seite
1.	Wundheilung	1
1.1.	Die Entzündungsphase	3
1.2.	Die Reepithelialisierungsphase	4
1.3.	Narbenbildung – Umbau der extrazellulären Matrix und fötale Wundheilung	6
2.	Wundheilungsstörungen	9
2.1.	Fibrose	10
2.2.	Chronische Ulzera	11
3.	TGF- β und Wundheilung	13
3.1.	TGF- β -Isoformen	14
3.2.	Biologische Effekte von TGF- β	14
3.2.1.	Chemotaxis und Migration	15
3.2.2.	Angiogenese	15
3.2.3.	Extrazelluläre Matrix	16
4.	TGF- β -Latenz	16
4.1.	Aktivierung von latentem TGF- β	18
4.1.1.	Physiochemische Aktivierung	20
4.1.2.	Strahlung und Sauerstoffradikale	20
4.1.3.	Ko-Kulturen	20
4.2.	Enzymatische Mechanismen der latenten TGF- β -Aktivierung	21
4.2.1.	Aktivierung durch Plasmin	21
4.2.2.	Aktivierung durch Kathepsin	21
4.2.3.	Aktivierung durch Kalpain	22
4.2.4.	Aktivierung durch Matrix-Metallo-Proteinnasen (MMP)	22
4.2.5.	Aktivierung durch Deglykolysierung	22
4.2.6.	Aktivierung durch Blutplättchen	22
4.3.	TGF- β -Aktivierung durch nicht-enzymatische Wechselwirkungen	23
4.3.1.	Thrombospondin-1	23
4.3.2.	Integrine	23

5.	GDF-5 und Wundheilung	24
6.	Aktivin	24
7.	Zielstellung	25

II. Material und Methoden

1.	Liste der Materialien	26
2.	Zellkultur	28
3.	PAI/L Bioassay	30
3.1.	Allgemeines	30
3.2.	MLECs vorbereiten	30
3.3.	Cryoschnitte	30
3.4.	Standardkurve	31
3.5.	Verdünnung der Antikörper	31
3.6.	Ausplattierung	33
3.7.	Lysieren und waschen	33
3.8.	Vorbereitung zur Luziferaseaktivitätsmessung	33
3.9.	Luminometer	35
4.	Real Time – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	36
4.1.	Allgemeines zur Handhabung von RNA	36
4.2.	RNA-Gewinnung	36
4.3.	RNA-Quantifizierung	37
4.4.	RNA-Gelelektrophorese	38
4.5.	cDNA-Synthese	39
4.6.	RT-PCR Programmablauf	39
5.	Herstellung von Gefrierschnitten	43
6.	Fluoreszenzfärbung	43
6.1.	Cryoschnitte anfertigen	43
6.2.	Verdünnung der Antikörper	44
6.3.	Auftragen der Antikörper	44

III. Ergebnisse

1.	TGF- β -Aktivität	40
----	-------------------------	----

Inhaltsverzeichnis

2.	Aktivitätsverteilung auf TGF- β und Aktivin-A	41
3.	Aktivitätsverteilung von TGF- β und Aktivin-A in Haut und Wunden von Querschnittsgelähmten	47
4.	Polymerasekettenreaktion	51
5.	Histologie	58

IV. Diskussion

1.	Problemfeld und Fragestellung	69
2.	Hypothese	71
2.1.	Ausbildung von Druckgeschwüren bei Querschnittsgelähmten	71
2.2.	Histologie	72
2.3.	Die Rolle von TGF- β bei der Ausbildung von Druckgeschwüren	73
3.	Ergebnisdiskussion	74
3.1.	TGF- β -Aktivität	75
3.2.	Aktivitätsverteilung	76
3.3.	PCR-Screening-Ansatz zum Nachweis von TGF- β -Aktivatoren	77
3.3.1.	GPI-PLD	77
3.3.2.	PACE4	78
3.3.3.	GDF-5	79
4.	Klinische Relevanz	79
5.	Fazit	82

V. Literaturverzeichnis	84
--------------------------------	----

VI. Abkürzungsverzeichnis	96
----------------------------------	----

VII. Danksagung	104
------------------------	-----

VIII. Lebenslauf	105
-------------------------	-----

VII. Anhang	I
--------------------	---

Einleitung

1. Wundheilung

Der Wundheilung kommt eine lebenswichtige Funktion zu. Sie sorgt dafür, dass es nach einer Verletzung zu einer Infektabwehr kommt und durch schnelle Blutstillung der Organismus am Leben erhalten wird. Diese beiden Funktionen sind prioritär. Sekundär sind die Gewebewiederherstellung und der Funktionserhalt.

Erstes Ziel der reparativen Vorgänge ist es, die Blutung zu stillen. Durch die Verletzung werden aus den geschädigten Zellen vasoaktive Substanzen freigesetzt, die eine Vasokonstriktion zur Vermeidung größerer Blutverluste bewirken, bis durch Thrombozytenaggregation ein erster Gefäßverschluss hergestellt ist. Die im Blutplasma zirkulierenden Blutplättchen heften sich am Verletzungsort an die geschädigten Gefäße und bilden einen Pfropf, der die Gefäße zunächst provisorisch verschließt. Mit dem komplexen Vorgang der Thrombozytenaggregation wird das Gerinnungssystem aktiviert, um die Verletzungsstelle dauerhaft zu verschließen. Die in Stufen ablaufende Blutgerinnung, an der etwa 30 verschiedene Faktoren beteiligt sind, führt zur Bildung eines unlöslichen Fibrinnetzes aus Fibrinogen. Es entsteht ein Gerinnsel, das die Blutung stoppt, die Wunde verschließt und gegen weitere bakterielle Kontamination und Flüssigkeitsverlust schützt. Um den Gesamtorganismus dabei nicht durch sich ausbreitende thrombotische Prozesse zu gefährden, müssen Thrombozytenaggregation und die Vorgänge der Blutgerinnung lokal auf den Ort der Verletzung beschränkt bleiben. Im strömenden Blut wird der Gerinnungsvorgang deshalb ständig durch Substanzen des fibrinolytischen Systems kontrolliert.

Die Infektabwehr besteht darin, dass zwei bis vier Stunden nach der Verletzung Leukozyten in das verletzte Gewebe einwandern, die als Phagozyten zur Phagozytose von Detritus, körperfremdem Material und Keimen, befähigt sind. In der initialen Entzündungsphase überwiegen

hierbei neutrophile Granulozyten, die verschiedene entzündungsfördernde Botenstoffe, so genannte Zytokine, in die Wunde sezernieren, Bakterien phagozytieren, aber auch eiweißspaltende Enzyme freisetzen, die beschädigte und avitale Bestandteile der extrazellulären Matrix beseitigen. Dies bedeutet eine erste Reinigung der Wunde. Im Gefolge der Granulozyten wandern etwa 24 Stunden später Monozyten in das Wundgebiet ein, die sich dann im Wundgebiet zu Makrophagen ausdifferenzieren, die Phagozytose fortsetzen, aber auch durch Sezernierung weiterer Zytokine und Wachstumsfaktoren entscheidend in das Geschehen eingreifen.

Die Heilung von Wunden kann in drei Phasen eingeteilt werden (s.a. Abb.1): zunächst die frühe und späte Entzündungsphase, anschließend die Phase der Reepithelialisierung und Bildung von Granulationsgewebe und abschließend die Phase der Narbenbildung. Diese Einteilung ist willkürlich und die verschiedenen Phasen überlappen sich deutlich (Clark, 1996).

Schematische Darstellung des Zeitablaufes der Wundheilungsphasen:

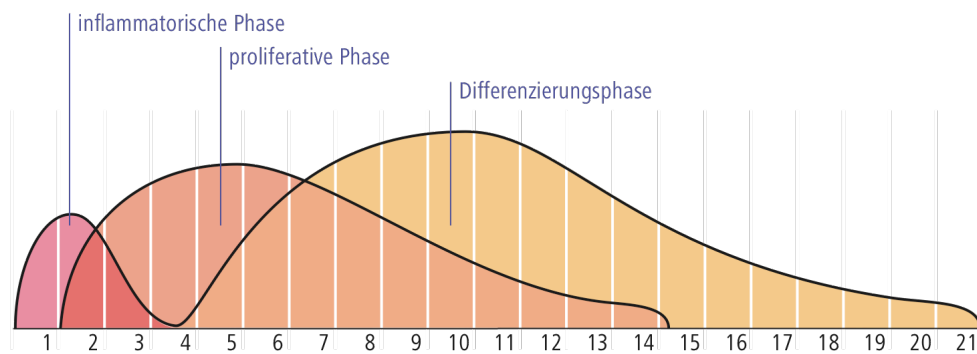


Abb. 1: Die Überlappung der Wundheilungsphasen.

Kompendium Wunde und Wundbehandlung,
Paul Hartmann AG, Deutschland (2005).

1.1. Die Entzündungsphase

Eine Verletzung verursacht einen Riss in einem Blutgefäß. Dadurch kommt es zur Extravasation von Plasmaproteinen und Blutzellen. Über die primäre Blutstillung (zelluläre Hämostase) kommt es zur Bildung eines Fibringerinnsels, welches zum einen die Wunde schließt und zum anderen ein provisorisches Grundgerüst für die weitere Zellmigration darstellt.

Die das zelluläre Gerüst des Fibringerinnsels bildenden und aktivierten Thrombozyten enthalten α -Granula, die sie abgeben, sobald sie aktiviert wurden. Die α -Granula enthalten viele Adhäsionsproteine wie z. B. Fibrinogen, Fibronectin, Thrombospondin und den von Willebrand Faktor. Weiterhin werden chemotaktische sowie Wachstumsfaktoren freigesetzt. Zu den Wachstumsfaktoren gehört neben dem Platelet Derived Growth Factor (PDGF) auch der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) (Clark, 1996).

Unter anderem durch die Freisetzung von TGF- β – für den das Fibringerinnsel ein Reservoir darstellt – infiltrieren neutrophile Granulozyten und Monozyten das Wundgebiet (Wahl et al., 1987). Granulozyten und Monozyten wandern gleichzeitig in das Wundgebiet ein, jedoch kommen die Neutrophilen aufgrund der im Blut schwimmenden Menge zuerst in großer Zahl. Die neutrophilen Granulozyten phagozytieren Bakterien und Gewebetrümmer und lysieren diese mittels Lysozym, Hydrolasen und Lactoferrin, wobei sie selbst zugrunde gehen. Die Aktivität der Neutrophilen endet, sofern keine erhebliche Bakterieninvasion stattgefunden hat, nach wenigen Tagen. Die meisten verfangen sich im Fibringerinnsel oder dem ausgetrockneten Gewebe und gehen mit dem Wundschorf verloren. Granulozyten, die in lebensfähigem Gewebe verbleiben, werden von Gewebsmakrophagen phagozytiert (Clark, 1996).

Während die Infiltration der neutrophilen Granulozyten zurückgeht, akkumulieren die Monozyten weiter. Ebenso wie die Neutrophilen werden sie über verschiedene chemotaktische Faktoren dazu gebracht, an der Endothelwand zu adhäreren und in das umgebende Gewebe zu migrieren. Die Adhäsion der Monozyten an die Endothelwand stimuliert sie dazu, sich

in Makrophagen zu differenzieren. Durch die Aktivierung über Bakterientoxine sezernieren und aktivieren sie selbst Wachstumsfaktoren wie z. B. TGF- β , Interleukin-1 (IL-1) und PDGF. So werden weitere Entzündungszellen in das Wundgebiet gelockt.

Die von den Makrophagen sezernierten Faktoren sind wichtig für den Beginn und die Aufrechterhaltung der Gewebsneubildung, da aus einer Verminderung der Makrophagen im Tierversuch eine inadäquate Wundheilung resultiert (Leibovich und Ross, 1975; Clark, 1996).

Gerade bei Druckgeschwüren ist die Phase der Entzündung gestört. Der Wundraum wird nahezu im Stadium der Entzündung eingefroren und die Phase wird chronisch. Charakteristisch dafür sind die in Massen auftretenden neutrophilen Granulozyten, reaktive Sauerstoffmoleküle und destruktive Enzyme (Diegelmann und Evans, 2004).

Bei querschnittsgelähmten Patienten kommt es zusätzlich zu einer Veränderung der Immunkompetenz. Das Nervensystem und das Immunsystem beeinflussen sich gegenseitig. Die Freisetzung von Cytokinen durch immunologische Zellen beeinflusst die zerebrale Hormonfreisetzung. Diese Hormone können dann direkt oder indirekt auf Immunozyten Einfluss nehmen (Arnason, 2000; Jichici, 2000). So kommt es durch die Lähmung zu einer beeinträchtigten phagozytären Aktivität, die ein Ausdruck der Dysregulation des Nervensystems darstellt (Meiners, 2003).

1.2. Die Reepithelialisierungsphase

Innerhalb kürzester Zeit beginnt die Reepithelialisierung der Wunde. Dabei bewegen sich Epithelzellen aus den umliegenden Strukturen in das Wundgebiet. Mit der Wanderung ändern die Epithelzellen ihre Morphologie: die intrazellulären Tonofilamente ziehen sich zusammen, interzelluläre Desmosomen trennen sich, es werden zytoplasmatische Aktinfilamente gebildet (Gabbiani et al., 1978; Odland und Ross, 1968). Ebenso verlieren die Zellen die Verbindung zwischen Dermis und Epidermis (Krawczyk und Wilgram, 1973). Aufgrund dieser Veränderungen des Phänotyps haben die Zellen durch die „Ausbildung eines Antriebs“ die

Möglichkeit, sich nach lateral zu bewegen (Clark, 1996). Sie kehren ihre apikal-basale Polarität um und bilden an der basalen Seite Pseudopoden aus, mit denen sie sich in die Wunde hinein bewegen.

Die einwandernden Epithelzellen differenzieren sich jedoch nicht so weit, wie es normale Keratinozyten der Epidermis tun. Es finden sich zum Beispiel keine Keratinproteine, die normalerweise in der Epidermis vorhanden sind. Ebenfalls fehlt das Matrixprotein Filaggrin, welches das Keratin umhüllt. Stattdessen liegen in allen Schichten der migrierenden Zellen Keratinproteine vor, die man sonst nur in den Basalzellen findet (Mansbridge und Knapp, 1987).

Ein bis zwei Tage nach Eintritt der Verletzung beginnen die Epithelzellen an den Wundrändern zu proliferieren (Krawczyk, 1971). Welcher Stimulus dafür verantwortlich ist, ist nicht abschließend geklärt. Es gibt mehrere mögliche Auslöser. Zum einen könnte das Fehlen von Nachbarzellen am Wundrand die Migration und Proliferation von Epithelzellen auslösen. Dieser so genannte „free-edge effect“ leitet die Reendothelialisierung der Blutgefäßintima nach einer Beschädigung ein (Heimark und Schwartz, 1988). Zum anderen ist es auch möglich, dass lokal Wachstumsfaktoren ausgeschüttet werden, die dann die Migration von Epithelzellen und deren Proliferation anregen. In der Hauptsache kommen dafür Mitglieder der EGF – Epidermal Growth Factor – Familie wie TGF- α (Barrandon und Green, 1987) und HB-EGF (Higashiyama et al., 1991) sowie der FGF – Fibroblast Growth Factor – Familie (O’keefe et al., 1988; Werner et al., 1992) in Frage. Obgleich Wachstumsfaktoren häufig aus Makrophagen oder dermalen, parenchymalen Zellen stammen und parakrin auf Epidermiszellen wirken, stammen TGF- α und evtl. andere Wachstumsfaktoren aus Keratinozyten und wirken direkt autokrin oder juxtakrin auf die angrenzenden Zellen (Coffey et al., 1987; Brachmann et al., 1989). TGF- β ist in vitro in der Lage die Migration von Keratinozyten zu fördern, obwohl er ein potenter Inhibitor der Keratinozytenproliferation ist (Shipley et al., 1986). Die Migration hängt somit nicht von der Zellproliferation ab (Winter, 1962). Die anfängliche Hauptquelle an TGF- β liegt in den Thrombozyten.

Die neue Epidermisschicht legt sich nicht einfach über die Wunde, sondern trennt ausgetrocknetes oder anderes, nicht mehr lebensfähiges Gewebe von existenzfähigem Gewebe (Clark et al., 1982). Um sich überhaupt durch das Gewebe bewegen zu können, produzieren die epidermalen Zellen Kollagenase (Woodley et al., 1986) und Plasminogen Aktivator (Grohndahl-Hansen et al., 1988). Außerdem brauchen sie eine provisorische Matrix, an der sie sich entlang bewegen. Diese besteht – bei durch die Verletzung zerstörter Basalmembran – aus Typ V und Typ I Kollagen, Fibrin, Fibronectin, Tenascin und Vitronectin (Clark, 1996). Bei intakter Basalmembran infiltriert Fibronectin aus dem Blutkreislauf die Membran, und Keratinozyten mit speziellen Fibronectinrezeptoren können andocken. In der Folge der Reepithelialisierung kommen Basalmembranproteine, wie ein Reißverschluss geordnet, von den Seiten der Wunde. Die epidermalen Zellen wandeln sich wieder zu ihrem ursprünglichen Phänotyp zurück, sobald sie sich mittels Hemidesmosomen an die neu etablierte Basalmembran angelagert haben (Clark et al., 1982).

1.3. Narbenbildung – Umbau der extrazellulären Matrix und fötale

Wundheilung

Nach ungefähr vier Tagen beginnt die Bildung von Granulationsgewebe. Dieses Gewebe, das seinen Namen aufgrund der gekörnten Struktur trägt, besteht aus neuen Blutgefäßen, Makrophagen, Fibroblasten und lockerem Bindegewebe (Clark, 1996).

Ausgereifte Makrophagen innerhalb des Wundgebietes schaffen die Rahmenbedingungen für eine kontinuierliche Synthese und Sekretion von Zytokinen, welche chemotaktische und mitogene Aktivität besitzen und auch als Wachstumsfaktoren bezeichnet werden. Diese sind notwendig für den Beginn der Granulationsgewebebildung. Die zuvor gebildete provisorische Matrix bildet dabei das Gerüst, an dem entlang die das Granulationsgewebe bildenden Makrophagen, Fibroblasten und Blutgefäße in gegenseitiger Abhängigkeit in das Wundgebiet einwandern (Hunt, 1980). Die Makrophagen stellen, wie bereits dargestellt, ein ausreichendes

Reservoir an Zytokinen zur Verfügung, um die Bildung von kollagenem Bindegewebe und neuen Blutgefäßen zu stimulieren. Die Fibroblasten bilden die neue extrazelluläre Matrix, und die neuen Blutgefäße bringen Sauerstoff und Nährstoffe.

Die Bildung des kollagenen Bindegewebes wird dabei von TGF- β unterstützt, welches die Fibroblasten zur Produktion von Fibronectin und Kollagen anregt. Die Neovaskularisation wird von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1), Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2), TGF- α und TGF- β stimuliert. FGF wirkt dabei direkt auf die Migration, Proliferation und tubuläre Anordnung der Endothelzellen (Gospodarowicz et al., 1987). TGF- β hingegen arbeitet eher indirekt, indem Makrophagen in das Wundgebiet gelockt werden, die dann für die Angiogenese erforderliche Substanzen ausschütten (Kiritsy und Lynch, 1993).

Der Umbau der extrazellulären Matrix, die Zellreifung und die Apoptose von Zellen kennzeichnen die nächste Phase der Wundheilung, die sich mit der Reepithelialisierungsphase überlappt. Dabei beginnen der Umbau der extrazellulären Matrix, die Ausbildung der neuen Epidermis, die Bildung von kollagenem Bindegewebe und die Neovaskularisation an den Wundrändern, während im Wundinneren sich noch das Granulationsgewebe bildet. Räumlich gesehen unterscheidet sich also die extrazelluläre Matrix am Wundrand qualitativ und quantitativ von derjenigen im Wundinneren. Demnach basieren die Struktur und Zusammensetzung sowohl auf der seit der Verletzung vergangenen Zeit als auch auf der Entfernung vom Wundrand (Kurkinen et al., 1980).

Ist die Wunde ganz von Granulationsgewebe durchzogen und von der neuen Epidermis bedeckt, transformieren sich Fibroblasten zu Myofibroblasten, die die Wunde zusammenziehen. Der Myofibroblast ähnelt den Zellen der glatten Muskulatur und enthält wie diese den kontraktionsfähigen Muskeleiweißkörper Actomyosin. Die Myofibroblasten kontrahieren, womit gleichzeitig die Kollagenfasern gestrafft werden. Dadurch schrumpft das Narbengewebe und zieht das Hautgewebe am

Wundrand zusammen.

Auch differenzieren sich die epidermalen Zellen, um eine neue permanente Barriere zu etablieren. Als erstes kommt es dann bei den Endothelzellen zur Apoptose. Es folgen die Myofibroblasten. Das führt immer mehr zu einer azellulären Narbe. Dieser Vorgang erfolgt langsam, aber kontinuierlich (Compton et al., 1989).

Das Fortschreiten der Gewebebildung basiert aber nicht nur auf den Zellen, den Zytokinen und Enzymen, die in Wundnähe vorhanden sind, sondern auch auf dem Mikromilieu der extrazellulären Matrix. Es wird, sobald einmal die kollagene extrazelluläre Matrix etabliert ist, trotz der kontinuierlichen Anwesenheit von TGF- β , welcher die Produktion von Fibronectin und Kollagen stimuliert, die Kollagensynthese eingestellt (Clark et al., 1995).

Die Narbenbildung ist ein bedeutendes klinisches Problem. Die Wundheilung bei Erwachsenen ist – wie schon beschrieben – durch eine akute Entzündungsphase, Wundkontraktion und Kollagenaufbau charakterisiert, die dem schnellen Wundverschluss und der Minimierung von Infektionen dienen. Die embryonale bzw. fötale Wundheilung hingegen stellt sich völlig anders dar.

Der größte Unterschied liegt darin, dass fötale Wunden schnell und ohne Ausbildung einer Narbe ausheilen. Charakteristisch dabei sind der Wundverschluss ohne Schorfbildung innerhalb einer warmen und sterilen feuchten Umgebung sowie eine minimale inflammatorische Reaktion (McCallion und Ferguson, 1996) ohne markante Fibroblasteninfiltration oder Angiogenese (Adzick und Longaker, 1991, 1992). Außerdem liegt ein anderes Verhältnis von Zytokinen während der Heilung vor und deren Anzahl ist generell etwas reduziert (Whitby und Ferguson, 1991).

Die fötale Umgebung ist von fötalem Serum und dem warmen und sterilen Fruchtwasser, welches reich an Wachstumsfaktoren, Hyaluronsäure, Fibronectin und anderen Faktoren ist, durchschwemmt. Der Aufbau der Matrix ist schnell und unverletzter Haut ähnlich organisiert. Weiterhin ist die fötale Umgebung im Vergleich zu adulten Wunden eher hypoxisch. Die

Hypoxie ist ein wichtiger Faktor bei der Stimulation und Aktivierung bestimmter Wachstumsfaktoren. Sie wirkt auch auf den Metabolismus der Makrophagen und auf die Angiogenese ein und beeinflusst die Leukozytenfunktion.

Fötale Wunden heilen ohne Ausbildung eines Fibringerinnsels (Somasundaram und Prathap, 1972), welches bei der adulten Wundheilung als Reservoir für Wachstumsfaktoren gilt. Weiterhin kommt es durch die geringe Degranulation der Blutplättchen und dem relativen Fehlen von TGF- β in fötalen Blutplättchen zu einem initialen Mangel an TGF- β , der sich anschließend in einer mangelnden Entzündungsphase bei der fötalen Wundheilung darstellt (Whitby und Fergusson, 1991 a). Die fötalen Fibroblasten haben die Fähigkeit, auf Wachstumsfaktoren, auch auf TGF- β , zu reagieren (Durham et al., 1989). Folglich ist die narbenlose Heilung fötaler Wunden eher an den Mangel an TGF- β als an das Vorhandensein gebunden. Zusätzlich zeigen fötale Wunden keine Makrophageninfiltration, welche bei adulten Wunden die nachhaltigste Quelle für TGF- β darstellt.

2. Wundheilungsstörungen

Definiert man den Begriff „Heilung“, so ist es der komplexe und dynamische Prozess, der die Wiederherstellung der anatomischen Kontinuität und Funktion des Gewebes nach einer Verletzung beschreibt. Somit bezeichnet also der Begriff „Wunde“ die Unterbrechung der normalen anatomischen Struktur und der Funktion.

Es gibt verschiedene Reaktionen des Gewebes, wie es auf eine Wunde reagieren kann. Zum einen kann das Gewebe regenerieren und somit exakt das ersetzen, was durch die Verletzung zerstört wurde. Zum anderen gibt es die „normale Wundheilung“, bei der es zu einem wiederhergestellten Gleichgewicht zwischen Narbenbildung und Narbenumbildung kommt. Dies stellt die typische Reaktion auf eine Verletzung dar.

Die pathologischen Reaktionen auf eine Wunde stehen in scharfem Kontrast zu den normalen Reaktionen. Es kann zu einer exzessiven Heilung kommen. Dabei wird zuviel Bindegewebe produziert. Das führt zu einer

deformierten, missgebildeten Struktur, die einen Funktionsverlust zur Folge hat. Beispiele für exzessive Heilung sind Fibrose (Keloide, hypertrophe Narben), Strikturen und Verwachsungen.

Das Gegenteil der Fibrose und eine weitere pathologische Reaktion der Wundheilung ist die unzureichende Heilung. Dabei wird zu wenig neue Bindegewebmatrix produziert und das Gewebe ist so sehr geschwächt, dass es auseinander fällt. Chronische, nicht heilende Ulzera sind die Folge.

Zu den pathologischen Reaktionen kommt es, wenn auch nur ein Teil der physiologischen Heilungskaskade, also der Prozess von Hämostase und Fibrinbildung, welcher zur Entzündungsphase überleitet, die durch neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Leukozyten charakterisiert ist, gestört ist (Diegelmann und Evans, 2004).

2.1. Fibrose

Fibrose kann als das Ersetzen der normalen Strukturelemente des Gewebes durch exzessives, deformiertes und funktionsloses Narbengewebe definiert werden.

Keloide sind überschießende Narbenbildungen auch außerhalb der ursprünglichen Wunde. Fibroblasten aus Keloiden verhalten sich anders als Fibroblasten aus hypertrophen Narben. Sie produzieren z. B. nach Stimulation mit TGF- β bis zu zwölfmal mehr Kollagen als normale Fibroblasten und bis zu dreimal mehr als Fibroblasten aus hypertrophen Narben (Younai et al., 1994). Die hypertrophe Narbe ist eine auf das Gebiet der ursprünglichen Wunde beschränkt bleibende, über das Hautniveau ragende, oft wulstige, erythematöse Verdickung der Haut mit spontaner, oft aber nicht kompletter Rückbildung. Ein typisches Kriterium der hypertrophen Narbe ist die Narbenkontraktur mit teilweise massiven funktionellen Einschränkungen. Sie entsteht durch die Ausbildung von Myofibroblasten in hypertrophen Narben.

Fibroblasten, die von Keloiden isoliert wurden, produzieren zwei- bis dreimal so viel Kollagen wie solche aus normaler Haut (Diegelmann et al.,

1979). Bei Keloiden wird zusätzlich mehr TGF- β freigesetzt und die Rezeptordichte wird erhöht (Babu et al., 1992).

TGF- β spielt vor allem bei der Entstehung von Keloiden eine wichtige Rolle. Die drei Isoformen von TGF- β haben unterschiedliche Funktionen. TGF- β 1 und TGF- β 2 vermitteln dabei die Fibrose und Narbenbildung, wohingegen TGF- β 3 die Narbenbildung eher hemmt. Keloidfibroblasten liefern im Vergleich zu Fibroblasten normaler Haut hohe Konzentrationen von TGF- β 1 und -2-mRNA. Dadurch ist mehr TGF- β 1 und -2-Protein vorhanden. Das führt zu gesteigerter Kollagensynthese und einer gesteigerten Matrixvermehrung. Die TGF- β 3 Konzentration von Keloid- und normalen Hautfibroblasten ist gleich. Gleichzeitig werden der „epidermal growth factor“ (EGF), PDGF und der „fibroblast growth factor“ (FGF) freigesetzt, die die Proliferation der Fibroblasten und der Matrix anregen. Dadurch könnte die überschießende Bindegewebssynthese bei Keloiden zusätzlich angeregt werden (Baisch und Riedel, 2006).

2.2. Chronische Ulzera

Chronische, dermale und nicht heilende Ulzera wie die Druckgeschwüre treten häufig bei immobilen und gelähmten Personen auf. Auch hier gibt es mehrere Einflussfaktoren.

Die Ulzera sind massiv von neutrophilen Granulozyten infiltriert. Diese Tatsache ist für die Charakteristik der chronischen Ulzera – zu denen das Druckgeschwür, venöse Ulzera und diabetische Ulzera zählen – verantwortlich, nämlich für die chronische Entzündung. Die Neutrophilen sezernieren in signifikantem Maße Enzyme wie z. B. Matrix-Metalloproteinase 8 – eine Kollagenase, die für den Abbau der Kollagenmatrix verantwortlich zeichnet. Des Weiteren sezernieren die Granulozyten Elastase, ein Enzym, das wichtige Heilungsfaktoren wie PDGF und TGF- β zerstört. Zusätzlich findet sich in der Umgebung des Ulcus reaktiver Sauerstoff, der Zellen und Gewebe angreift (Diegelmann und Evans, 2004).

Weitere Faktoren für die Entstehung der Druckulzera, die dadurch charakterisiert sind, dass eine tiefe Gewebszerstörung mit einem Verlust an Gewebevolumen, der größer ist als der Hautdefekt, vorliegt, sind schlichtweg Druck und die damit verbundene Ischämie. Dabei wird davon ausgegangen, dass der generelle Gewebedruck gleich null ist. Das ergibt sich aus dem negativen interstitiellen Druck und dem positiven Druck des festen Gewebes. Dadurch, dass ein externer Druck auf das Gewebe ausgeübt wird – z. B. kann durch langes Liegen das Gewebe über vorstehenden Knochenstrukturen komprimiert werden – steigt der interstitielle Druck an und übersteigt den Druck von 12 mmHG im venösen kapillären System. Das Resultat ist ein generell höherer Druck im Gewebe, erhöhte kapilläre Filtration, Ödeme und Zellaulyse. Zur gleichen Zeit werden die Lymphgefäße aufgrund des höheren Gewebedrucks komprimiert. Das führt wiederum zu Ödemen und Autolyse der Zellen. Eine anhaltende, durch Druck bedingte Verstopfung der Gefäße ist ebenfalls ein wichtiger Aspekt bei der Pathogenese des Dekubitus¹ (Moshell, 1993).

Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass bei einem über knöchernen Vorsprüngen aufgebrachten Druck von 100 mmHG es in allen Fällen zu einer Hautulceration kommt. Alle Anteile, auf die Druck ausgeübt wurde, zeigen histologisch interstitielle Infiltrate, Gefäßthrombosen und Nekrosezeichen. Die menschliche Haut ähnelt der des Schweins. Experimente mit paraplegischen Schweinen haben gezeigt, dass weniger als 500 mmHG Druck benötigt werden, um Hautschäden zu verursachen. Im Verbund mit Scherkräften treten bereits ab 45 mmHG Hautschäden auf (Meiners, 2003).

Man findet bei Dekubitus immer auch eine Flora von aeroben und anaeroben Bakterien. Es wird kontrovers diskutiert, inwiefern diese den Heilungsprozess beeinflussen. So wird von Bendy et al. (1964) in einer Studie für die Behandlung mit Gentamycin geschlossen, dass die

¹ Pluralform laut lateinischer u-Deklination Nominativ Plural ebenfalls *Dekubitus* (gesprochen mit langem -u-: *Dekubituus*).

Wachstumssuppression der Bakterien der entscheidende Faktor für die Heilung des Dekubitus sei. Morgan (1975) führt an, dass das Nichtvorhandensein externen Drucks, das Ausschaben der Wunde und die Entfernung toten Gewebes das Mittel der Wahl zur Behandlung sei. Im British Medical Journal heißt eine Schlagzeile: „Bakterien besiedeln den Ulkus lediglich – sie verursachen ihn nicht“ (Daltrey et al., 1981). Da also der Dekubitus von vielen Faktoren beeinflusst wird, ist keine Aussage darüber möglich, welchen Effekt – wenn überhaupt – Bakterien auf ihn haben. Die Mikroorganismen, die am häufigsten gefunden werden, sind *P. Mirabilis*, *Ps. Aeruginosa* und *Bacteroides* spp. Da die Dekubitus auch aus einer Ischämie heraus entstehen können, wird die lokale Immunabwehr immer mehr abnehmen, je weiter der Dekubitus voranschreitet. Dieser Mangel an lokalen Abwehrmöglichkeiten und die Anwesenheit von nekrotischem Gewebe geben den Bakterien einen Lebensraum (Daltrey et al., 1981).

3. TGF- β und Wundheilung

TGF- β wird als der Wachstumsfaktor mit dem breitesten Spektrum an Aktivität während der Wundheilung betrachtet. Der Wachstumsfaktor wird mit der Reepithelisation, der inflammatorischen Infiltration, der Wundkontraktion, der Deposition der extrazellulären Matrix und der Remodellation des Gewebes in Verbindung gebracht (Martinez-Ferrer et al., 2010).

Das basiert sowohl auf der Vielfalt an Zelltypen (z. B. Thrombozyten, Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen), welche TGF- β produzieren bzw. auf TGF- β reagieren, als auch auf dem breiten Spektrum an verschiedenen zellulären Reaktionen. Das Hauptmerkmal dieses Moleküls besteht in einer autoinduzierten, lang anhaltenden Expression in der Wundregion. Es erweitert die Effektivität der anfänglichen verletzungsinduzierten endogenen TGF- β -Ausschüttung als auch diejenige einer eventuell zum Einsatz kommenden exogenen TGF- β Zufuhr (Clark, 1996).

3.1. TGF- β Isoformen

Der Terminus „TGF- β “ bezieht sich auf alle TGF- β -Isoformen, die homolog und in Bioassays nicht unterscheidbar sind. Jede Isoform wird jedoch von ganz bestimmten Genen kodiert und hat einen spezifischen Promotor (Roberts und Sporn, 1990).

Säugetiere exprimieren drei Isoformen: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3. TGF- β 1 ist dabei die in allen Geweben am häufigsten zu findende Form. In menschlichen Thrombozyten ist es die einzig vorkommende. Bestimmte Zellen, wie z. B. die retinalen Pigmentzellen, sezernieren überwiegend TGF- β 2. Manche Körperflüssigkeiten, wie das Fruchtwasser oder das Kammerwasser des Glaskörpers des Auges, der Speichel oder die Muttermilch, enthalten hauptsächlich TGF- β 2. TGF- β 3 wurde in menschlicher Nabelschnur und z. B. in Muskelzelllinien gefunden.

Alle drei Isoformen finden sich auch in der Haut. TGF- β 1 und TGF- β 2 sind in der Dermis stark vertreten, in der Epidermis hingegen weniger stark. TGF- β 3 wird nur in der Dermis exprimiert und ist dort in niedrigerer Konzentration vorhanden als TGF- β 1 und TGF- β 2 (Frank et al., 1996).

Beachtenswert ist, dass in menschlicher Wundflüssigkeit 85 % des TGF- β als Isoform 1 vorliegt, wohingegen in der Wundflüssigkeit von Feten im zweiten Trimenon, wo es nicht zur Narbenbildung kommt, Isoform 2 vorherrscht (Clark, 1996).

3.2. Biologische Effekte von TGF- β

TGF- β ist in fast jeden Aspekt der Wundheilung involviert. Er wird in einer frühen Phase der Wundheilung in Form eines „large latent complex“ von den α -Granula der Thrombozyten freigesetzt, wenn diese durch die Einwirkung von Thrombin degranulieren. Das aktivierte TGF- β lockt Zellen durch Chemotaxis zum Wundgebiet und stimuliert dann die Bildung von Granulationsgewebe in einer späteren Phase (Clark, 1996).

Nachfolgend werden einzelne Einflüsse von TGF- β beschrieben.

3.2.1. Chemotaxis und Migration

TGF- β ist der potenteste bekannte Stimulator der Chemotaxis. Es wird die Migration von Monozyten, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Fibroblasten angeregt (Wahl et al., 1987). Bei allen untersuchten Zelltypen ist die dosisabhängige Wirkung von TGF- β eine glockenförmige Kurve mit TGF- β -Konzentrationen kleiner oder größer als der aktive Bereich. Weil die Chemotaxisstimulation nur bei geringen, aber nicht bei hohen Konzentrationen, wie sie für die Gentranskription nötig sind, möglich ist, muss die TGF- β -induzierte Migration von Zellen in das Wundgebiet entweder vor der Aktivierung signifikanter Mengen latenten TGF- β erfolgen oder aber in Gebieten, welche weiter von der Hauptkonzentration von TGF- β entfernt liegen und in denen dann die Konzentration entsprechend geringer ist (Clark, 1996). Somit erfolgt eine zeitliche und räumliche Regulierung der TGF- β -Dosis.

Außerdem stimuliert TGF- β die Zellmigration, wobei die Ausrichtung der Effekte sowohl zellspezifisch als auch kontextabhängig ist: es wird die Migration von intestinalen Zelllinien stimuliert, aber die Migration von glatten Muskelzellen nach einer Verletzung *in vitro* inhibiert; die Migration von Kerationozyten wird *in vitro* und in Organkulturen erhöht (Clark, 1996). Dies ist ein wichtiger Aspekt.

3.2.2. Angiogenese

Die spezifische Art und Weise, wie TGF- β *in vivo* die Angiogenese stimuliert, ist noch nicht abschließend geklärt. Einen ersten Anhaltspunkt geben jedoch einige Tierversuche. So wurde z. B. TGF- β in einer Hunt-Schilling Kammer Ratten subkutan eingepflanzt (Sporn et al., 1983) oder auch Mäusen subkutan in unverletzte Areale injiziert (Roberts et al., 1986). In all diesen Fällen hat der Wachstumsfaktor die Bildung von hochvaskularisiertem Granulationsgewebe an den Stellen der Injektion induziert.

Im Gegensatz dazu zeigt sich TGF- β als ein potenter Inhibitor des Endothelzellwachstums. In Ko-Kultur von vaskulären endothelialen Zellen

oder Perizyten und glatten Muskelzellen wird TGF- β als latente Vorstufe sezerniert und aktiviert. Das Zellwachstum wird daraufhin inhibiert (Flaumenhaft und Rifkin, 1992). Hieraus folgte die Vermutung, dass die lokale Aktivierung von TGF- β an den Rändern der perizytären Abdeckung bei wachsenden Kapillaren dazu beiträgt, das Wachstum der Endothelzellen zu stoppen.

3.2.3. Extrazelluläre Matrix

In einem Hautgebiet ist der Fibroblast, der zuerst von niedriger Konzentration TGF- β am Wundrand chemotaktisch angezogen und dann von höherer Konzentration im zentralen Wundgebiet zur Transkription stimuliert wird, eine der Zielzellen von TGF- β .

Es liegt im Wundgebiet zunächst eine fibrinbasierte provisorische Matrix vor, die erst später durch Fibroblasten und TGF- β zu einer echten Kollagen-I basierten Matrix umgebaut wird.

TGF- β reguliert die Transkription von vielen Matrixproteinen wie z. B. Kollagen, Fibronectin oder Glykosaminoglykanen, von matrixabbauenden Proteasen und deren Inhibitoren und von Integrin-Rezeptoren. Dabei wird durch TGF- β in der Regel die Produktion von Matrixproteinen erhöht, während deren Proteolyse runterreguliert wird.

4. TGF- β -Latenz

Der Begriff „latenter TGF- β “ bedeutet, dass der Wachstumsfaktor zunächst als inaktive Vorstufe produziert und sezerniert wird und dann in mehreren Schritten extrazellulär umgebaut und aktiviert werden muss. Die notwendige extrazelluläre Aktivierung ist ausschlaggebend für die Regulation der TGF- β -Aktivität.

TGF- β besteht aus zwei identischen Aminosäureketten, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Jede Kette wird als eine aus 390 Aminosäuren bestehende Vorstufe synthetisiert, die ein sekretorisches Polypeptid und eine hydrophobe Signalsequenz haben (Derynck et al., 1985).

Latenter TGF- β kommt in zwei Proteinkomplexen vor (s. Abb. 2): zum einen in dem „Small Latent Complex (SLC)“ und zum anderen in dem „Large Latent Complex (LLC)“.

Der SLC besteht aus einem TGF- β -Dimer, das nicht kovalent mit einem „Latency Associated Peptide (LAP)“-Dimer verbunden ist. Dieser Verbund hält die Latenz des Wachstumsfaktors aufrecht und inhibiert die TGF- β -Aktivität.

Im LLC ist der LAP zusätzlich über eine Disulfidbrücke mit einem fibrillin-ähnlichen „Latent TGF- β Binding Protein (LTBP)“ verbunden. Diese Verbindungsproteine führen das latente TGF- β zu spezifischen Arealen der extrazellulären Matrix, die je nach Isoform des LTBP unterschiedlich sind. So entstehen Reservoirs, aus denen über proteolytische Prozesse latenter TGF- β freigesetzt werden kann.

Das dimere LAP ist das Ziel verschiedener TGF- β -Aktivatoren, wie z. B. Proteasen, Integrinen oder Thrombospondin-1. Der latente TGF- β dient als Transmitter für eine Vielzahl an extrazellulären Signalen von Zellen. Auf diese Weise ist die TGF- β -Aktivität einerseits abhängig von der Bioverfügbarkeit, also von der Freisetzung von latentem TGF- β aus den extrazellulären Reservoirs, und andererseits von der TGF- β -Latenz, also der Freisetzung von aktivem TGF- β aus dem latenten TGF- β -Komplex (Brunner und Blakytny, 2004).

Unabhängig produziert, kann das LAP aktiven TGF- β wieder latent machen, indem es wieder an TGF- β bindet und so den SLC wieder herstellt (Gentry und Nash, 1990). Das LAP-Molekül ist ein Homodimer, das heißt, es besteht aus zwei identischen Monomeren. Es enthält drei über Stickstoff verbundene Kohlenhydrate, von denen zwei einen Mannose-6-Phosphatrest (M6P) haben (Purchio et al., 1988). Dies ermöglicht die Bindung an den M6P-Insulin-like Growth Factor-II-Rezeptor (M6P-IGF-II-R). Darüber erfolgt die Bindung an Zelloberflächen (Kovacina et al., 1989). Zusätzlich dazu, dass das LAP-Molekül TGF- β latent macht und die Aktivität auf Gebiete begrenzt, in denen eine Aktivierung stattfinden kann, sorgt es

dafür, dass das TGF- β -Molekül richtig gefaltet und sezerniert wird (Gray und Mason, 1990). Nachdem das LAP abgespalten ist, um TGF- β zu aktivieren, wird es proteolytisch abgebaut (Purchio et al., 1988).

4.1. Aktivierung von latentem TGF- β

Wie bereits dargestellt, wird der latente TGF- β in ruhender Form sezerniert. In dieser Form ist der Wachstumsfaktor nicht in der Lage, an Rezeptoren zu binden. Dadurch ist es möglich, TGF- β extrazellulär zu speichern.

Bei dem Prozess der Aktivierung wird das TGF- β Molekül proteolytisch vom LAP getrennt. Die Aktivierung ist ein multifaktorieller Prozess, der auf dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, auf Plasmin und auf Transglutaminase basiert (Harpel et al., 1992). Das hat zu einem Modell von zelloberflächenvermittelter Aktivierung des latenten Komplexes geführt, bei dem der latente TGF- β und Plasmin oberflächengebunden sein müssen. Die Verankerung des latenten TGF- β Moleküls an der Zelloberfläche oder der extrazellulären Matrix erfolgt mittels LTBP (Taipale et al., 1994) und / oder über die Bindung von Mannose-6-Phosphatresten an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Harpel et al., 1992). Die Transglutaminase vermittelt die Vernetzung von Plasminogen mit der Zelloberfläche bzw. der extrazellulären Matrix.

Nachfolgend werden ausgewählte Aktivierungsmechanismen dargestellt.

4.1.1. Physiochemische Aktivierung

Das ausgereifte TGF- β -Dimer ist unter verschiedenen denaturierenden Einflüssen stabiler als LAP (Brown et al., 1990). Das ermöglicht die Aktivierung des latenten TGF- β durch Hitze, Detergentien oder extreme pH-Werte. Die Aktivierung im Sauren oder Alkalischen erfolgt durch die Zerstörung von Ionenbindungen zwischen LAP und dem TGF- β -Dimer. Die pH-Werte, bei denen die Trennung erfolgt, liegen zwischen 3,1 – 4,1 bzw. 11 – 11,9.

Die Aktivierung durch Hitze erfolgt bei Temperaturen zwischen 70 und 100°C. Eine vollständige Aktivierung ist bei einer Temperatur von 80°C über 5 Minuten möglich, bei Temperaturen ab 90°C kommt es zur Denaturierung des TGF- β -Dimers selbst (Martin, 2002).

4.1.2. Strahlung und Sauerstoffradikale

Durch radioaktive Strahlung können Hydroxyl- und andere Sauerstoffradikale entstehen (Riley, 1994). Diese können TGF- β aktivieren. Dies impliziert die Möglichkeit einer Redox-Reaktion innerhalb des LAP. Unterstützt wird diese Annahme durch die schnelle Aktivierung von TGF- β in der Brustdrüse der Maus bei Ganzkörperbestrahlung mit ^{60}Co -Gamma Strahlen (Barcellos-Hoff et al., 1994). Es sind aber weitere Untersuchungen erforderlich, um herauszufinden, ob dieser Aktivierungsmechanismus auch auf einer Redox-Reaktion basiert oder tatsächlich auf den extremen Bedingungen ionisierender Strahlung.

4.1.3. Ko-Kulturen

Die Aktivierung von latentem TGF- β kann auch über die Ko-Kultur von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und / oder Perizyten erfolgen. Diese Zelltypen produzieren grundlegend LLC. Jedoch wird im Medium bei der Zellkultur kein aktiver TGF- β gefunden (Antonelli-Orlidge et al., 1989). Kultiviert man die Zellen zusammen, wird aktiver TGF- β produziert. Wichtig dafür sind ein Zell-Zell-Kontakt und weitere enzymatische Mechanismen wie folgend dargestellt.

4.2. Enzymatische Mechanismen der latenten TGF- β -Aktivierung

4.2.1. Aktivierung durch Plasmin

Die Konvertierung von Plasminogen zu Plasmin erfolgt durch den Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) auf der Zelloberfläche. Dieser Mechanismus erfordert die Bindung von uPA an den uPA-Rezeptor. Gibt man bei einer Kokultivierung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen und / oder Perizyten uPA-neutralisierende Antikörper hinzu, kommt es nicht zur Bildung von aktivem TGF- β . Ebenso verhindern Plasmininhibitoren und Antikörper gegen Plasminaktivatoren die Aktivierung von latentem TGF- β (Flaumenhaft und Rifkin, 1992; Kojima und Rifkin, 1993).

Durch die Kokultivierung können essentielle Komponenten des Aktivierungsweges dargestellt werden. Darunter ist LTBP, welches die Bioverfügbarkeit von latentem TGF- β reguliert. Werden Antikörper gegen LTBP hinzugefügt, ist eine Abnahme von löslichem latentem TGF- β und somit auch der aktiven Form ersichtlich (Flaumenhaft und Rifkin, 1992).

Eine weitere Komponente stellt die Transglutaminase dar, welche LTBP kovalent an die extrazelluläre Matrix bindet. Transglutaminaseantikörper verhindern die Bildung aktiven TGF- β s (Kojima und Rifkin, 1993).

4.2.2. Aktivierung durch Kathepsin

Die Behandlung von Osteoblasten mit Glukokortikoiden führt zu einer dosisabhängigen Erhöhung des aktiven TGF- β und erhöht den mRNA-Spiegel für die lysosomalen Proteasen Kathepsin B und D (Oursler et al., 1993). Das lässt vermuten, dass es durch die von den Osteoblasten sezernierten Proteasen zu einer Aktivierung von latentem TGF- β kommt. Ebenso zeigt sich, dass Kathepsin D in vitro den LLC aktivieren kann (Lyons et al., 1988).

4.2.3. Aktivierung durch Kalpain

Kalpain ist eine Cysteinprotease, die in verschiedene Prozesse regulierend eingreift. Inkubiert man latenten TGF- β mit Kalpain, kommt es zur Abspaltung des LAP-Moleküls und somit zur Freisetzung des TGF- β -Homodimers (Abe et al., 1998).

4.2.4. Aktivierung durch Matrix-Metallo-Proteinnasen (MMP)

TGF- β kann auch über verschiedene MMPs aktiviert werden. So ist z. B. MMP-13 mit der Zelloberfläche von Matrixvesikeln (MV) assoziiert, die eine Rolle bei der Mineralisation von Chondrozyten spielen. MVs enthalten latenten TGF- β als SLC und MMP-13 ist in der Lage, diesen SLC zu aktivieren (D'Angelo et al., 2001).

Auch die an Zelloberflächen vorkommende MMP-9 kann proteolytisch TGF- β aktivieren. Dabei zeigt sich eine funktionelle Beziehung zwischen MMP-9, dem Hyaluronrezeptor CD44 und TGF- β . Um eine Aktivierung zu erreichen, muss MMP-9 an CD44 andocken. Durch diese Verbindung wird eher TGF- β 2 aktiviert, wohingegen der gleiche Mechanismus jedoch mit MMP-2 anstelle von MMP-9 eher TGF- β 1 und TGF- β 3 aktiviert (Yu und Stamenkovic, 2000). Vergleicht man die Wundflüssigkeit normal heilender und chronischer Wunden, so stellt man fest, dass bei chronischen Wunden zehnfach höhere Werte an Matrix-Metallo-Proteinasen vorkommen, auch ist deren Aktivität deutlich erhöht (Meiners, 2003).

4.2.5. Aktivierung durch Deglykolysierung

Kohlenhydrate scheinen für die Stabilität zwischen LAP und dem TGF- β -Dimer wichtig zu sein. Das Entfernen des Kohlenhydratanteils des LAP vom LLC durch hohe Konzentrationen von Glykosidasen kann den LLC aktivieren (Brown et al., 1990).

4.2.6. Aktivierung durch Blutplättchen

Blakytny et al. (2004) wiesen nach, dass Blutplättchen TGF- β unabhängig vom Zeitpunkt der Freisetzung aktivieren können. Im Gegenteil zu den parakrinen Mechanismen der TGF- β -Aktivierung, die durch Interaktionen

mit der extrazellulären Matrix, proteolytischen Prozessen und Rezeptoren zustande kommt, konnte belegt werden, dass die Plättchen autokrin aktives TGF- β freisetzen. Der zeitliche Abstand zwischen der Degranulation der α -Granula und dem Vorhandensein von signifikanten Mengen an aktivem TGF- β lässt vermuten, dass es sich um unabhängige Ereignisse handelt.

Diese Aktivierung kommt über eine „furin-like proprotein convertase“ (hier ist PACE4 gemeint) zustande und läuft extrazellulär ab. Dies wurde daran gezeigt, dass aktivierte Plättchen mit einem membranpermeablen Protease Inhibitor (dec-RVKR-cmk) inkubiert wurden und die Bildung von aktivem TGF- β reduziert war.

4.3. TGF- β -Aktivierung durch nicht-enzymatische Wechselwirkungen

4.3.1. Thrombospondin-1

Thrombospondin-1 (TSP-1) ist ein multifunktionelles Glykoprotein. Von den fünf Isoformen ist TSP-1 das am Besten beschriebene und ist ein wichtiger Bestandteil der α -Granula der Blutplättchen. TSP-1 wird schnell freigesetzt, wenn es mit Serum oder Wachstumsfaktoren wie TGF- β oder PDGF in Berührung kommt (Reed et al., 1995). Latenter TGF- β , wie von vielen Zellen produziert, kann durch TSP-1 ohne Zellen oder Zellprodukte aktiviert werden. Dies ist zeit- und konzentrationsabhängig (Schultz-Cherry und Murphy-Ullrich, 1993). Dieser Effekt wird auch durch Inhibition mit verschiedenen Proteasen oder LTBP-Antikörpern nicht beeinflusst.

4.3.2. Integrine

Integrine spielen bei der Zelladhäsion und Zellmigration und weiteren zellulären Abläufen eine wichtige Rolle. TGF- β ist einer der Hauptregulatoren der Zellhaftung und betrifft sowohl die Expression der Integrine als auch die Synthese der extrazellulären Matrix. Weiterhin ist TGF- β in der latenten und aktiven Form selbst ein Matrixmolekül (Taipale und Keski-Oja, 1997). Einige Integrine können an TGF- β über die Integrin-Bindungssequenz RGD des LAP binden und so TGF- β aktivieren.

Die Aktivierung von latentem TGF- β beinhaltet diverse Stationen einschließlich der Regulierung der Produktion latenten TGF- β s, die Hinführung des latenten TGF- β -Komplexes zur extrazellulären Matrix, die Freisetzung von der Matrix durch Plasmin oder andere Proteasen und dann die Freisetzung der aktiven Form durch Plasmin oder Integrine. Die Mechanismen sind organspezifisch und auch isoformspezifisch.

5. GDF-5 und Wundheilung

„Growth differentiation factor-5“ (GDF-5) als Wachstums- und Differenzierungsfaktor gehört zur TGF- β -Superfamilie. Er besteht aus zwei, über eine Cystein-Brücke kovalent verbundenen und 120 Aminosäuren langen Ketten. Seine Wirkung entfaltet GDF-5 über die Bindung an einen spezifischen, aus Typ I und Typ II Serin-Threonin-Rezeptorkinasen geformten Rezeptorkomplex. Diese Rezeptoren aktivieren SMAD-Proteine und vermitteln die Zielgenexpression im Zellkern. Die unterschiedlichen Rezeptoren und Signalwege erklären die Wirkung in verschiedenen Geweben. GDF-5 wirkt bei der Regeneration von Defekten in komplexen Gewebestrukturen, bei der Bildung von Blutgefäßen und der Regeneration von Nerven im peripheren und zentralen Nervensystem. Weiterhin moduliert das Protein das Knochen-, Knorpel- und Bindegewebswachstum (Biopharm, 2009).

6. Aktivin

Die TGF- β -Superfamilie besteht aus einer Gruppe strukturell ähnlicher Proteine, darunter verschiedene TGF- β -Isoformen, „bone morphogenetic proteins“ (BMPs), Inhibinen und auch Aktivinen. Wie auch andere Familienmitglieder besteht Aktivin aus dimeren Proteinen, die aus disulfidgebundenen β_A und / oder β_B Untereinheiten zusammengesetzt sind. Bisher sind drei verschiedene Isoformen bekannt: das homodimere Aktivin-A ($\beta_A\beta_A$), Aktivin-B ($\beta_B\beta_B$) und das heterodimere Aktivin-AB ($\beta_A\beta_B$). Es konnte gezeigt werden, dass Aktivin das Wachstum und die Differenzierung vieler verschiedener Zielzellen beeinflusst, z. B. moduliert Aktivin-A die

Differenzierung neuronaler Zellen, beschleunigt die Differenzierung von Megakaryozyten und Erythrozyten (Hübner et al., 1996).

Studien haben belegt, dass Aktivin eine wichtige Rolle auch bei der Wundheilung spielt. So konnte gezeigt werden, dass bei unverletzter Haut relativ geringe Konzentrationen in der Dermis vorliegen. 15 Stunden nach einer Verletzung stiegen die Konzentrationen deutlich an und erreichten ihr Maximum nach 24 Stunden. Innerhalb von 5 bis 7 Tagen reduzierten sich die Konzentrationen, um nach 13 Tagen das ursprüngliche Niveau wieder zu erreichen. Das Aktivin lag bei verwundeter Haut hauptsächlich in den Zellen des Bindegewebes und dem angrenzenden, proliferierenden Epithel unterhalb des Wundschorfes vor. Das lässt auf eine Rolle des Aktivins bei der Formierung des Bindegewebes und der Keratinozytendifferenzierung schließen (Hübner et al., 1996).

7. Zielstellung

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, ob bestimmte Moleküle, insbesondere der Wachstumsfaktor TGF- β , in die Entstehung von Dekubitalulcera bei querschnittsgelähmten Patienten involviert sein könnten.

Die Hypothese ist, dass es durch die fehlende bzw. fehlgesteuerte Nervenaktivität der gelähmten Haut zur Ausbildung von Ödemen kommt. Diese wiederum sind eine Voraussetzung dafür, dass feste Blutbestandteile in das umliegende Gewebe vordringen können. Unter anderem sind dabei die Thrombozyten wichtig, welche eine der Hauptquellen für TGF- β darstellen und den Wachstumsfaktor aktivieren können.

Im Folgenden wird untersucht, ob überhaupt TGF- β bzw. TGF- β -Aktivität festzustellen ist, ob weitere mögliche TGF- β -Aktivatoren vorhanden sind und wie TGF- β auf die Entstehung von Druckgeschwüren oder auch die gestörte Wundheilung Einfluss nehmen könnte.

Material und Methoden

1. Liste der Materialien und Geräte

Material oder Reagenz	Anbieter
Anti-Human TGF- β ₁ -LAP	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Anti-Human VEGF-R3 Flt-4	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
DAKO® Biotin Blocking System	DAKO, Hamburg, Deutschland
DAKO® Cytomation Fluorecent Mounting Gel	DAKO, Hamburg, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratorien, Cölbe, Deutschland
Dynex MLX Microtiter Plate Luminometer	Dynex, Berlin, Deutschland
Dynex Platte	Dynex, Berlin, Deutschland
G418 (Geneticin)	PAA Laboratorien, Cölbe, Deutschland
Luciferase 3x cell Lysis Buffer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Luciferin	Biosynth AG, Staad, Schweiz
Maus IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland
Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Methylcellulose	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA Laboratorien, Cölbe, Deutschland
Monoclonal Mouse Anti-Human Lymphendothel (D2-40)	DAKO, Hamburg, Deutschland
Monoclonal-anti-Aktivin-A (Clone 69403)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Monoclonal-anti-TGF- β ^{1,2,3} (Clone 1D11)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR Green II	Fluka, Seelze, Deutschland
Trypsin (0,25 %) / EDTA (0,05%)	Gibco BRL, Paisley, UK
Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey-anti-goat IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey-anti-mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Buffer RLT	Qiagen, Hilden, Deutschland
DEPC-H ₂ O	Qiagen, Hilden, Deutschland
Proteinase-K-Lösung	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ethanol	Serva, Heidelberg, Deutschland
DNase-I-Stammlösung	Qiagen, Hilden, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Buffer RDD	Qiagen, Hilden, Deutschland
Buffer RPE	Qiagen, Hilden, Deutschland
Buffer RW1	Qiagen, Hilden, Deutschland
TaqMan Probe	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
PCR Puffer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
dNTPs	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Random Hexamer Primer	Promega, Mannheim, Deutschland

Die Gewebeproben stammten von PD Dr. T. Meiners, Zentrum für Rückenmarkverletzte, Werner-Wicker-Klinik, Bad Wildungen.

Die Patienten waren im Durchschnitt 48,7 Jahre alt, motorisch und sensibel komplett, länger als 1 Jahr und durch einen Unfall querschnittgelähmt. Es wurden jedem Patienten zwei Hautproben der Größe 1x1 cm² entnommen. Eine Probe stammte wundnah vom Rand des Decubitus, die weitere stammte aus einem mindestens 10 cm entfernten Hautareal.

Die Kontrollproben stammten von nichtgelähmten Patienten, hatten dieselbe Größe und entstammten derselben Region.

2. Zellkultur

Für den PAI/L Bioassay wurden Nerz-Lungenepithelzellen (MLEC – clone 32) kultiviert. Diese wurden von Dr. Daniel B. Rifkin (New York University Medical Center, NY) bereitgestellt. Sie waren stabil mit einem 800 bp-DNA Fragment des 5'-Endes des menschlichen Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 Gens (PAI-1) (Loskutoff et al., 1998) transfiziert (Abb.3), wobei das Gen mit dem Glühwürmchen-Luziferase-Reportergen in einem p19LUC-Vektorderivat fusioniert war, das wiederum das Neomycin-Resistenzgen des pMAMneo enthielt (Abe et al., 1994). Die transfizierten MLECs wurden in high glucose Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert. Dem Medium wurde 10 % fötales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES und 250 µg / ml G418 (Geneticin) und 1 mM Natrium-Pyruvat zugegeben (dann „complete DMEM“). Die Zellen wurden in 100 mm durchmessenden Petrischalen in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Waren die Zellen konfluent, wurden sie in Passagen zwischen 1:3 und 1:30, je nach Dichte und Tag der späteren Verwendung, gesplittet. Dazu wurden die MLECs zunächst mit Normalmedium gewaschen und dann mit 3 ml 0,25 % Trypsin / 0,05 % EDTA (-Ca²⁺ / -Mg²⁺) bei 37°C für 1 – 2 Minuten inkubiert. Hatten sich die Zellen abgerundet bzw. vom Boden der Petrischale gelockert, wurden sie in ein 15 ml Röhrchen pipettiert, welches mit Medium zur Zentrifugation auf 10 ml aufgefüllt wurde, und bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Es bildete sich ein Zellpellet. Das Medium wurde abpipettiert und das Zellpellet mit 7,5 ml complete DMEM Medium resuspendiert, um dann in die gewünschten Zelldichten weiter verdünnt zu werden. Wurden die Zellen mehr als 30 Mal passagiert, sollten sie keine Verwendung in einem Assay finden, da die TGF-β-Sensitivität der Zellen dann sinkt (Abe et al., 1994).

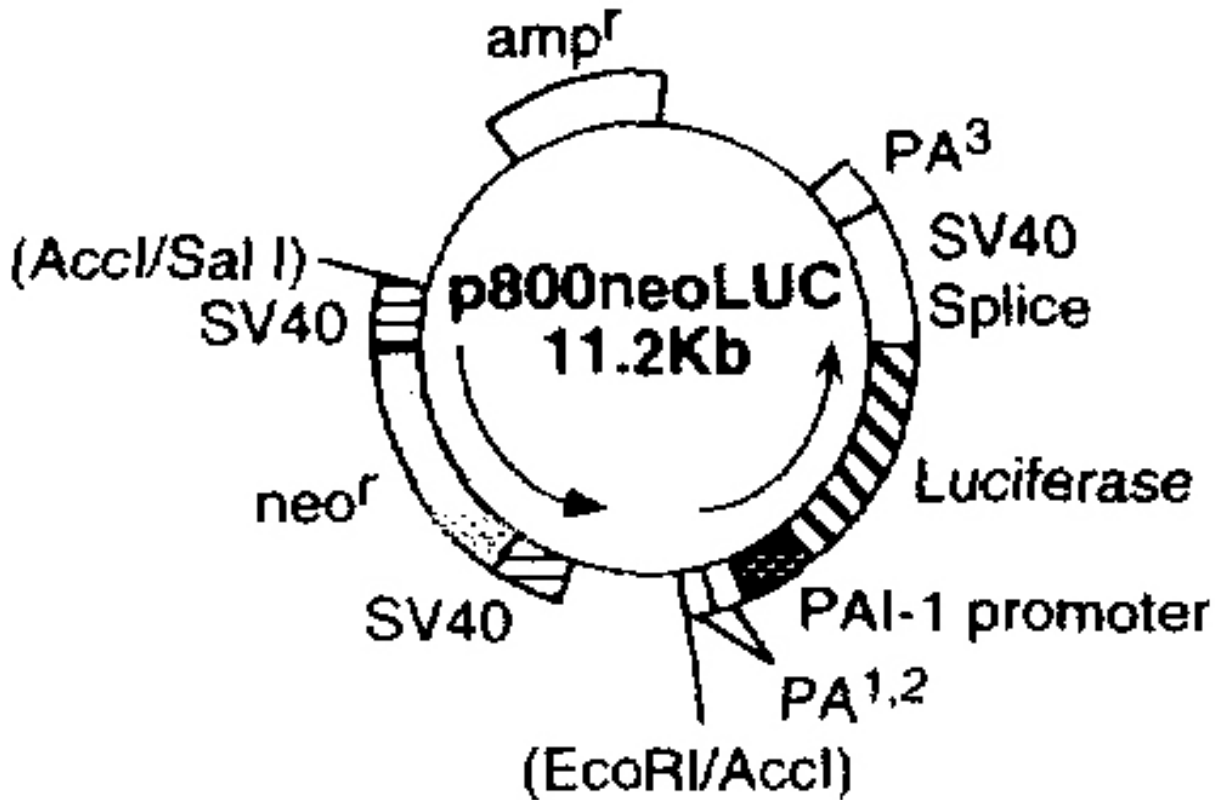


Abb. 3: Struktur des PAI/L Promotorkonstruktes (Abe et al., 1994).

neo^r – neomycin resistance gene

PA^{1,2,3} – polyadenylation regions

amp^r – ampicillin-resistance gene.

3. PAI/L Bioassay

3.1. Allgemeines

Der PAI/L Bioassay ist ein hoch sensitiver, spezifischer, nichtradioaktiver und quantitativer Assay für TGF- β . Er basiert auf der Fähigkeit von TGF- β , die Expression von PAI-1 zu induzieren (vgl. Abe et al., 1994). Es wurden MLECs, die mit einem verkürzten PAI-1 Promoter transfiziert wurden, der mit dem Glühwürmchen Luciferase Reportergen fusioniert war, genutzt. TGF- β induzierte somit über die Expression von PAI-1 die Luciferaseproduktion. Die Spezifität des Assays ist darin begründet, dass der verkürzte PAI-1 Promoter nicht von anderen Wachstumsfaktoren, die oft in biologischen Flüssigkeiten vorhanden sind, wie z. B. PDGF (Platelet Derived Growth Factor), beeinflusst wird (vgl. Abe et al., 1994). Die Sensitivität des Assays liegt bei 5 pg / ml (0,2 pM) und hat einen Sensitivitätsbereich zwischen 5 – 750 pg / ml (0,2 – 30 pM). Somit können auch sehr geringe Konzentrationen von TGF- β gemessen werden (vgl. Abe et al., 1994).

3.2. MLECs vorbereiten

Bei den für den Bioassay benutzten MLECs sollte am Tag vor dem Assay ein Mediumwechsel stattfinden. Zur Verwendung im Assay wurden die Zellen abtrypsinisiert, inkubiert, zentrifugiert und dann in mit einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen / ml in 24-Well Platten (500 μ l / Well) mit complete DMEM Medium resuspendiert und ausplattiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 4 Stunden bei 37°C (vgl. Yang et al., 1999).

3.3. Cryoschnitte

Das zu untersuchende Gewebe war mit Methylcellulose auf Korkplättchen befestigt. Es wurde bei -80°C aufbewahrt. Für die Schnitte mittels SLEE HR Cryostat wurde die Probe mit dem Korkplättchen mittels Methylcellulose auf einer Metallpatrone befestigt. Von jedem zu testenden Gewebe wurden je drei Proben von 20 μ m Dicke geschnitten, die einzeln auf runde Deckgläschen aufgenommen wurden. Die fertig geschnittenen Proben

werden während der Inkubationszeit der MLECs in einer kleinen Petrischale bei -20°C aufbewahrt.

In diesem Experiment wurden im Gegensatz zum Standard PAI/L Assay keine Flüssigproben benutzt. Das TGF- β im Probenschnitt hatte direkten Kontakt oder diffundierte heraus.

3.4. Standardkurve

Um eine Standardkurve für die TGF- β -Aktivität (Abb. 4) zu erstellen, wurde eine Verdünnungsreihe von 0 – 500 pg TGF- β / ml erstellt (vgl. auch Yang et al., 1999). Dazu wurde zunächst eine 1:100 Vorverdünnung von 5 μ l rekombinanten, humanem TGF- β 1 auf 495 μ l 0,1 % BSA/DMEM Medium erstellt. Im Anschluss wurden 5 ml-Röhrchen mit der Konzentration von TGF- β 1 in pg / ml beschriftet (500; 250; 125; 62; 31; 15; 7,5; 0). Das „500er“ Röhrchen wurde mit 2925 μ l 0,1 % BSA/DMEM-Medium befüllt, die restlichen mit 1500 μ l. Um nun die jeweilige Verdünnungsstufe zu erhalten, wurden von der Vorverdünnung 75 μ l in das „500er“ Röhrchen pipettiert. In der Folge wurden dann, nach ausreichendem Vermengen, aus jedem Röhrchen 1500 μ l in das folgende pipettiert. Das mit „0“ beschriftete wurde dabei ausgelassen. Bis zum Ende der Inkubationszeit der MLECs wurde die Verdünnungsreihe auf Eis aufbewahrt.

3.5. Verdünnung der Antikörper

Um den Anteil an aktiven TGF- β -Isoformen zu bestimmen, wurde mit neutralisierenden Antikörpern gearbeitet (vgl. Yang et al., 1999). Es wurden ein monoklonaler anti-TGF- β 1, - β 2, - β 3-Antikörper, ein monoklonaler anti-human/mouse/rat Activin-A-Antikörper und Maus IgG zur Kontrolle benutzt. Die Antikörperkonzentrationen betragen jeweils 5 μ g / ml. Verdünnt wurde mit 0,1 % BSA/DMEM Medium.

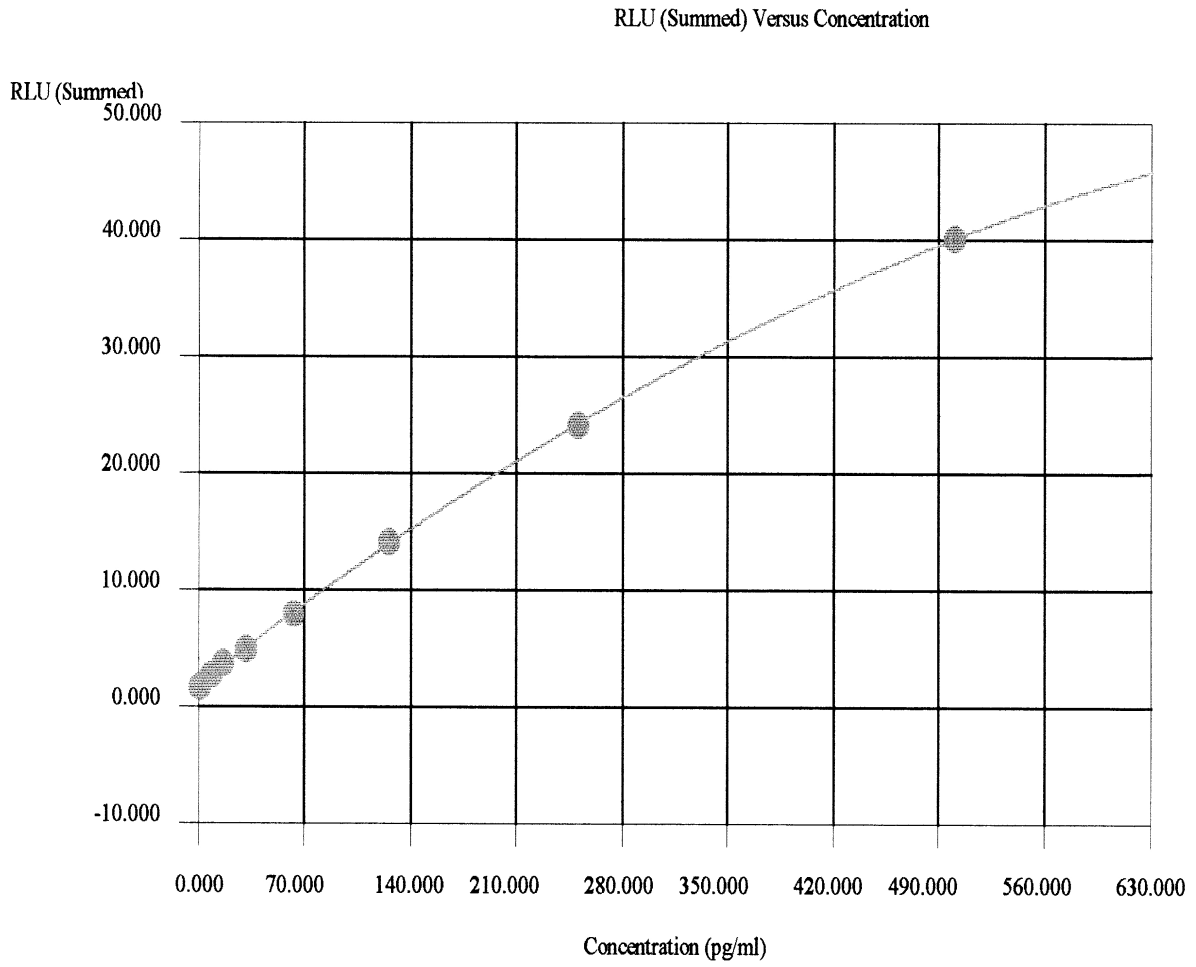


Abb. 4: Im Experiment generierte PAI/L Assay Standardkurve.

RLU = Relative Light Units

3.6. Ausplattierung

Nach Ablauf der vierstündigen Inkubationszeit wurden die MLECs auf Kontamination überprüft. Es wurde zunächst damit begonnen, die Standardkurve auszuplattieren. Dazu wurden das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und jeweils 2 Löcher mit 500 µl einer Konzentration der Standardkurve in absteigender Reihenfolge wieder aufgefüllt. Abschließend wurde ein Deckgläschen eingebracht, um bei Standardkurve und Proben gleiche Bedingungen herzustellen (vgl. Yang et al., 1999 und Abb. 5). Bei den Wells, die mit Gewebeproben bestückt wurden, wurde das Medium ebenfalls abgesaugt. Anschließend wurden jeweils drei Löcher mit 500 µl des jeweiligen Antikörper/BSA/DMEM-Gemisches befüllt und je eine Gewebeprobe hineingegeben. Dieser Schritt erforderte, dass das Deckgläschen mit dem Probenschnitt nach unten in Richtung MLECs eingebracht wurde (Abb. 6). Waren die Proben eingebracht, wurden die 24-Loch Platten über Nacht bei 37°C inkubiert (vgl. auch Yang et al., 1999).

3.7. Lysieren und waschen

Am folgenden Tag wurde zunächst der Lysat-Puffer hergestellt. Man braucht 200 µl einer 1:3-Mischung pro Well des Luciferase 3x Cell Lysis Buffer und H₂O dest. Dann wurden die Wells der Standardkurve und der Proben mit 500 µl PBS pro Well gewaschen (vgl. Yang et al., 1999). Anschließend wurden 200 µl Lysis Puffer pro Well zugegeben und die Zellen 20 Minuten bei Raumtemperatur lysiert.

3.8. Vorbereitung zur Luziferaseaktivitätsmessung

Um die Luziferaseaktivität messen zu können, wurden die lysierten Proben als Triplikate zu je 45 µl in eine Microlite 96-Well Platte pipettiert (vgl. Yang et al., 1999). Zum Auslesen der Platte im Luminometer muss Luziferasesubstrat hergestellt werden. Es wurden 110 µl des Substrates pro Well benötigt, so dass pro Platte ca. 10 ml Substrat hergestellt wurden.

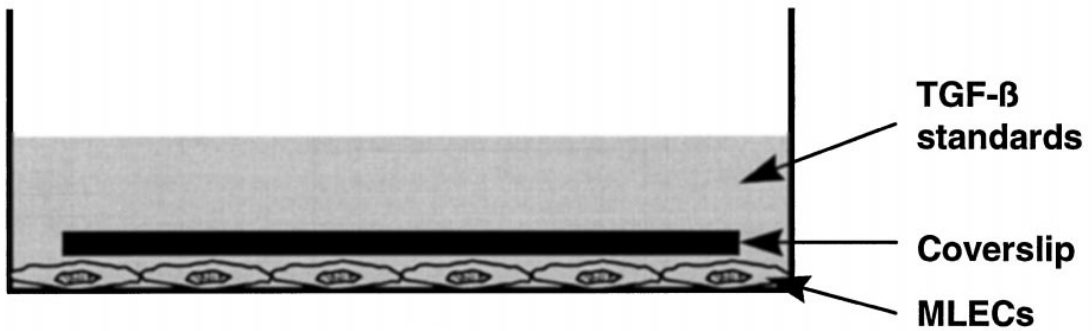


Abb. 5: Standardkurve PAI/L Assay (Yang et al., 1999).

MLECs in 24-Loch Platte mit Deckgläschen und Standardkurvenverdünnung.

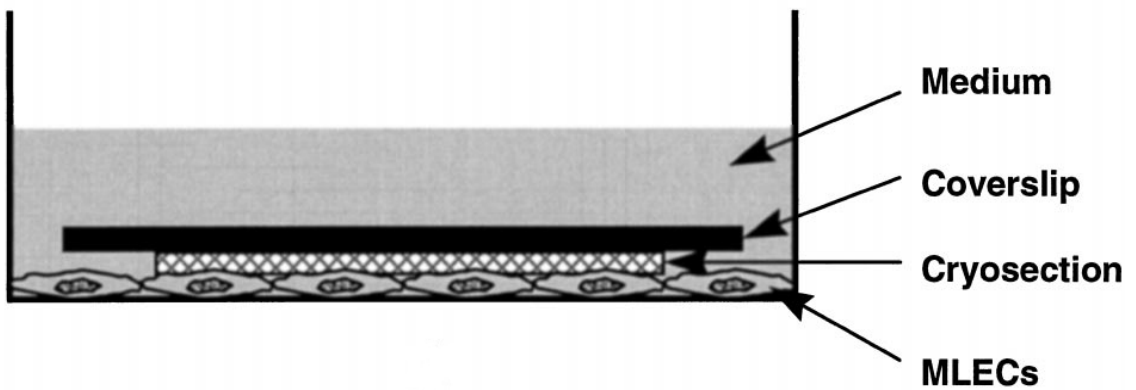


Abb. 6: Einbringen der Proben in die jeweiligen Wells (Yang et al., 1999).

Die Gewebeproben mussten kopfüber auf den MLEC's zu liegen kommen.

3.9. Luminometer

Das Auslesen der Luciferaseaktivität der Lysate erfolgte mit Hilfe des Dynex MLX Microtiter Plate Luminometers.

Plasminogen Activator Inhibitor-1 / Luciferase (PAI/L) Bioassay

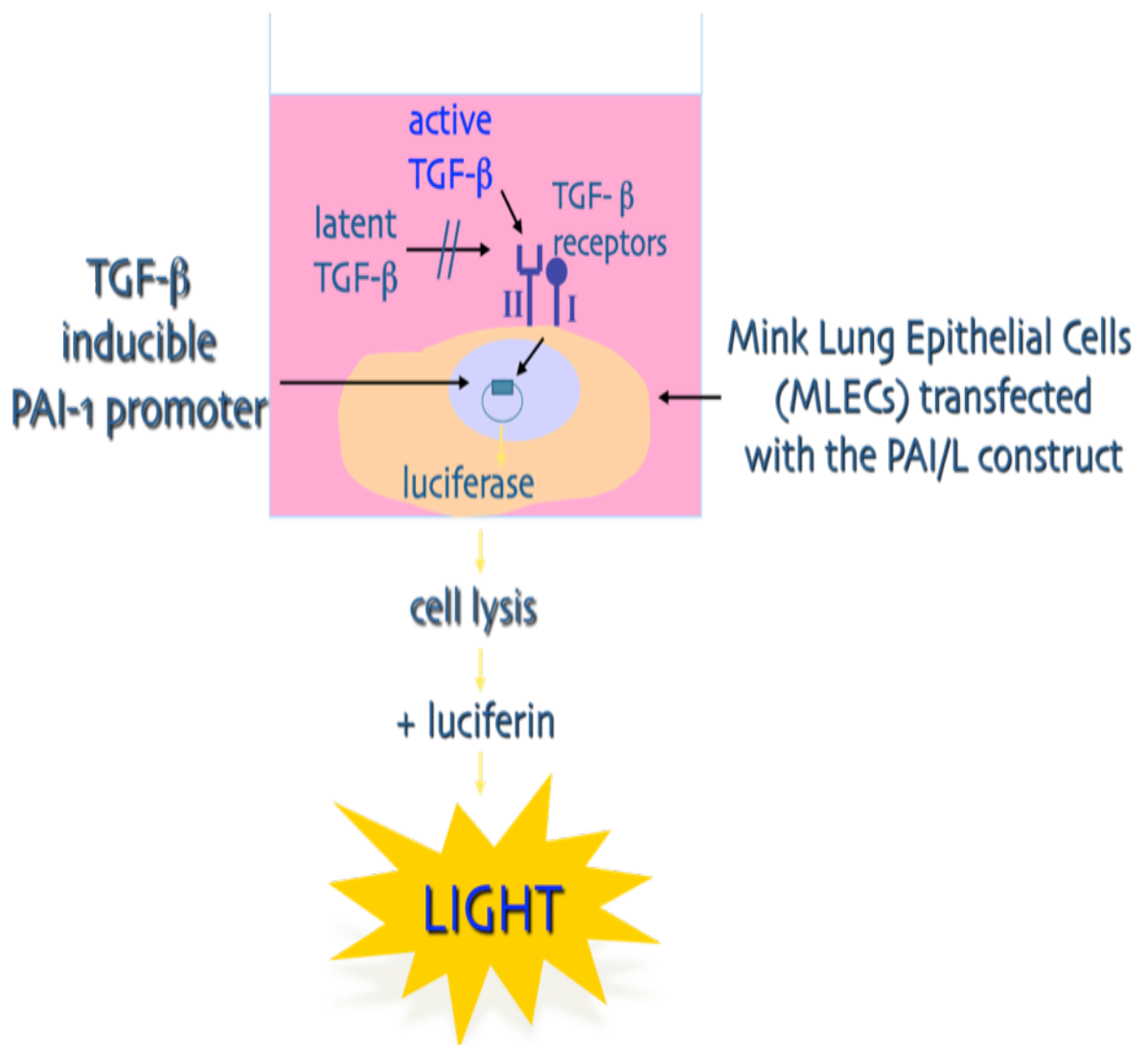


Abb. 7: Schema der Luziferaseaktivitätsmessung (Martin, 2002).

Das Schema zeigt die Funktionsweise der Luziferaseaktivitätsmessung über die Zugabe des Luziferasesubstrates (siehe dazu auch Anhang I).

4. Real Time – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

4.1. Allgemeines zur Handhabung von RNA

Um zu verhindern, dass zu messende Gewebe-RNA schon während der RNA-Gewinnung durch RNasen abgebaut wurde, war darauf zu achten, ein RNase-freies Präparationsumfeld zu schaffen. Dazu wurden Handschuhe getragen, verwendete Gefäße immer direkt verschlossen und Einmal-Reaktionsgefäße aus Polypropylen verwendet. Des Weiteren war es angezeigt, die Arbeitsflächen mit „Mercury Anti-RNase“ zu reinigen.

4.2. RNA-Gewinnung

Die Methode der RNA-Gewinnung folgte dem Qiagen RNeasy Minihandbuch aus April 2002 und die Experimente wurden mittels Qiagen RNeasy Minikit durchgeführt.

Es wurden von jeder zu testenden Probe maximal 30 mg mittels 6 µm dicken Schnitten entnommen und in ein Gefäß geeigneter Größe platziert. Im Anschluss wurden 300 µl Buffer RLT (zur Erstellung einer gebrauchsfertigen Lösung müssen 1 ml Buffer RLT 10 µl β-Mercaptoethanol zugegeben werden) hinzugegeben und die Probe wurde mit Spritze und Kanüle homogenisiert. Dem Homogenat wurden dann 590 µl doppelt destilliertes Wasser und 10 µl Qiagen Proteinase-K Lösung hinzugegeben. Die Proteinase sorgte durch einen Proteinverdau für die Reinigung der Probe. Durch Auf- und Abpipettieren wurde gründlich gemischt. Das Homogenat musste dann für 10 Minuten bei 55°C inkubiert werden. Im Anschluss daran wurde es bei 10000 x *g* zentrifugiert. Es bildete sich ein Pellet aus Zell- und Gewebetrümmern. Der sich ergebende RNA-haltige Überstand entsprach ca. 900 µl, wurde abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das 0,5-fache Volumen – entspricht 450 µl – Ethanol (96 – 100 %) zu dem geklärten Lysat gegeben und es wurde durch Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt. Dann wurde eine RNeasy Mini-Säule in ein 2-ml-Collection-Tube eingebracht und 700 µl des Lysates auf die Säule gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für

15 Sekunden bei 8000 x *g*. Der Durchfluss wurde verworfen. Mit den restlichen ca. 200 µl der Probe war ebenso zu verfahren. Es wurden nun 10 µl DNase-I-Stammlösung zu 70 µl Buffer RDD gegeben und durch Schwenken des Röhrchens vermischt. Dieser DNase-I-Inkubationsansatz wurde direkt auf die RNeasy Silicagel-Membran der RNeasy Mini-Säule pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit kontaminierende DNA-Fragmente aus dem RNA-Ansatz eliminiert wurden. Danach wurden 350 µl Buffer RW1 in die RNeasy Mini-Säule gegeben und es wurde bei 8000 x *g* zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde die RNeasy Mini-Säule in ein neues Collectiontube verbracht und 500 µl Buffer RPE war auf die Mini-Säule zu geben. Im Anschluss daran wurde bei 8000 x *g* für 15 Sekunden zum Waschen zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Zum Trocknen der RNeasy Silicagel-Membran wurde zunächst nochmals 500 µl Buffer RPE pipettiert und dann für 2 Minuten bei 8000 x *g* zentrifugiert. Nach dem Trocknen musste die RNeasy-Säule für die Elution der RNA in ein neues Collectiontube überführt werden. Dann wurden 30 – 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silicagel-Membran pipettiert und für 1 Minute bei 8000 x *g* zentrifugiert. Das RNA-Eluat war fertig.

4.3. RNA-Quantifizierung

Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde mittels photometrischer Absorption (WPA Lightwave Photometer, Wolf Laboratories, York, UK) bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) ermittelt (vgl Abb. 7). Dabei sollten die Absorptionswerte zwischen 0,15 und 1,0 liegen, um eine möglichst genaue Messung zu erhalten. Bei einem Wert von 1,0 lag die RNA-Ausbeute bei 40 µg / ml ($A_{260} = 1 \rightarrow 40 \mu\text{g} / \text{ml}$). Weiterhin konnte durch die Bildung des Quotienten von A_{260} und A_{280} die Reinheit der RNA ermittelt werden. Eventuelle Kontaminationen wie z. B. Proteine absorbieren UV-Licht im Bereich von 280 nm (A_{280}). Der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} sollte $\geq 1,8 - 2$ sein, damit keine Kontamination vorlag.

Die Konzentration der RNA-Probe wird an folgendem Beispiel deutlich gemacht:

- Volumen der RNA-Probe = 100 μ l
- Verdünnung: 10 μ l RNA-Probe + 490 μ l H₂O-dest.
(Verdünnungsfaktor 50)
- Absorptionsmessung der verdünnten Probe in einer 1-ml-Küvette entspricht z. B. 0,23
- Konzentration der RNA-Probe:
= 40 x A₂₆₀ x Verdünnungsfaktor
= 40 x 0,23 x 50
= 460 μ g / ml
- Gesamtausbeute:
= Konzentration x Volumen der Probe in ml
= 460 μ g / ml x 0,1 ml
= 46 μ g

4.4. RNA-Gelelektrophorese

Ob die RNA-Präparation intakt ist, ließ sich zusätzlich mit einer Gelelektrophorese feststellen. Hierfür wurde 1 % Agarose-Gel hergestellt. Dazu wurden 40 ml 1 x TAE Puffer mit 0,4 g Agarose vermischt. Für eine Gelelektrophorese benötigte man ein Gesamtvolumen von 500 ml. Der Ansatz wurde in einem Kolben zum Kochen gebracht, bis sich die Kristalle aufgelöst hatten. Sodann wurde das heiße Gel in die zuvor mittels Wasserwaage waagrecht ausgerichtete Elektrophoreseapparatur hineingegeben und der Kamm eingesetzt, welcher die später benötigten Taschen ausformte. Im Anschluss konnte damit begonnen werden, die RNA für die Elektrophorese vorzubereiten. Je nach RNA-Konzentration der jeweiligen Probe wurde die RNA mit DEPC-H₂O auf eine Endkonzentration von 250 ng / 20 μ l aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 60°C inkubiert und die Denaturierungsreaktion auf Eis abgestoppt. Dann werden 4 μ l 10 x RNA Loading Buffer zugegeben. Sobald das Gel erhärtet und somit abgekühlt war, konnte man den Kamm

entfernen und die Gel-Apparatur mit 350 ml 1 x TAE füllen. Die 20 µl Proben wurden dann einzeln in jeweils eine durch den Kamm entstandene Tasche eingefüllt, die Apparatur wurde geschlossen und bei einer angelegten Stromspannung von 130 V für 20 Minuten die RNA im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Färbung der Gelelektrophorese erfolgte mittels 10 µl SYBR-Green-II-Färbung, die 1:10000 verdünnt wurde. Abschließend wurde ein Foto mittels Polaroid GelCam und dem Filter Tiffen 40,5 mm grün Nr. 58 erstellt (vgl. Abb. 8).

4.5. cDNA-Synthese

Die Herstellung der cDNA erfolgt mit Hilfe von reverser Transkriptase (RT). In diesem Fall wurde die Transkriptase aus dem Maus-Monoleukämie-Virus (MMLV) gewonnen. Es erfolgt zunächst eine Erststrangsynthese mit RNA als Matritze. Zur Synthese der cDNA müssen zunächst Mini- und Master-Mix vorbereitet werden. Der Ansatz des Mini-Mix erfolgt in sterilen PCR-Tubes. Dem liegt folgende Formel zugrunde: 9,3 µl DEPC-H₂O + 1 µl Random Hexamer Primer (Konzentration 2,5 mM) + x µl Total RNA jeder Probe (Konzentration 25 – 50 ng / µl) = 10,3 µl. Jeder Ansatz wird für 10 Minuten bei 70°C denaturiert und die Reaktion mit Eis abgestoppt. Der Master-Mix wird angesetzt, indem 4 µl MgCl₂ (Konzentration 5 mM), 2 µl PCR-Puffer (ohne MgCl₂, Konzentration 1x), 2 µl dNTP's (Konzentration 1 mM), 0,7 µl RNase Inhibitor (Konzentration 1 U / µl) und 1 µl Reverse Transkriptase (Konzentration 2,5 U / µl) in einem sterilen Tube vermischt werden (Gesamtvolumen 9,7 µl für einen Ansatz). Die gebrauchte Menge entspricht n Probenansätzen + 1. Der RT-Zyklus läuft 60 Minuten bei 37°C zur cDNA-Synthese, 10 Minuten bei 95°C zur RT-Inaktivierung und hält dann 4°C zur cDNA-Konservierung. Die Archivierung der cDNA erfolgt in Aliquots bei -80°C.

4.6. RT-PCR Programmablauf

Die RT-PCR erfolgt mit dem Applied Biosystems 7500 Real Time PCR-System. Der erste, der Denaturierung dienende Inkubationsschritt läuft 10 Minuten bei 95°C. Nachfolgend laufen 40 Zyklen, bei denen es jeweils erst

zu einer Denaturierung der DNA bei 95°C für 0,15 Minuten und dann zum Primer-Annealing und zur Amplifikation bei 60°C innerhalb eines einminütigen Zyklus kommt. Die RT-PCR erfolgte mittels TaqMan® Assay. Dabei wird eine TaqMan® Probe, die gleichzeitig mit den Primern an die zu ermittelnde DNA-Probe bindet, eingesetzt. Diese generiert, solange sie intakt ist, kein Reportersignal. Sobald die TaqMan® Probe (vgl. Abb. 9), von der die Primer verlängernden Polymerase abgebaut wird, generiert sich ein Reportersignal, welches gemessen werden kann.

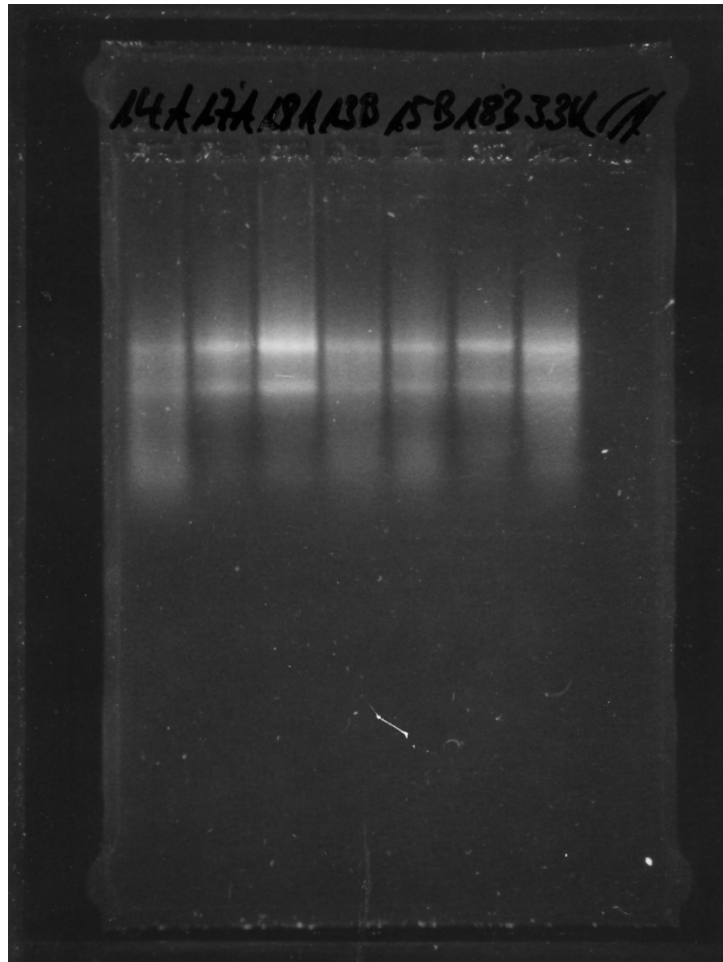


Abb. 8: Polaroidfoto einer elektrophoretischen RNA-Auftrennung.

Es sind deutlich 2 Banden für die ribosomale RNA bei 18S und 28S zu erkennen. Somit war die RNA-Präparation erfolgreich.

Pro Kammer wurden 20 μ l einer RNA-Probe mit einer Konzentration von 250 ng RNA benötigt. Die Proben wurden im elektrischen Feld aufgetrennt und mit SYBR-Green-II 2 Stunden laufen gelassen.

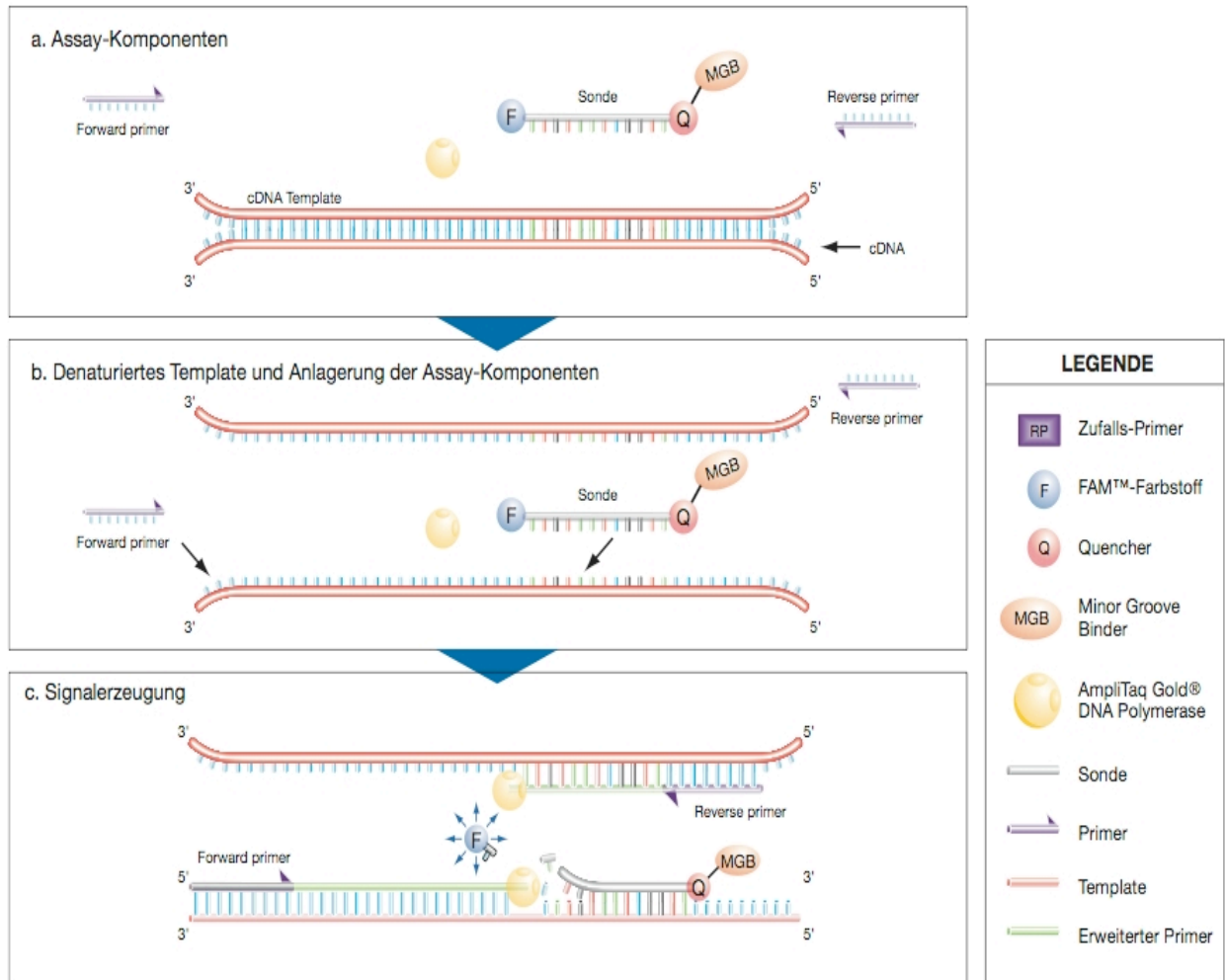


Abb. 9: Schema des TaqMan® Prinzips (vgl. Applied Biosystems Inc., 2009).

Für weitere Erläuterungen siehe Legende.

5. Herstellung von Gefrierschnitten

Die zu testenden Gewebeproben wurden bei -80°C aufbewahrt. Um davon Gefrierschnitte herstellen zu können, musste dafür gesorgt werden, dass das Gewebe während der Probenentnahme nicht auftaute. Dazu wurde es nach Entnahme aus der Kühltruhe in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Cryotom wurde auf -30°C heruntergekühlt, so dass auch während des Schneidens das Gewebe nicht auftauen konnte. Die Gewebeproben waren mit Methylcellulose auf einem Korkplättchen befestigt. Zum Bearbeiten im Cryotom musste das Korkplättchen mitsamt der Gewebeprobe mittels Methylcellulose auf einer Metallpatrone befestigt werden, die dann an definierter Position in das Cryotom eingespannt wurde. Je nach Bestimmung der zu schneidenden Proben wurden sie $4\ \mu\text{m}$ (histologische Färbungen), $6\ \mu\text{m}$ (RNA-Isolation) oder $20\ \mu\text{m}$ (PAI/L Assay) dick geschnitten. Die Aufbewahrung der fertiggestellten Cryoschnitte erfolgte bis zur Weiterverarbeitung in Petrischalen bei -20°C .

6. Fluoreszenzfärbung

6.1. Cryoschnitte anfertigen

Für die Fluoreszenzfärbungen wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von $4\ \mu\text{m}$ angefertigt. Diese wurden auf Superfrost-Objektträger aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Fixierung der Schnitte. Die Objektträger wurden für die gesamte Dauer des Experiments in einer feuchten Kammer aufbewahrt und auch in dieser inkubiert. Dazu wurden diese für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Paraformaldehyd, dem Magnesium und Kalzium für besseren Halt der Proben auf den Objektträgern zugegeben wurde, fixiert. Im Anschluss wurde dreimal mit $1 \times \text{TBS } 0,05\ \text{mol / l}$ gewaschen. Nachfolgend wurden die Proben mit $0,1\ \%$ Triton X-100 für 10 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert und wieder dreimal mit $1 \times \text{TBS}$ gewaschen. Im Anschluss wurde durch Inkubation mit $50\ \text{mM}$ Ammoniumchlorid für 10 Minuten bei Raumtemperatur das Paraformaldehyd neutralisiert. Es erfolgte ein

weiterer Waschvorgang mit dreimal 1 x TBS. Daraufhin wurde eine Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 5 % Humanserum und 5 % Eselserum (Spezies des Sekundärantikörpers) in TBS durchgeführt und es wurde erneut dreimal mit 1 x TBS gewaschen. Abschließend erfolgte eine weitere Blockierung mit dem DAKO® Biotin Blocking System, welches die Hintergrundfärbung durch endogenes Biotin verhindern sollte. Dabei wurde zunächst für 10 Minuten bei Raumtemperatur die Avidin-Lösung aufgetragen und danach mit TBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Aufbringen von Biotin für 10 Minuten bei Raumtemperatur und es wurde ebenfalls mit TBS gewaschen.

6.2. Verdünnung der Antikörper

Es wurden folgende primäre Antikörper für die immunhistochemische Färbung benutzt (Sollkonzentration in Klammern): anti-Human VEGF-R3 Flt-4 (15 µg / ml), monoclonal Mouse Anti-Human-D2-40 (5 µg / ml), anti-Human LAP TGF-β₁ (15 µg / ml), monoclonal anti-TGF-β_{1,2,3} (5 µg / ml), außerdem Maus IgG (5 µg / ml) und Ziegen IgG (15 µg / ml) zur Kontrolle. Die sekundären Antikörper waren Biotin-SP-konjugiertes AffiniPure F(ab')₂ Fragment Esel Anti-Ziege IgG (H+L) und Biotin-SP-konjugiertes AffiniPure F(ab')₂ Fragment Esel Anti-Maus IgG (H+L) in der Verdünnung 1:200, das entspricht 2,5 µg / ml. Als tertiärer Antikörper wurde 2 µg / ml CyTM2-konjugiertes Streptavidin benutzt. Die Verdünnung der Antikörper erfolgt mit 5 % BSA in 1 x TBS.

6.3. Auftragen der Antikörper

Zunächst wurden die Primärantikörper zu den Proben auf den Objektträgern gegeben und es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurde die Probe dreimal mit 1 x TBS gewaschen. Die Sekundär-Antikörper wurden je nach Spezies der Primärantikörper aufgetragen und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Nachfolgend wurde viermal mit 1 x TBS gewaschen. Die Tertiärantikörper wurden aufgetragen und ebenfalls für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde wieder gewaschen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Probe auf dem

Objektträger mit DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium eingedeckt. Die eingedeckten Proben mussten bei 2 - 8°C im Dunkeln aufbewahrt werden.

Ergebnisse

1. TGF- β -Aktivität

TGF- β ist einer der Hauptregulatoren der Wundheilung. Es wurde untersucht, ob in nicht heilenden Wunden (Druckgeschwüren) von querschnittsgelähmten Patienten eine Fehlregulation vorliegt. Darum wurde die TGF- β -Aktivität in verschiedenen Gewebeproben von Querschnittsgelähmten mit Hilfe des PAI/L Bioassays untersucht.

Das Diagramm in Abb. 10 zeigt die TGF- β -Aktivität von wundnahen Proben. Dabei handelte es sich um Gewebe aus dem Wundgrund eines Druckulkus zehn verschiedener, gelähmter Patienten. Die getesteten wundfernen Proben stammten ebenfalls von diesen Patienten; die Entnahmeregion lag jedoch abseits der Wunde in unverletzter, gelähmter Haut. Die Kontrollgewebeproben – nachfolgend als Kontrolle(n) bezeichnet – stammten von gesunder Haut nicht gelähmter Patienten. Im Folgenden gilt grundsätzlich obige Definition für wundnahe(s) und wundferne(s) Proben / Gewebe / Haut.

Festzustellen war, dass die TGF- β -Aktivität der wundnahen und wundfernen Proben im Vergleich zu den Kontrollen aus gesunder, nicht gelähmter Haut deutlich erhöht war. Dabei war die TGF- β -Aktivität bei wundnahen, also vom Wundrand gelähmter Patienten stammenden Proben am höchsten, es folgten die wundfernen Proben und dann die Kontrollen. Die Aktivität der wundnahen Gewebeproben lag im Mittel bei einem Wert von 34,1 pg / mm³, die der wundfernen Proben bei 19,7 pg / mm³ und die Aktivität der Kontrollproben hatte einen Mittelwert von 10,7 pg / mm³ (vgl. dazu Tabelle 1).

Während der Anstieg der TGF- β -Aktivität in Druckgeschwüren, verglichen mit normaler Haut, zu erwarten war, fällt auf, dass die TGF- β -Werte in unverletzter, gelähmter Haut fast doppelt so hoch waren wie in nicht gelähmter, normaler Haut.

Proben (n=10)	TGF- β -Aktivität	
	Mittelwert \pm SEM	Median
Kontrollen	10,7 \pm 3,1	7,6
Wundfern	19,7 \pm 2,1	19,1
Wundnah	34,1 \pm 5,2	30,5

Tab. 1: TGF- β -Aktivität ohne Antikörperblockierung.

Mittelwerte \pm SEM (Standard Error of the Mean) und die Mediane der gesamt getesteten Proben aus Abb. 10 in pg/mm³.

2. Aktivitätsverteilung auf TGF- β und Aktivin-A

Da im hier verwendeten PAI/L Bioassay sowohl die aktivierten TGF- β -Isoformen 1, 2 und 3 als auch Aktivin-A gemessen wurden (Brunner, G., Fachklinik Hornheide, Münster – persönliche Mitteilung), wurde die Aktivitätsverteilung auf beide Wachstumsfaktoren bestimmt.

Dazu wurde jeweils einer der beiden Wachstumsfaktoren mit spezifischen Antikörpern blockiert und dann die Restaktivität bestimmt. Es handelte sich dabei um einen neutralisierenden pan-spezifischen- α -TGF- β 1,2,3-Antikörper sowie einen neutralisierenden α -Aktivin-A-Antikörper. Durch die Antikörper wurde die biologische Aktivität von TGF- β und dem zur Superfamilie TGF- β gehörenden Aktivin-A gehemmt. Das Diagramm in Abb. 11 zeigt, dass die Blockierung des TGF- β -ähnlichen Signals im PAI/L Bioassay durch den pan-spezifischen-TGF- β -Antikörper im wundnahen Bereich stärker erfolgte als in wundfernen Abschnitten. Bei den in der Wunde entnommenen Proben wurde ein maximales Restsignal TGF- β -ähnlicher Aktivität von 68,9 % festgestellt. Demgegenüber steht ein Restsignal von 73,6 % bei wundfernen Gewebeproben. Die Restsignale sind

jeweils im Vergleich zur Kontrolle zu sehen, die einem Signal von 100 % entspricht. Bei der Blockierung des Signals lag ein medianer TGF- β -Aktivitätsanteil von 56,2 % bei den wundnahen Proben und bei den wundfernen Proben im Median ein TGF- β -Aktivitätsanteil von 44,0 % vor.

Da auch Aktivin-A im PAI/L Bioassay gemessen wird, wird im Folgenden auch bei dem von Aktivin-A erzeugten TGF- β -ähnlichen Signal von einer TGF- β -Signalaktivität gesprochen.

Das Diagramm in Abb. 12 stellt in Gegenwart von neutralisierenden α -Aktivin-A-Antikörpern deutlich erniedrigte TGF- β -ähnliche Signale im Vergleich zu den Kontrollen dar. In diesem Experiment zeigte sich, im Unterschied zu der Blockierung bei pan-spezifischem- α -TGF- β 1,2,3, eine weniger stark verminderte Aktivität bei den wundfernen Proben. Durch die Blockierung (siehe Tabelle 3) im Vergleich zur Kontrolle ergab sich ein Aktivin-A-Aktivitätsanteil von 62,2 % bei wundnahen Gewebeproben. Die Restaktivität bei wundfernen Proben lag analog bei 46,7 %.

Folgende Tabellen zeigen die aus den Ergebnissen der Diagramme folgenden Wachstumsfaktorzusammensetzungen, die tatsächlich in den Wundgewebeproben vorlagen. Tabelle 2 weist dabei die Mittelwerte und Mediane des TGF- β -Aktivitätsanteils der wundnahen und wundfernen Gewebeproben aus – die Blockierung erfolgte mit pan-spezifischen-TGF- β 1, -2, -3-Antikörpern.

Analog dazu stellt Tabelle 3 den Aktivin-A-Aktivitätsanteil in Gegenwart von Aktivin-A-Antikörpern dar.

Proben (n=5)	TGF-β-Aktivitätsanteil	
	Mittelwert±SEM	Median
Wundnah	50,9±6,2	56,2
Wundfern	41,1±5,7	44,0

Tab. 2: TGF-β-Aktivitätsanteil in Wundproben von Querschnittsgelähmten.

Mittelwerte ± SEM sowie die Mediane des TGF-β-Aktivitätsanteils in Prozent.

Proben (n=5)	Aktivin-A-Aktivitätsanteil	
	Mittelwert±SEM	Median
Wundnah	55,6±7,5	62,2
Wundfern	48,0±5,6	46,7

Tab. 3: Aktivin-A-Aktivitätsanteil in Wundproben von Querschnittsgelähmten.

Die Tabelle enthält die Mittelwerte ± SEM und die Mediane des Aktivin-A-Aktivitätsanteils in Prozent der Kontrolle (mit Kontroll-IgG).

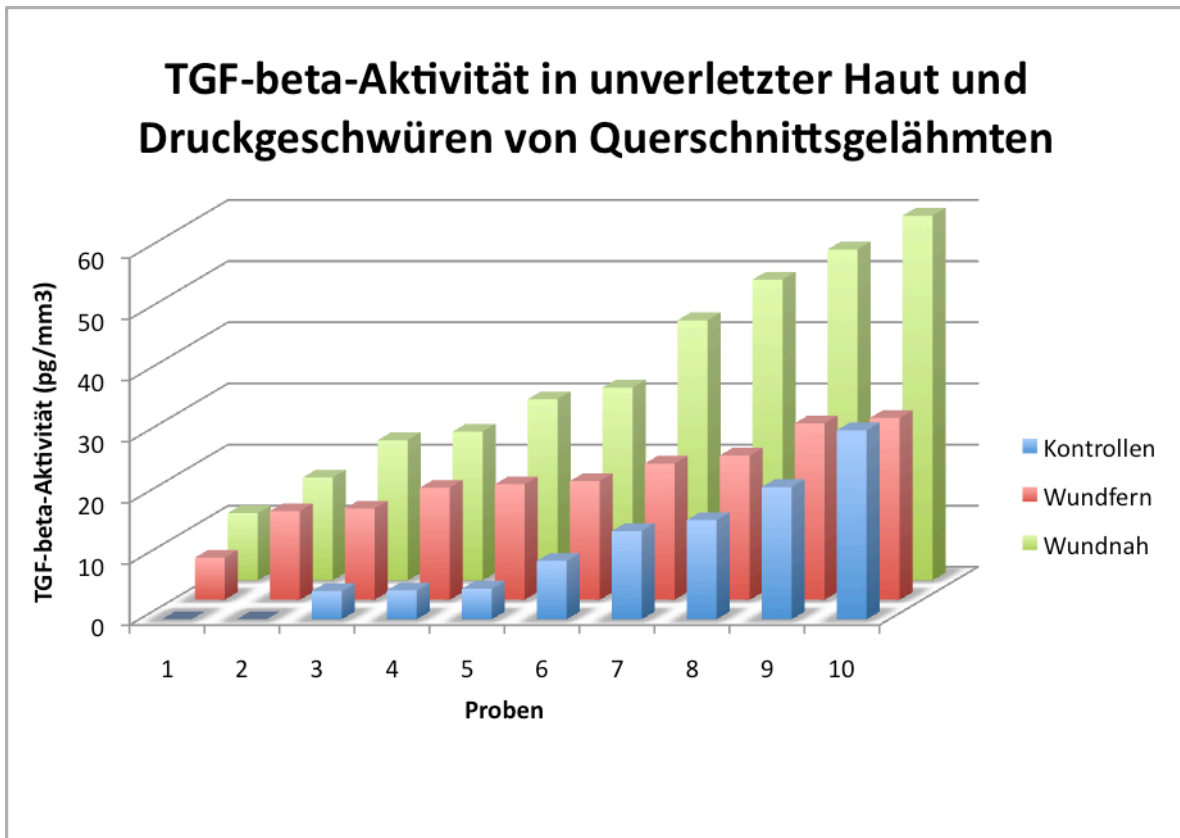


Abb. 10: Das Diagramm zeigt die TGF- β -Aktivität in pg/mm^3 .

Die TGF- β -Aktivität in den Gewebeproben wurde mit dem PAI/L Bioassay bestimmt. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Proben herzustellen, wurden die Fläche und Dicke der Gewebeschnitte ermittelt und die TGF- β -Werte dann, den Ergebnissen des PAI/L Bioassays entsprechend, von pg / ml auf pg / mm^3 umgerechnet. Dabei ist zu bedenken, dass ein Well der PAI/L Bioassay Auswertung ein Volumen von 0,5 ml enthielt.

Von jeder Probe wurden in neun Experimenten Triplikate erstellt und mittels PAI/L Bioassay untersucht. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte der entsprechenden Triplets.

Die Proben in diesem und in folgenden Diagrammen sind der Signalhöhe nach geordnet.

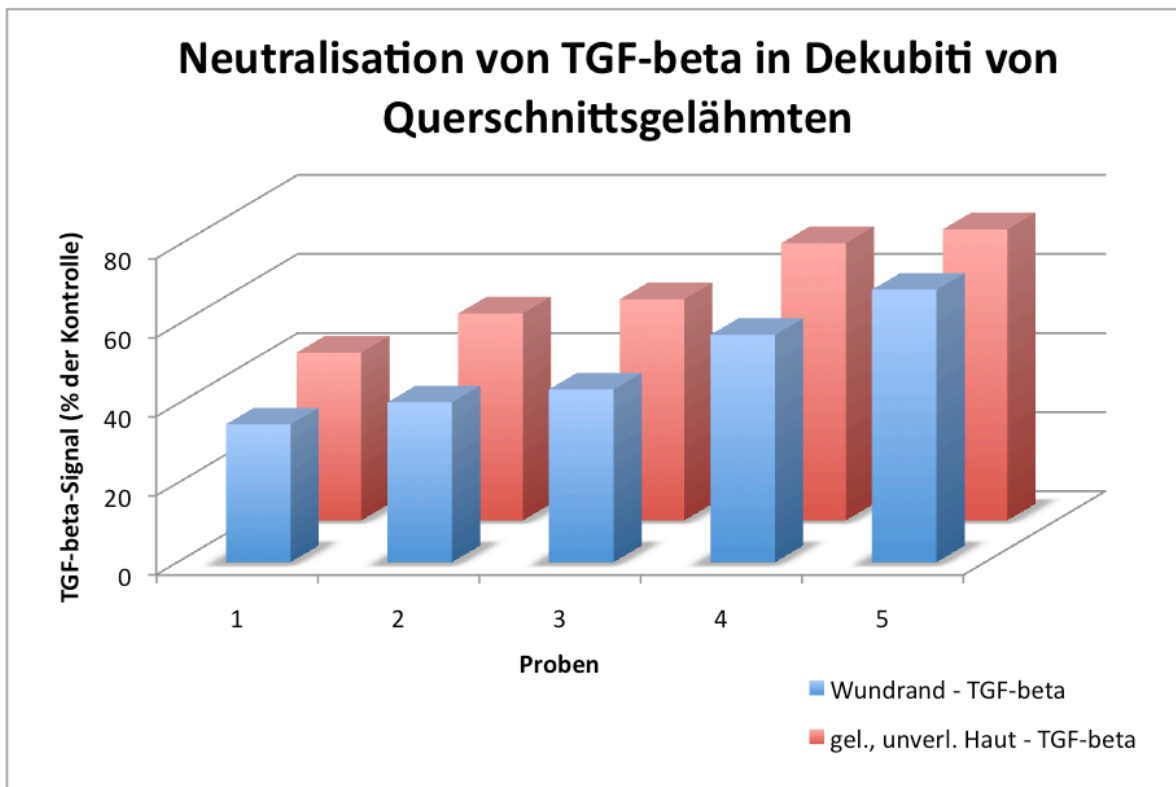


Abb. 11: Blockierung des TGF- β -Signals in Gewebeproben.

Das Diagramm weist das in Gegenwart der α -TGF- β -Antikörper gemessene Signal aus. Die Kontrollaktivität, die in Gegenwart von Kontroll-IgG bestimmt wurde, wird als 100 %-Wert angesehen.

Diese Messungen wurden mit Triplikaten der entsprechenden Proben durchgeführt. Die Werte stammen aus fünf durchgeführten Experimenten.

Der pan-spezifische-TGF- β 1,2,3-Antikörper wurde mit einer Sollkonzentration von 5 μ g / ml verarbeitet.

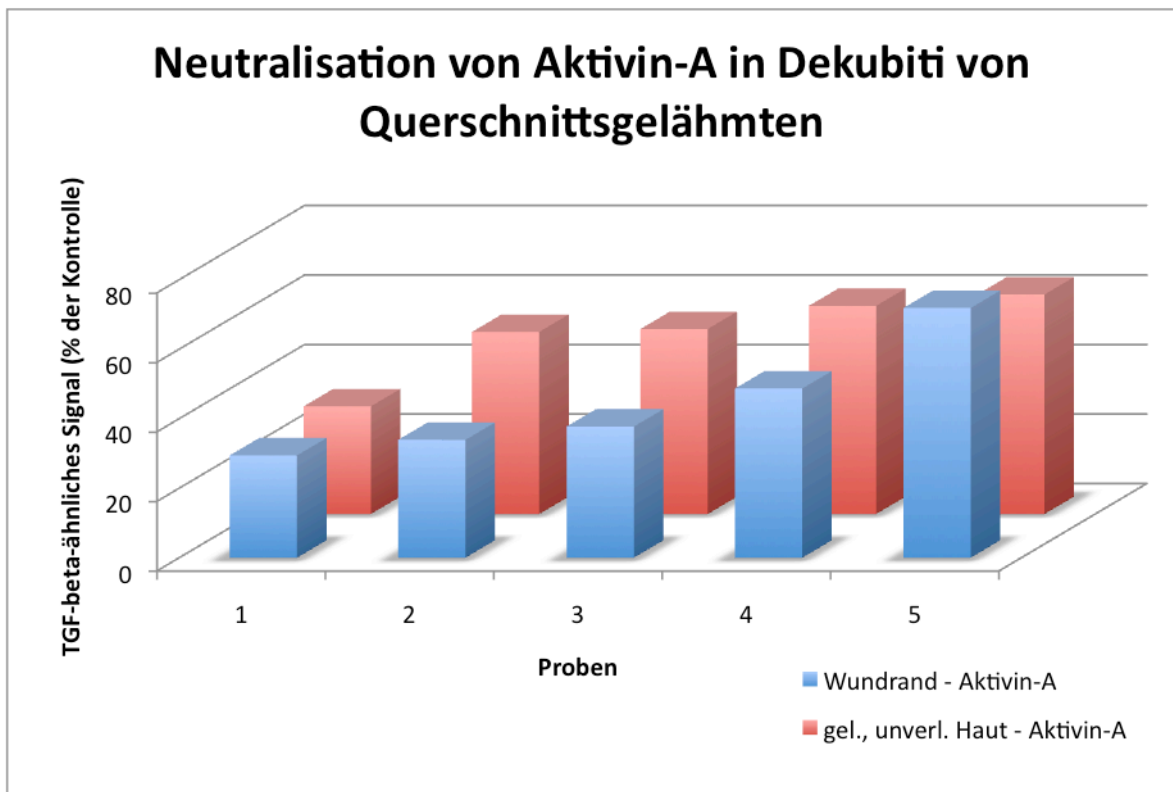


Abb. 12: Blockierung des TGF- β -ähnlichen Signals in Gewebeproben.

Das Diagramm stellt das in Gegenwart von α -Aktivin-A-Antikörpern gemessene Signal dar. Die Kontrollaktivität, die in Gegenwart von Kontroll-IgG bestimmt wurde, wird als 100 %-Wert gesetzt.

Die Konzentration der Antikörper betrug 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ analog zur Konzentration des pan- α -TGF- β -Antikörpers im vorherigen Experiment. Es wurde in vier Experimenten mit Triplikaten gearbeitet.

3. Aktivitätsverteilung von TGF- β und Aktivin-A in Haut und Wunden von Querschnittsgelähmten

Weitergehend soll dargestellt werden, zu welchem Anteil obige Faktoren das gemessene TGF- β -ähnliche Signal ausgelöst haben. Aufschluss hierüber geben die Diagramme in Abb. 13 und Abb. 14. Dargestellt sind die prozentualen Aktivitätsanteile beider Faktoren. Daran ist abzulesen, welcher Anteil des Signals von TGF- β bzw. Aktivin-A hervorgerufen wurde. Zunächst erfolgt die Darstellung in tabellarischer Form. Dabei werden Mittelwerte und Mediane gezeigt.

Die Aktivitätsverteilung auf TGF- β und Aktivin-A war in Druckgeschwüren und unverletzter, gelähmter Haut vergleichbar. In beiden Gewebeproben lagen etwa gleiche Mengen an TGF- β - und Aktivin-A-Aktivität vor.

Die Tabellen 4 & 5 zeigen die Aktivitätsverteilung von TGF- β und Aktivin-A in Prozent.

Proben	Aktivitätsverteilung	
	(% der Kontrolle)	
	Mittelwert±SEM	Median
TGF-β	50,9±6,2	56,2
Aktivin-A	55,6±7,5	62,2

Tab. 4: Aktivitätsverteilung von TGF-β und Aktivin-A in Druckgeschwüren.

Die Tabelle enthält die Aktivitätsverteilung von TGF-β und Aktivin-A bei wundnahen Gewebeproben in Prozent der Kontrolle.

Proben	Aktivitätsverteilung	
	(% der Kontrolle)	
	Mittelwert±SEM	Median
TGF-β	41,1±5,7	44,0
Aktivin-A	48,0±5,6	46,7

Tab. 5: Aktivitätsverteilung von TGF-β und Aktivin-A in unverletzter, gelähmter Haut.

Die Aktivitätsverteilung von TGF-β und Aktivin-A in Hautgewebe ist in der Tabelle in Prozent der Kontrolle angegeben.

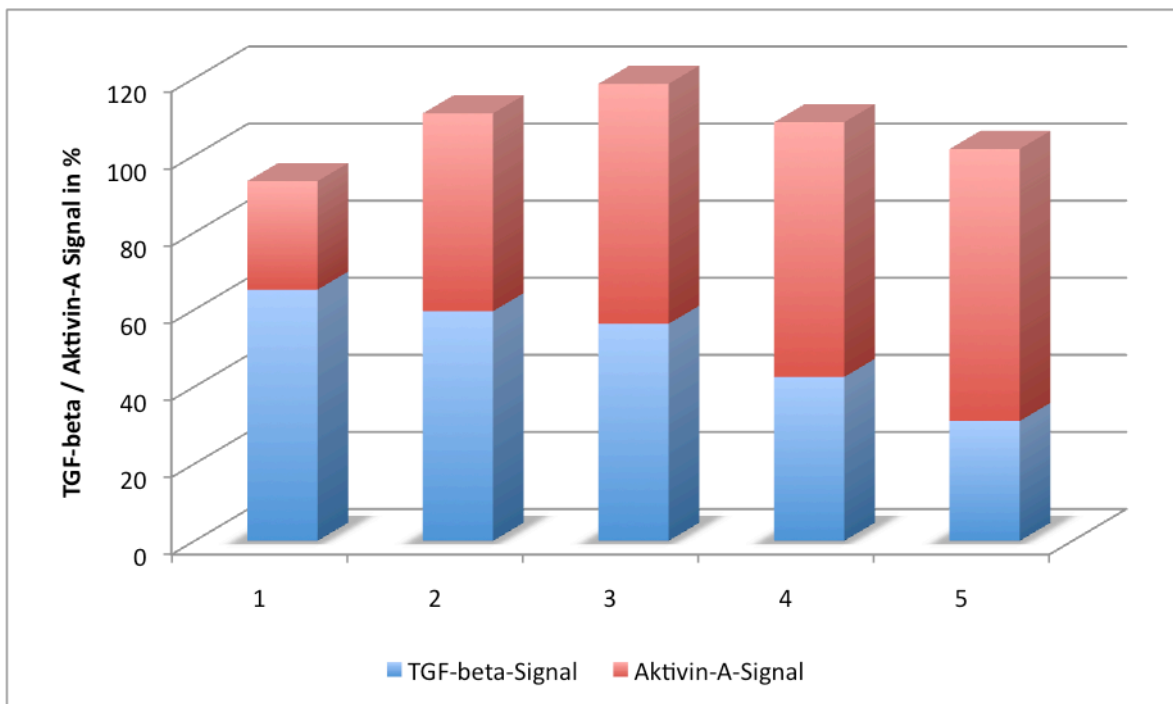


Abb. 13: TGF- β - und Aktivin-Signalanteile in Wundgewebe von Dekubiti.

Das Diagramm zeigt den Anteil von TGF- β und Aktivin-A am gemessenen TGF- β -ähnlichen Signal. Im Idealfall ergänzen sich diese zu einer Aktivität von etwa 100 %.

Dieses Diagramm stellt einen Zusammenschluss der Daten aus vorherigen Diagrammen bzw. Ergebnissen dar. Es kommen somit alle getesteten Proben aus dem Wundrand zum Tragen.

Bei den Wundrandproben ergab sich ein Mittelwert der TGF- β - bzw. Aktivin-A-Gesamtaktivität aller Proben zusammen von $46,7 \text{ pg} / \text{mm}^3$. Daraus kann über den Medianwert des Signalanteils der Anteil an TGF- β bzw. Aktivin-A berechnet werden:

- $56,2 \%$ von $46,7 \text{ pg} / \text{mm}^3 = 26,2 \text{ pg} / \text{mm}^3$ TGF- β -Anteil
- $62,2 \%$ von $46,7 \text{ pg} / \text{mm}^3 = 29,1 \text{ pg} / \text{mm}^3$ Aktivin-A-Anteil

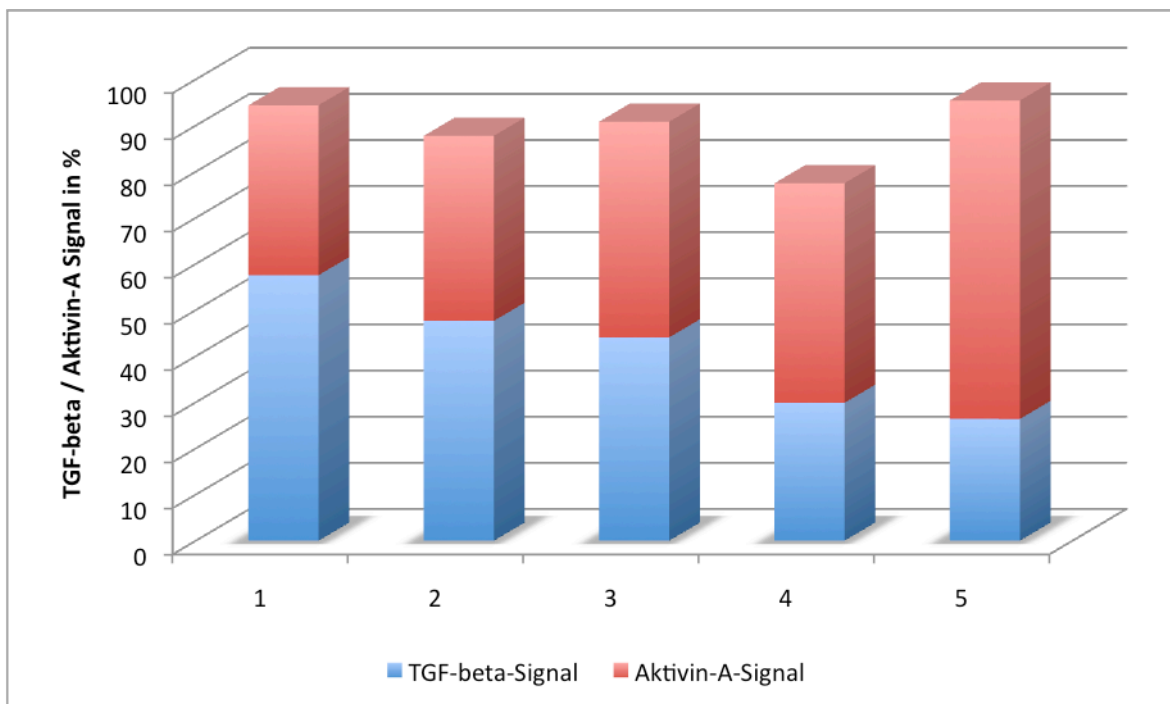


Abb. 14: TGF- β - und Aktivin-A-Signalanteile in unverletzter, gelähmter Haut.

Das Diagramm zeigt analog zu Abb. 13 den Anteil von TGF- β und Aktivin-A am gemessenen TGF- β -ähnlichen Signal.

Wie in Abb. 13 stellt dieses Diagramm einen Zusammenschluss der einzelnen Aktivitätsanteile von TGF- β und Aktivin-A aus den vorherigen Experimenten dar.

Bei den Proben unverletzter, gelähmter Haut ergab sich ein Mittelwert der TGF- β - bzw. Aktivin-A-Gesamtaktivität aller Proben von $55,4 \text{ pg} / \text{mm}^3$. Daraus wird über den Medianwert des Signalanteils der Anteil von TGF- β bzw. Aktivin-A berechnet:

- $44,0 \%$ von $55,4 \text{ pg} / \text{ml} = 24,4 \text{ pg} / \text{mm}^3$ TGF- β -Anteil
- $46,7 \%$ von $55,4 \text{ pg} / \text{ml} = 25,9 \text{ pg} / \text{mm}^3$ Aktivin-Anteil

4. Polymerasekettenreaktion

TGF- β wird als latente Vorstufe gebildet und sezerniert. Diese Vorstufe wird dann auf verschiedene Signale hin (z. B. Verwundung) über unterschiedliche molekulare Mechanismen aktiviert.

Die folgenden Experimente wurden als Pilotexperimente durchgeführt, um einen ersten Einblick in potentielle TGF- β -Aktivatoren zu erhalten. Auf Grund limitierter Gewebemengen war im Rahmen dieser Arbeit leider keine umfassende und gesicherte Analyse möglich.

Es sollte herausgefunden werden, welche molekularen TGF- β -Aktivatoren für die erhöhte Aktivität in Gewebeproben von Querschnittsgelähmten verantwortlich sein könnten.

Der erste untersuchte potentielle TGF- β -Aktivator ist GPI-PLD (Glykosylphosphatidylinositol-spezifische Phospholipase-D). In Tabelle 6 wird die Anzahl der mRNA-Kopien, welche die GPI-PLD-Expression in den Gewebeproben (wundnah, wundfern, Kontrolle) kodieren, dargestellt. Die Berechnung der mRNA-Kopienanzahl erfolgte mittels Rückrechnung aus dem C_t -Wert der Real-Time-PCR (RT-Polymerasekettenreaktion). Dabei ist davon auszugehen, dass bei einem C_t -Wert von 40 eine cDNA-Kopie nachgewiesen wird und sich dementsprechend bei abnehmendem C_t -Wert die cDNA-Anzahl verdoppelt (bei $C_t = 39$ sind 2 Kopien vorhanden; bei einem C_t -Wert von 38 sind 4 Kopien vorhanden usw.). Der C_t -Wert entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, die notwendig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen, welches der Produktmenge an DNA entspricht (Pfaffl, 2004).

Proben	GPI-PLD-cDNA- Kopienanzahl
	Mittelwert±SEM
Wundnah (n=5)	6275±3194
Wundfern (n=2)	8256±7265
Kontrollen (n=2)	5868±2222

Tab. 6: GPI-PLD-Expression in Haut und Wunden von Querschnittsgelähmten.

Mittelwerte ± SEM der cDNA-Kopienanzahl der GPI-PLD. Medianwerte werden nicht ausgewiesen.

Die Diagrammdarstellung in Abb. 15 verdeutlicht, dass bei jeweils einer wundnahen und einer wundfernen Probe die Anzahl der Kopien deutlich erhöht ist. Die restlichen Proben führen im Vergleich zur Kontrolle zu eher niedrigen Werten. Dieses Ergebnis ist nicht eindeutig, da die Schwankungen zu hoch sind. Es handelt sich bei diesen Experimenten, wie bereits ausgeführt, um einen Screening-Ansatz, da auf Grund geringen Probenmaterials nur wenig Probenentnahmen möglich waren. Es fehlt somit die statistische Relevanz.

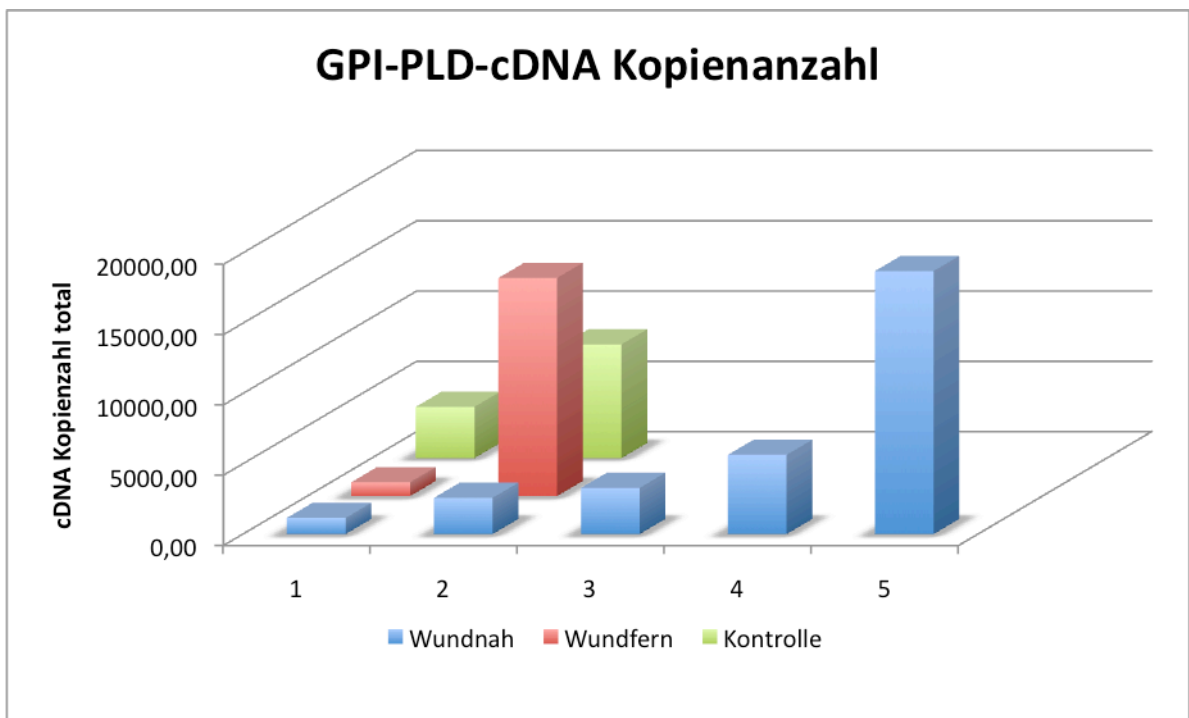


Abb. 15: Diagrammdarstellung GPI-PLD.

Das Diagramm zeigt die Anzahl der GPI-PLD-cDNA-Kopien pro μg Gesamt-RNA. Die cDNA-Kopienanzahl entspricht theoretisch der Anzahl der mRNA-Kopien für GPI-PLD in Gewebe.

Die Kopienanzahl wurde anhand der C_t -Werte der RT-PCR berechnet. Weiterhin wurden $1 \mu\text{g} / 20 \mu\text{l}$ – entsprechend 50 ng pro Well – cDNA eingesetzt. Die RT-PCR durchlief 40 Zyklen.

Bei den als Probe Nr. 5 in dieser Abbildung und in der Abbildung Nr. 16 bezeichneten Gewebeproben handelt es sich um Gewebe des gleichen Spenders.

Ein weiterer möglicher Aktivator von TGF- β ist das furinähnliche Enzym „Paired Basic Amino Acid Cleaving Enzyme“ (PACE4).

Proben	PACE4-cDNA-Kopienanzahl
	Mittelwert\pmSEM
Wundnah (n=5)	9952 \pm 5064
Wundfern (n=2)	5425 \pm 4263
Kontrollen (n=2)	5095 \pm 1899

Tab. 7: PACE4-cDNA-Expression in Wunden und Haut von Querschnittsgelähmten.

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte \pm SEM der cDNA-Kopienanzahl von PACE4. Medianwerte werden nicht ausgewiesen, da vom wundfernen Gewebe und Kontrollen aufgrund nicht ausreichender Probenmasse nur zwei Proben entnommen werden konnten, und somit analog zur GPI-PLD-Expression die statistische Relevanz fehlt.

Blakytyn et al. (2004) fanden heraus, dass Blutplättchen aktive, furinähnliche Enzyme enthalten und sezernieren. Eines dieser Enzyme, nämlich PACE4, ist ein sekretorisches Enzym mit Vorkommen in vielen Geweben und megakaryoblastischen Zellen. Es wird vermutet, dass, wenn sezerniert, PACE4 unabhängig von vorhandenen Blutplättchen im Gewebe zu einer Aktivierung des mit der extrazellulären Matrix verbundenen,

latentem TGF- β -Komplexes führt. Der molekulare Mechanismus der Aktivierung ist derzeit noch unbekannt. Da PACE4 ein potentieller TGF- β -Aktivator ist, wurde in einem weiteren Experiment die PACE4-mRNA-Expression bestimmt. Die cDNA-Kopienanzahl ist Tabelle 7 zu entnehmen.

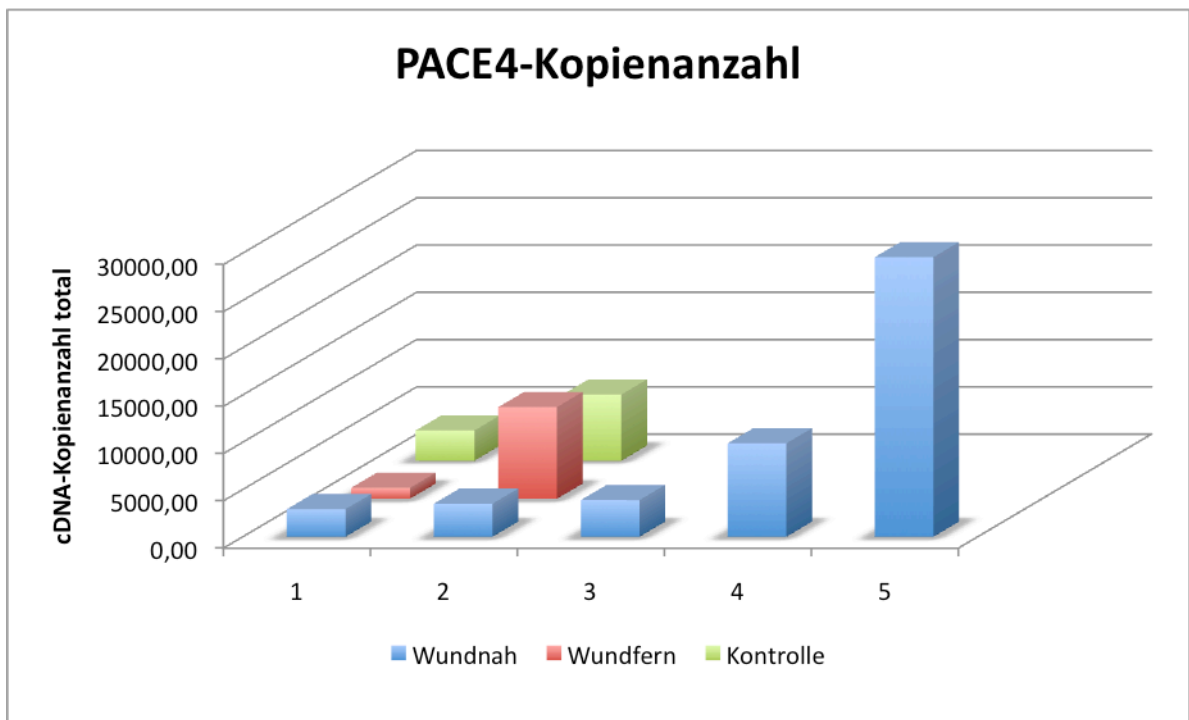


Abb. 16: Diagrammdarstellung PACE4.

Dem Diagramm ist die Anzahl der PACE4-cDNA-Kopien pro μg Gesamt-RNA zu entnehmen. Die experimentellen Details entsprechen den bereits in Abb. 15 erläuterten, da die Proben in einem Versuch getestet wurden. Hinsichtlich Probe Nr. 5 wird auf die Legende zu Abb. 15 verwiesen.

Lediglich bei einer wundnahen Probe war die Anzahl deutlich erhöht. Die restlichen Proben bewegten sich im Bereich der Kontrollen.

Es ist nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob PACE4 in ausreichender Menge im Gewebe vorhanden ist, um eine relevante Menge TGF- β zu aktivieren, da auch in diesem Experiment nicht genügend Probengewebe vorhanden war und somit keine eindeutigen Ergebnisse vorliegen.

Ein weiterer, auch zur TGF- β -Superfamilie gehörender Faktor, der in die Aktivierung latenten TGF- β s involviert ist, ist der „Growth and Differentiation Factor 5“ (GDF-5). Tabelle 8 erläutert die cDNA-Kopienanzahl nach RT-PCR-Auswertung.

Proben (n=2)	GDF-5-cDNA-Kopienanzahl
	Mittelwert\pmSEM
Wundnah	282 \pm 12
Wundfern	192 \pm 75
Kontrolle	241 \pm 81

Tab. 8: GDF-5-Expression in Haut und Wunden von Querschnittsgelähmten.

Die Tabelle weist die Mittelwerte \pm SEM der cDNA-Kopienanzahl von GDF-5 analog zu Tab. 6 und 7 aus.

GDF-5 spielt bei der Aktivierung von latentem TGF- β eine regulatorische Rolle (Brunner, G., Fachklinik Hornheide, Münster – persönliche Mitteilung). Die Expression dieses Faktors wurde ebenfalls mittels Real-Time-PCR quantifiziert. Hier waren auf Grund fehlenden Probenmaterials nur zwei Testungen pro Gewebegebiet möglich.

GDF-5-mRNA war in kleineren Mengen sowohl in den Kontrollproben als auch im direkt vom Wundgrund gelähmter Patienten entnommenen Gewebe vorhanden. In den Hautproben unverletzten, jedoch gelähmten Gewebes war die Menge geringer.

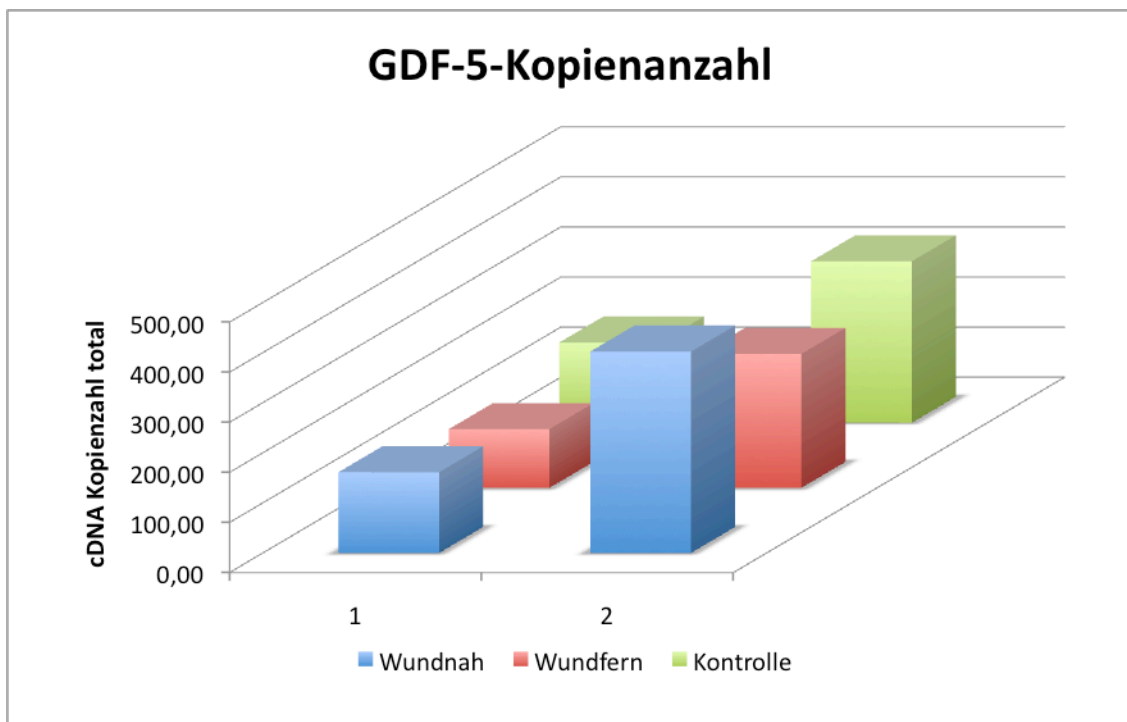


Abb. 17: Diagrammdarstellung GDF-5.

Das Diagramm stellt die Anzahl der GDF-5-cDNA-Kopien in μg Gesamt-RNA dar. Die Testung erfolgte in dem in Abb. 15 erläuterten Experiment.

Die Werte der wundnahen Gewebeproben und der Kontrollen waren ähnlich. Das bedeutet, dass keine erhöhte GDF-5-Konzentration vorlag. Ein erhöhtes regulatorisches Einwirken von GDF-5 auf TGF- β ist somit unwahrscheinlich.

5. Histologie

In weiteren Experimenten wurden histologische Färbungen von gelähmter Haut hergestellt. Diese dienten dem Nachweis von Fibrinogen bzw. Fibrin im Gewebe. Das Fibrinprotein ist der „Klebstoff“ der plasmatischen Blutgerinnung und somit im Blutplasma vorhanden. Tritt es im umliegenden Gewebe auf, ist das ein Beweis dafür, dass Plasma und Plasmakomponenten aus der Blutbahn heraus getreten sind. Dies kann zum Beispiel durch Ödeme geschehen sein.

Im Folgenden finden sich verschiedene Fotos von histologischen Färbungen. Dabei werden die Gewebeproben den Kontrollproben gegenübergestellt. Die Gewebeproben zeigten sowohl im Epithel als auch im tiefer liegenden Gewebe grün angefärbte Strukturen. Hierbei handelte es sich um Fibrin bzw. auch um Thrombozyten.

Das obere Bild der Abb. 18 zeigt die Färbung von Kontrollgewebe. Die Epithelschicht ist nur schlecht zu erkennen, jedoch lässt sich feststellen, dass im gesunden Gewebe keine wesentliche Fibrinfärbung auftritt. Im Gegensatz dazu ist im unteren Bild der Abb. 18 deutlich die eingefärbte Epithelschicht zu sehen, was auf das Vorhandensein von aus der Zirkulation ausgetretenem Fibrin schließen lässt.

In Abb. 19 werden tiefere Gewebeschichten dargestellt. Im oberen Bild, der Kontrolle, ist keine Färbung zu sehen. Im unteren Bild hingegen finden sich gefärbte Anteile. Die Fotos beider Abbildungen wurden mit den gleichen Spezifikationen der Kamera aufgenommen. Trotzdem stellen sich die Kontrollfärbungen dunkler dar. Es wurde auf eine nachträgliche Bearbeitung der Fotos verzichtet, um Fehlinformationen zu vermeiden.

Die Tatsache, dass in den Geweben eine fibrinspezifische Färbung stattgefunden hat, deutet darauf hin, dass sich Plasma und feste Blutbestandteile im Gewebe befanden. Das legt wiederum nahe, dass sich Blutplättchen im Gewebe befanden. Diese schütten bekanntermaßen TGF- β aus, welches die Wundheilung beeinflusst.

Normalerweise liegen extrazellulär ohne Gefäßverletzung kaum Fibrinogen bzw. Thrombozyten vor, deshalb sind die Kontrollen dunkel bzw. kaum gefärbt.

Die gelähmte Haut ist gefärbt. Zum einen punktuell, was auf das Vorliegen von Fibrinogen, assoziiert mit Thrombozyten, schließen lässt, da das Aussehen und die Größe passen. Zum anderen erfolgt eine diffuse Färbung. Das spricht für das Vorhandensein von Fibrinogen bzw. Fibrin im Bindegewebe.

Schlussendlich weist das auf extravaskuläre Plasmaproteine und Thrombozyten hin und erbringt den Beweis für vorhandene Ödeme.

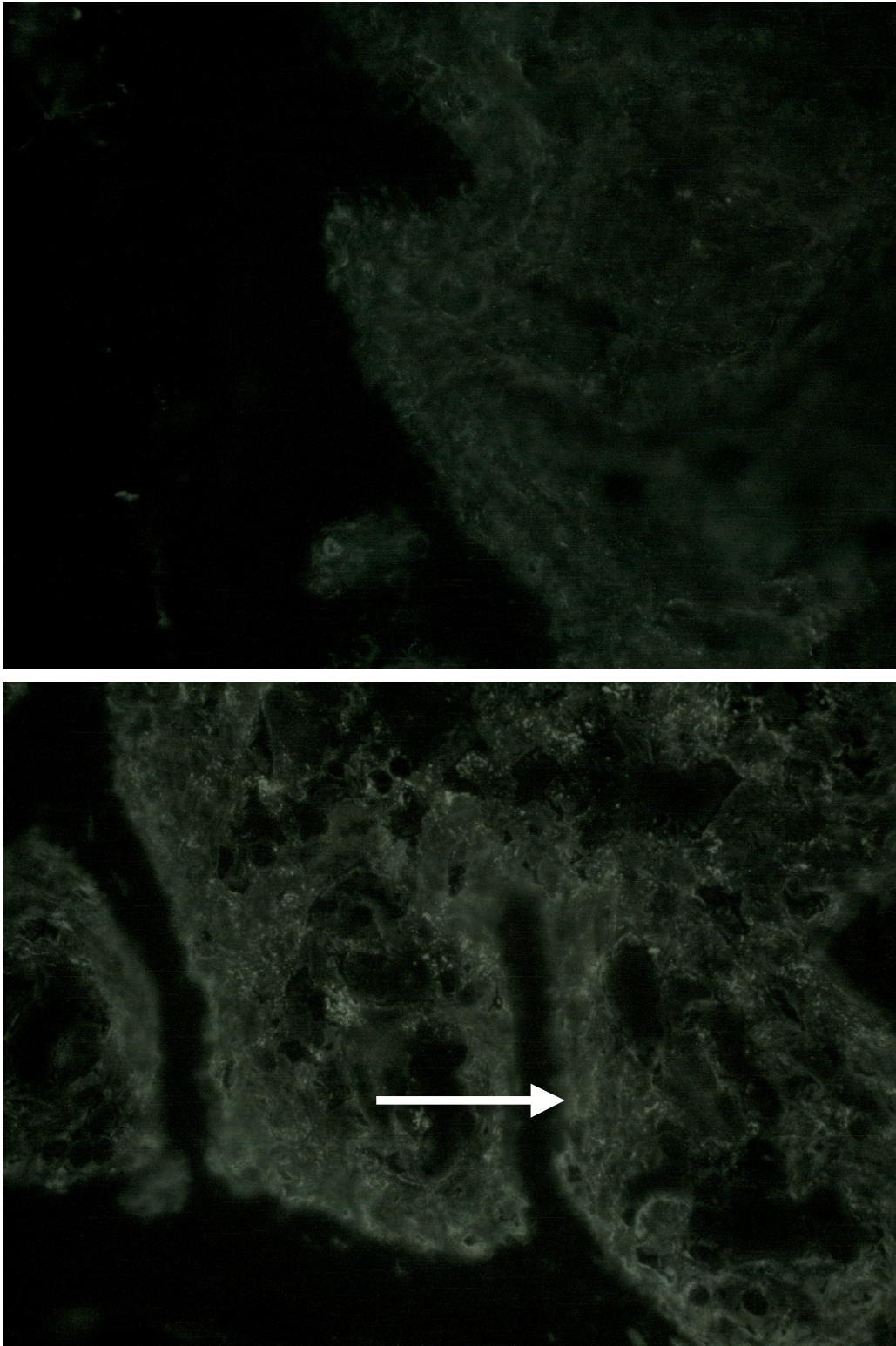


Abb. 18: Fibrinfärbungen – Ansicht des Epithels.

Oben: Kontrollfärbung. Es ist keine Epithelfärbung zu sehen.

Unten: Das gefärbte Fibrin im Epithel ist deutlich zu erkennen (Pfeil).

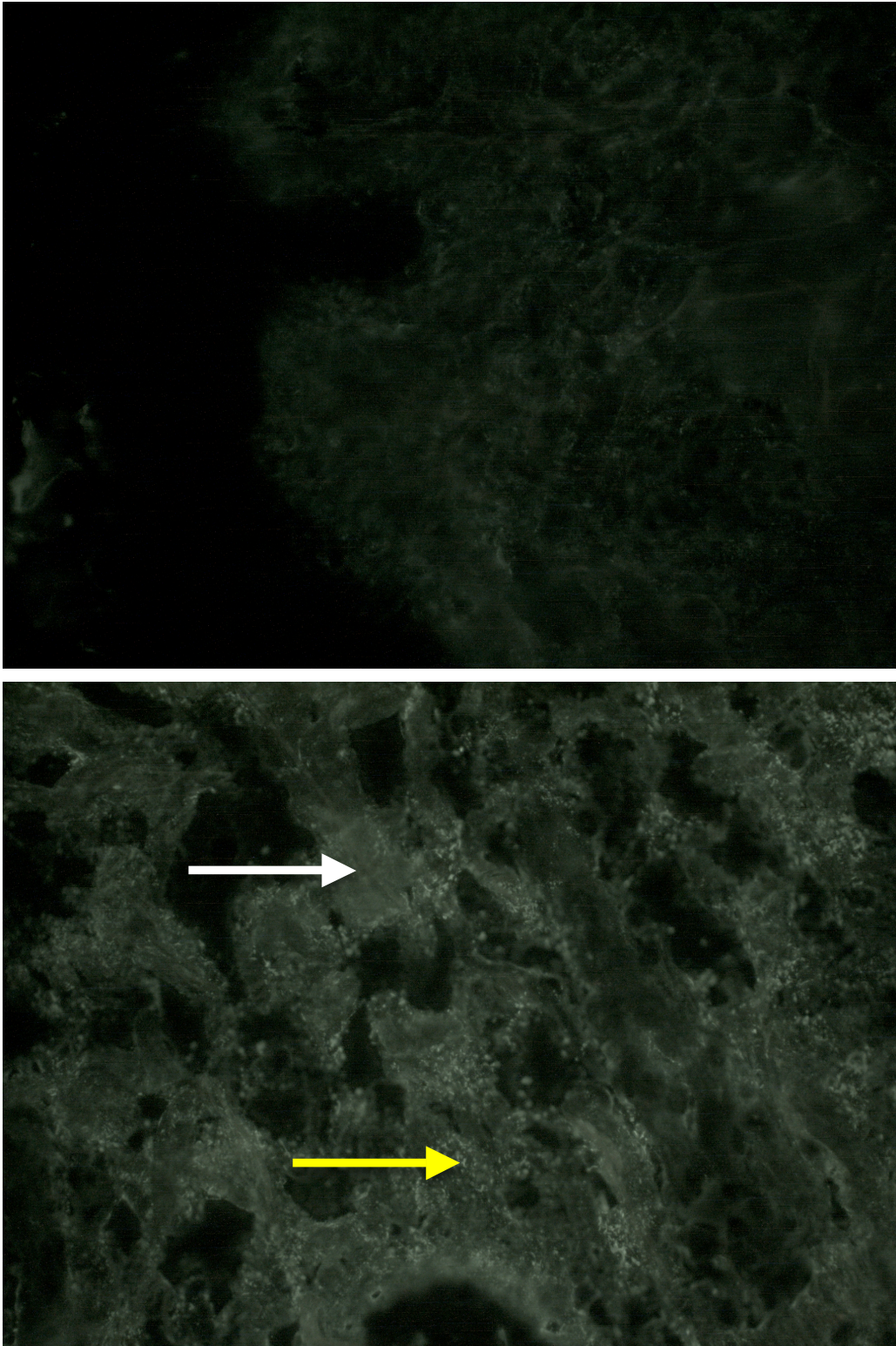


Abb. 19: Fibrinfärbung – Ansicht tieferen Gewebes.

Oben: Kontrollfärbung. Es sind keine angefärbten Bereiche zu erkennen.

Unten: Der gelbe Pfeil zeigt auf gefärbte Thrombozyten, der weiße auf diffus gefärbtes Matrixgewebe.

Diskussion

1. Problemfeld und Fragestellung

Die Wundheilung ist ein lebenswichtiger Prozess, der dafür Sorge trägt, dass es nach einer Verletzung zu Infektabwehr, Blutstillung und Wundverschluss kommt. Dadurch wird der Organismus am Leben erhalten. Die Heilung von Wunden kann in drei Phasen eingeteilt werden, die inflammatorische, die proliferative und die Differenzierungsphase. Diese Phasen überlappen sich, und die verschiedenen Stadien sorgen für die Blutstillung, die Migration von Entzündungszellen, die Reepithelisierung der Wunde und die endgültige Kontraktion und Zugfestigkeit der Wunde. Durch verschiedenste Prozesse werden unter anderem auch Wachstumsfaktoren sezerniert. Dazu gehören PDGF, TGF- β und auch Aktivin (Clark, 1996).

Etwas anders verläuft die fötale Wundheilung. Der Hauptunterschied liegt darin, dass fötale Wunden schnell und ohne Ausbildung einer Narbe abheilen, und die Heilung in einer warmen, sterilen und feuchten Umgebung stattfindet.

Gerät dieser komplexe und dynamische Prozess, der die Wiederherstellung der anatomischen Kontinuität und Funktion des Gewebes garantiert, aus dem Gleichgewicht, kommt es zu Wundheilungsstörungen. Darunter fallen überschießende Reaktionen wie hypertrophe Narben, Keloide, Strikturen und Verwachsungen. Kommt es zu einer unzureichenden Heilung, d. h. wird zu wenig neues Gewebe produziert, entstehen chronische Ulzera. Ebenso können Ulzera entstehen, wenn ein Teil der physiologischen Heilungskaskade gestört ist.

Gerade bei den Wundheilungsstörungen spielen Wachstumsfaktoren eine besondere Rolle. Die drei Isoformen von TGF- β haben dabei unterschiedliche Funktionen. TGF- β 1 und -2 vermitteln Narbenbildung und Fibrose, wohingegen TGF- β 3 die Narbenbildung eher hemmt. Während der

Wundheilung spielt TGF- β 1 außerdem eine große Rolle bei der Regulation der Reepithelisation, der Entzündungshemmung und der Regeneration des Bindegewebes.

Bei Experimenten mit der Haut von Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von TGF- β 1, im Vergleich zu gesunder Haut, in chronischen Wunden signifikant erhöht war (Häkkinen et al., 2004). Dies assoziierte mit einer herabgesetzten Reepithelisationsrate und einer herabgesetzten Kollagendeposition.

In anderen Studien wurde festgestellt, dass TGF- β 3, im passenden Verhältnis zu TGF- β 1, für eine harmonische Wundheilung sorgt und in gesunder wie heilender Haut gleichermaßen vorhanden ist. TGF- β 2 hingegen hemmt – dosisabhängig – im Gesamten eher die Wundheilung und kann bei übermäßiger Konzentration zu pathologischen Fibrosierungen führen (vgl. Matthis et al., 2006). Laut Schmid et al. (1993) ist in Druckgeschwüren humaner Haut TGF- β 3 die vorherrschende Isoform, TGF- β 1 kommt in geringerer Konzentration vor. Das könnte ebenfalls ein Grund für die Wundheilungsstörung sein.

Lokale Störfaktoren und Grunderkrankungen (z. B. Gefäßveränderungen, Infektionen, chronische, entzündliche Erkrankungen, hämatologische Grunderkrankungen) können die physiologische Wundheilung ebenfalls stören und so die Voraussetzungen für eine nicht heilende Wunde schaffen. Auch lassen sich im Exsudat normal heilender Wunden wachstumsfördernde Eigenschaften nachweisen. Unter anderem können dort TGF- β , TGF- α und der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) nachgewiesen werden. Anders verhält es sich bei der Wundflüssigkeit von schlecht heilenden Wunden. Die wachstumsfördernden Eigenschaften sind reduziert und die genannten Wachstumsfaktoren liegen vermindert vor oder sind biologisch inaktiviert (Smola et al., 2001). Die „Umwelt“-Bedingungen innerhalb des Druckgeschwürs sind insgesamt für die Heilung nicht förderlich, die Sauerstoffversorgung, die Menge der

Wachstumsfaktoren und der pH-Wert sind niedrig (Vande Berg et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollte das Vorhandensein molekularer Risikofaktoren für die Ausbildung von Druckgeschwüren bei Querschnittsgelähmten Patienten ermittelt werden.

2. Hypothese

Die Hypothese, die dieser Arbeit zugrunde liegt, ist, dass molekulare Risikofaktoren – in diesem Fall der Wachstumsfaktor TGF- β und einige seiner Aktivatoren – in die Entstehung chronischer Wunden bei Querschnittsgelähmten involviert sind und sie eine Voraussetzung für die Neigung von Querschnittsgelähmten zur Ausbildung ebensolcher Wunden darstellen.

2.1. Ausbildung von Druckgeschwüren bei Querschnittslähmung

Querschnittsgelähmte Patienten neigen zu Druckgeschwüren. Diese können sich an jeder Körperstelle entwickeln. Das größte Risiko besteht aber, wenn Druck senkrecht auf ein über einer konvexen Knochenstruktur liegendes Hautareal einwirkt. Über diesen Strukturen liegt wenig druckverteilendes Gewebe wie elastisches Muskelgewebe oder Unterhautfettgewebe. Klassische Prädilektionsstellen sind somit der Sakralbereich, die Fersen, die Sitzbeine, der Trochanter major und die seitlichen Fußknöchel. Liegen Patienten auf diesen Arealen des Körpers und können den physiologischen, warnenden Druckschmerz durch z. B. eine Querschnittslähmung nicht spüren und sich auf Grund der Lähmung nicht anders positionieren, bleibt die Komprimierung des Hautareals bestehen. Es kommt zu einer Minderdurchblutung, die zu einer Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte im Gewebe mit erhöhter Kapillarpermeabilität, Gefäßerweiterung, zellulärer Infiltration und Ödemen führt. Auch eine Störung des Lymphsystems ist die Folge (vgl. Bomnüter, 2005). In diesem Stadium kann es durch Druckentlastung der Körperstellen zu einer vollständigen Regeneration kommen. Bleibt der Druck jedoch bestehen, kommt es durch die sich weiter verstärkende Hypoxie zur Ischämie und

somit zum irreversiblen Absterben der Hautzellen mit Nekrosen und Geschwürbildung.

Die Querschnittslähmung der Patienten wirkt sich auch auf das sympathische Nervensystem aus. Der Sympathikus ist unter anderem auch für die Kontraktion der glatten Muskelzellen in Blutgefäßen verantwortlich (Deetjen und Speckmann, 1999). In Abhängigkeit vom Ausmaß der Lähmung verändert sich der Tonus der Gefäßmuskulatur. Das normalerweise zu Gunsten der Vasokonstriktion liegende Gleichgewicht verschiebt sich in Richtung Vasodilatation (Meiners, 2003). Dies spielt bei der Ausbildung von Ödemen, welche durch eine Permeabilitätssteigerung hervorgerufen werden, eine Rolle, da die fehlende Nervenstimulation zur Gefäßerweiterung beiträgt.

Auch Edsberg et al. (2000) zeigen, dass sich das Gewebe bei Druckgeschwüren mikrostrukturell und mikromechanisch von gesundem Gewebe unterscheidet. Das ulzerierte Gewebe ist wesentlich weniger dehnbar, die Gewebefasern reißen bei angelegter Zugspannung wesentlich schneller. Dies kann ebenfalls eine Ursache für den Übergang von festen Blutbestandteilen aus der Blutbahn in das Gewebe darstellen, wenn es durch die Ödeme zu einer Schwellung kommt.

2.2. Histologie

Um zu verifizieren, dass die Gefäßpermeabilität in gelähmter Haut erhöht ist, wurde der Plasmamarker Fibrinogen / Fibrin nachgewiesen. Im Gegensatz zu normaler Haut war in gelähmter Haut eine deutlich positive Reaktion nachweisbar. Fibrin / Fibrinogen war nicht nur in den unteren Schichten des Epithels, sondern auch mit der Dermis assoziiert. Dort lag es sowohl diffus fibrillär im Bindegewebe als auch in Partikeln lokalisiert vor, bei denen es sich wahrscheinlich um Thrombozyten handelte. Das legt nahe, dass sowohl Plasma als auch feste Blutkomponenten außerhalb der Blutbahn vorhanden sind. Thrombozyten, die extravaskulär vorkommen, sind durch den Thrombozytenaktivator Collagen-Typ-I aktiviert worden.

Aktiviert Thrombozyten wiederum aktivieren TGF- β (Blakytyn et al., 2004).

Es kann auf das Vorhandensein von TGF- β in der Haut geschlossen werden. Dies muss in weiteren histologischen Färbeexperimenten bestätigt werden. Frühere Experimente, die die Verteilungsmuster von TGF- β untersuchten, konnten zeigen, dass bei gesunder Haut TGF- β 1, -2 und -3 lediglich in Haarfollikeln der Epidermis vorhanden ist. Bei gesunder Dermis verhält es sich so, dass TGF- β 1 in keiner mesenchymalen Struktur vorkommt. TGF- β 2 und -3 fanden sich lokalisiert in den glatten Muskelzellen der durchführenden Arterien (Levine et al., 1993).

2.3. Die Rolle von TGF- β bei der Ausbildung von Druckgeschwüren

TGF- β kann die Freisetzung von „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) in Epithelzellen stimulieren. VEGF erhöht die Permeabilität von Mikrogefäßen und kann so die Entstehung von Ödemen positiv beeinflussen (Lee et al., 2002). Außerdem kann TGF- β direkt auf die Endothelschicht von Gefäßen einwirken und deren Durchlässigkeit erhöhen. So ist es möglich, dass Flüssigkeit, Serum und feste Blutbestandteile in das Interstitium gelangen (Goldberg et al., 2002).

Durch die erhöhte Gefäßpermeabilität aufgrund fehlender sympathischer Nervenaktivität bei Querschnittsgelähmten (Deetjen und Speckmann, 1999) und die Störung des Lymphabflusses kommt es zur Ausbildung von Ödemen. Das bringt einen Austritt von Plasma und festen Blutbestandteilen, z. B. Blutzellen, in das Gewebe mit sich. Durch diesen Mechanismus können verschiedene Wachstumsfaktoren und andere, normalerweise nur in den Blut- und Lymphbahnen vorkommende Zytokine und Enzyme direkt in das Gewebe gelangen. Denkbar ist somit auch, dass so ein Übermaß an Entzündungszellen das Gewebe erreicht. Diese Zellen werden von dem ebenfalls im Gewebe vorhandenen TGF- β , welcher von Thrombozyten sezerniert und aktiviert wird, die auf Grund des Ödems aus der Blutbahn austreten, zusätzlich dazu angeregt, in das Gewebe zu migrieren. Die inflammatorischen Zellen verrichten ihre Arbeit, gehen zugrunde und geben

die enthaltenen Proteasen frei. Dadurch kann es zu einer Reizung des Gewebes kommen, durch die dann eine zunächst innergewebliche Schädigung entsteht. Im Zusammenspiel mit TGF- β kann es dann zu einer Wundheilungsstörung und Exazerbation der Wunde kommen. So können die Wachstumsfaktoren die integrinvermittelte Adhäsion von Zellen der extrazellulären Matrix lösen (Sauer et al., 2004). Dadurch kann die Voraussetzung für die Entstehung einer chronischen Wunde geschaffen werden.

TGF- β -Aktivität findet sich bei gesunder Haut nicht außerhalb der Blut- und Lymphbahnen, so dass dem Übertritt der Plasmakomponenten und dem Vorhandensein von aktivem TGF- β außerhalb der Blut- und Lymphbahnen bei gelähmter Haut eine Rolle bei der Entstehung von Druckgeschwüren zufallen kann. Zumal durch die vorhandene Entzündungsreaktion die vaskuläre Schrankenfunktion beeinträchtigt ist (Fickenscher et al., 1991).

3. Ergebnisdiskussion

TGF- β wird als latente Vorstufe sezerniert. Dabei gelten Blutplättchen in der Wundheilung als primär-ausschüttende Zellen. Dadurch ergibt sich auch ein TGF- β -Reservoir, da die Blutplättchen im Fibringerinnsel massiv in der Wundregion vorhanden sind. Das latente TGF- β -Molekül kommt in zwei Proteinkomplexen vor, dem SLC und dem LLC. Bei dem SLC handelt es sich um die Verbindung des TGF- β -Dimers mit einem LAP-Molekül. Der LLC besteht aus einem SLC, welches zusätzlich mit einem LTBP verbunden ist. Damit der Wachstumsfaktor seine Aufgaben erfüllen kann, muss er aktiviert werden. Dabei kommen verschiedene Prozesse zur Anwendung. Diese spalten das LTBP / LAP ab. Dann liegt TGF- β als reines Dimer vor und ist aktiv. Eine Aktivierung kann durch enzymatische Aktivatoren, wie z. B. Plasmin, MMPs und furin-ähnliche Enzyme oder nicht-enzymatische Faktoren wie z. B. TSP-1, zustande kommen.

3.1. TGF- β -Aktivität

Es hat sich gezeigt, dass die TGF- β -Aktivität bei den Gewebeproben direkt aus der Wunde mit 30,5 pg / mm³ gegenüber der Aktivität gesunder, nicht gelähmter Haut mit 7,6 pg / mm³ nahezu vierfach erhöht ist. Dies korreliert auch mit Häkkinen et al., 2004. Dort wurde in chronischen Wunden bei Mäusen eine massiv erhöhte TGF- β 1 Konzentration entdeckt. Auffallend ist ebenfalls, dass die TGF- β -Aktivität in der gelähmten, aber unverletzten Haut mit 19,1 pg / mm³ im Vergleich zum Kontrollgewebe fast doppelt so hoch ist. Das lässt darauf schließen, dass in gelähmter Haut die TGF- β -Aktivierung fehlreguliert ist.

Dabei kann man davon ausgehen, dass die Fehlregulierung auch über die Aktivierungsmechanismen latenten TGF- β s zustande kommt. So liegt bei Druckgeschwüren eine überdurchschnittlich hohe Infiltration der Wunde mit neutrophilen Granulozyten vor, die eine chronische Entzündung hervorrufen. Die Neutrophilen sezernieren MMPs und schaffen ein saures Milieu, wenn sie zugrunde gehen (Diegelmann und Evans, 2004). Beide Eigenschaften sorgen für eine Aktivierung von TGF- β . Die ebenfalls in chronischen Wunden vorkommenden reaktiven Sauerstoffradikale – welche selbst auch schädigenden Einfluss auf die Wundheilung haben – können TGF- β aktivieren (Barcellos-Hoff et al., 1994).

Die Fehlregulierung könnte auf der erhöhten Expression von TGF- β -Typ-I und TGF- β -Typ-II-Rezeptoren beruhen, die als Mediatoren für die TGF- β -Aktivitäten in Wunden fungieren (Frank et al., 1996). Tesseur et al. haben in einer Studie 2006 gezeigt, dass der TGF- β -Typ-II-Rezeptor hauptsächlich von neuronalen Zellen exprimiert wird. Darüber kommt es zu einer verminderten TGF- β -Signalkaskade, was wiederum zu einer Neurodegeneration führt. Möglicherweise führt dieses Phänomen dazu, dass in gelähmter Haut mehr aktives TGF- β vorhanden ist, da nicht ausreichend Bindungsmöglichkeiten bestehen, aber weiterhin durch verschiedene Faktoren TGF- β aktiviert wird. TGF- β 1 ist zudem in der Lage, die eigene Exprimierung zu induzieren (O’Kane und Ferguson, 1997).

Dadurch könnte es fehlregulatorisch zu einer erhöhten Produktion innerhalb gelähmter Haut kommen.

Ein weiterer Aktivator von TGF- β ist Thrombospondin (TSP). TSP liegt mit TGF- β zusammen in den α -Granula der Blutplättchen (Schultz-Cherry et al., 1994). Für den Fall einer Lähmung – z. B. in Folge eines Unfalls – haben Chamak et al. (1994) gezeigt, dass Makrophagen und Mikrogliazellen, die ein Teil des Immunsystems sind, die primäre Quelle für TSP sind. Auch so ist eine erhöhte Aktivität von TGF- β in gelähmter Haut zu erklären. Die Regulation von TSP unterliegt unter anderem auch der Kontrolle von TGF- β 1 (McTigue et al., 2000). TGF- β 1 kann die Expression von TSP hochregulieren und sich somit quasi selbst aktivieren. Da Blutplättchen keinen Zellkern haben und somit zur Genexpression nicht fähig sind, muss die TSP-Aktivierung in anderen Zellen stattfinden.

Der in dieser Arbeit nachgewiesene TGF- β -Aktivator GPI-PLD hat ebenfalls ein erhöhtes Aktivierungspotential. GPI-PLD liegt in hoher Menge in gelähmter Haut vor, so dass eine Fehlregulation möglich ist.

3.2. Aktivitätsverteilung

Da bei den Experimenten der PAI/L Bioassay benutzt wurde, um die TGF- β -Aktivität darzustellen, und bei diesem Experiment ebenfalls TGF- β -ähnliche Signale von Aktivin-A erzeugt wurden, ist es notwendig, die Aktivitätsverteilung der beiden Faktoren zu ermitteln. Dazu wurden Gewebeproben unter Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen TGF- β 1, -2 und -3 bzw. Aktivin mittels des PAI/L Bioassays ausgewertet.

Bei den Experimenten ergab sich zum Teil bei der Zusammenrechnung der beiden Aktivitätsanteile ein Wert, der 100 % übersteigt. Die genaue Ursache ist unbekannt. Der Wert könnte auf eine eventuelle Kreuzreaktion der Antikörper hinweisen oder er könnte in der Streuung der Ergebnisse begründet sein. Außerdem blockieren die Antikörper das Signal nicht immer vollständig, so dass sich daraus eine Ungenauigkeit ergibt.

Die Schwankungen bei den gemessenen Restsignalen des gesamten TGF- β -ähnlichen Signals sind relativ stark und auf das jeweilige Probenmaterial

zurückzuführen. Es ist nicht bekannt, ob einige der Patienten, welche die Proben zur Verfügung gestellt haben, unter zusätzlichen Erkrankungen leiden, die einen Einfluss auf die Messungen ausüben. Um definitive Aussagen über den prozentualen Anteil von TGF- β bzw. Aktivin-A am Gesamtsignal machen zu können, wurden die durch den Antikörper blockierten Signalanteile bestimmt. Diese Werte entsprechen dem Anteil des jeweiligen Faktors, der durch die Antikörper blockiert wurde, in Prozent. Im Umkehrschluss ergibt dies somit im Median einen TGF- β -Anteil von 56,3 % bei den von der Wunde bzw. von 44,1 % bei den von unverletzter, gelähmter Haut genommenen Proben. Ebenso verhält es sich bei Aktivin-A. Da findet sich ein Anteil von 62,2 % bei den Wundgeweben und 46,7 % bei den normalen Proben gelähmter Haut. Über die Prozentwerte kann die absolute Konzentration von TGF- β bzw. Aktivin-A berechnet werden. Das Ergebnis zeigt, dass die Gesamtaktivität des TGF- β -ähnlichen Signals in den Wundrandgeweben bei 46,7 pg / mm³ und in unverletzter, gelähmter Haut bei 55,4 pg / mm³ liegt. Beide Faktoren spielen in der Wundheilung eine Rolle. Sie liegen etwa zu gleichen Teilen vor.

3.3. PCR-Screening-Ansatz zum Nachweis von TGF- β -Aktivatoren

TGF- β , der als latente Vorstufe vorliegt, wird durch verschiedene Faktoren aktiviert. Zu diesen Faktoren zählen GPI-PLD, PACE4 und GDF-5. Um zu ermitteln, ob diese Faktoren im untersuchten Gewebe vorhanden sind und für die erhöhte TGF- β -Aktivität in gelähmter Haut verantwortlich sein könnten, wurden diese mittels der Polymerasekettenreaktion nachgewiesen.

3.3.1. GPI-PLD

Zunächst wurde die GPI-PLD untersucht. Die eigentliche Aktivierung von latentem TGF- β erfolgt aber nicht über GPI-PLD, sondern über Plasmin. Die Aktivierung geht über den Umweg des Rezeptors für den Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPAR; Mazar, 2008). Dieser ist mittels eines GPI-

Ankers auf der Zelloberfläche verankert. Das Enzym GPI-PLD kann GPI-uPAR von der Zelloberfläche hydrolytisch spalten (Wilhelm et al., 1999). uPAR kann die uPA-katalysierte Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin – vor allem auch im Bindegewebe – beschleunigen und Plasmin aktiviert dann die latente TGF- β -Vorstufe. So könnte durch diesen Vorgang der Pool des SLC-TGF- β -Komplexes der Blutplättchen innerhalb des Fibringerinnsels der Wunde durch das Plasmin aktiviert werden. Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung des latenten TGF- β s basiert auf der Fähigkeit von Plasmin, den LLC-TGF- β -Komplex von der extrazellulären Matrix durch Abspaltung protease-sensitiver Regionen zu trennen. Der abgespaltene Komplex kann dann an die Zelloberfläche binden und dort aktiviert werden.

Die Pilotexperimente haben ergeben, dass die GPI-PLD-cDNA-Kopienanzahl im Vergleich zum Kontrollgewebe sowohl bei den aus dem Wundrand als auch bei den aus unverletzter Haut gelähmter Patienten entnommenen Gewebeproben erhöht war. Überraschenderweise war die Anzahl bei unverletzter, gelähmter Haut im Mittel am höchsten. Es ist deshalb möglich, dass GPI-PLD in erhöhtem Maße an der TGF- β -Aktivierung in gelähmter Haut beteiligt ist. Dies muss allerdings in weiteren Experimenten bestätigt werden, da die beobachteten Unterschiede statistisch noch nicht signifikant waren.

3.3.2. PACE4

Weitere TGF- β -aktivierende Faktoren sind furin-ähnliche Enzyme wie z. B. PACE4. Die Aktivierungsmechanismen sind jedoch bisher weitgehend unbekannt. Zwar zeigt sich, dass die PACE4-Expression in den wundnahen Gewebeproben deutlich erhöht ist, die Ursache dessen ist aber, dass lediglich bei einer der getesteten Proben ein deutlich höherer Wert gemessen wurde. Die Werte der Proben von Wundrandgewebe und unverletzter, gelähmter Haut sind, wenn sie um den einen herausragenden Wert bereinigt werden, alle im Bereich der Kontrollhautwerte. Es scheint daher unwahrscheinlich, dass PACE4 in den gelähmten Geweben in

relevanter Menge vorhanden ist und somit die erhöhte TGF- β -Aktivität erklären kann.

3.3.3. GDF-5

Der dritte getestete Faktor ist das regulatorische GDF-5. Bei diesem Experiment war nur noch sehr wenig Probenmaterial vorhanden, so dass auch in diesem Bereich, zusätzlich zu den hier durchgeführten Pilotexperimenten, weitere Nachweise erfolgen müssen. Die Anzahl der ermittelten cDNA-Kopien war in allen getesteten Gewebeproben ähnlich, so dass keine erhöhte GDF-5-Konzentration vorzuliegen scheint und ein erhöhtes regulatorisches Einwirken von GDF-5 auf TGF- β nicht zu erwarten ist.

Es müssen allerdings zur endgültigen Verifizierung weitere Färbungen, eventuell auch mit anderen Plasmamarkern, durchgeführt werden. Auf Grund mangelnden Probenmaterials war dies hier nicht möglich.

4. Klinische Relevanz

Um Dekubitalulzera generell zu verhindern, gilt es die Druckwirkung auf die Prädilektionsstellen auszuschalten. Dies kann durch regelmäßiges Umlagern bzw. das Weichlagern der Patienten geschehen. Als risikoärmste Lagerung gilt dabei die 30°-Schräglagerung, abwechselnd rechts und links. Spezielle Matratzen ermöglichen eine weiche Lagerung der Patienten. Der Auflagedruck des Körpers wird flächig verteilt. Ist bereits ein Dekubitus entstanden, muss eine konsequente Behandlung erfolgen. Dazu müssen der Schweregrad der Ulzeration, der physische und psychische Zustand des Patienten sowie die Bedingungen der Pflege durch das Patientenumfeld begutachtet werden. Die folgende Behandlung stützt sich dabei auf drei Säulen: zunächst auf die vollständige Druckentlastung des geschädigten Hautgebietes ohne andere Körperstellen dadurch zu überlasten, dann auf eine phasengerechte Wundbehandlung zur Reinigung und Konditionierung des Ulkus durch sorgfältiges chirurgisches Debridement und die Verwendung hydroaktiver Wundauflagen. Die dritte Säule besteht aus

begleitenden Therapien zur Verbesserung des Allgemeinzustandes (Pflegedienst, Heft 16, Juli 1999).

Ein anderes Behandlungskonzept, welches im Schweizer Paraplektiker-Zentrum des Universitätsspitals Basel angewandt wird, besteht aus sechs Behandlungsprinzipien: der Druckentlastung, einem frühzeitigen operativem Debridement mit antibiotischer Folgetherapie, Wundkonditionierung mittels Feuchtverbänden, Verbesserung des Allgemeinzustandes des Patienten, Risikofakturoptimierung zur Vorbereitung einer definitiven plastischen Deckung sowie ein konsequentes Entlastungs- bzw. Mobilisierungskonzept (Wundforum, Heft 4, 2008).

Durch die vorliegende Arbeit können eventuell zusätzliche Behandlungsmöglichkeiten bzw. Präventionsmaßnahmen entwickelt werden, die auf einem molekularen Ansatz basieren, und die erhöhte TGF- β -Aktivität in gelähmter Haut, welche eine Veranlagung zur Ausbildung von Dekubitus darstellt, reduzieren. Dieser Ansatz könnte ein präventiver sein oder bei bestehendem Dekubitus eine schnellere Heilung ermöglichen. So ist vorstellbar, dass man direkt in das molekulare Gefüge eingreift oder topische Möglichkeiten findet.

Eine Herangehensweise könnte die direkte Hemmung von TGF- β sein. Dies kann über verschiedene Medikamente geschehen, die sich derzeit noch in der Entwicklung befinden. Die Versuchsreihen testen dabei z. B. monoklonale Antikörper gegen TGF- β und TGF- β -Rezeptor-Konstrukte, welche eine Bindung verhindern oder direkt den ALK5 (activin receptor like kinase 5) Rezeptor beeinflussen (Prud'homme, 2007). Auch werden sich auf Nukleinsäuren stützende Therapien, die auf antisense-Oligodesoxyribonukleotiden, Ribozymen (katalytisch aktive RNA-Moleküle) oder siRNA (small inhibitory RNA) basieren und direkt den Zusammenbau von TGF- β verhindern, getestet.

Eine weitere denkbare Einflussmöglichkeit ist die Regulierung von TGF- β -Aktivatoren wie z. B. GPI-PLD, TSP oder GDF-5. Die Beeinflussung der

genannten Faktoren könnte auch auf genetischem Wege durchgeführt werden, indem z. B. die Genexpression für mögliche TGF- β -Aktivatoren (PACE4, GPI-PLD) blockiert wird.

Ein weiteres Molekül, dessen Beeinflussung zu einer Inhibierung der TGF- β -Aktivität führen kann, ist das Mannose-6-Phosphat (M6P) am LAP (Rhatt et al., 2008). Um eine Wirkung zu erreichen, müsste die Bindung des M6P mit den Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren an Zelloberflächen verhindert werden. Somit wäre es nicht mehr möglich, die zur Aktivierung notwendige Abspaltung des TGF- β -Moleküls vom LAP zu erreichen.

Ebenso könnte man mit direkten TGF- β -Antagonisten arbeiten. Huang et al. (2002) haben gezeigt, dass es möglich ist, mit einem PEP-Antagonisten (Post-Expositions-Prophylaxe) die Wundheilung zum Positiven zu beeinflussen. Im Umkehrschluss ist es eventuell möglich, einen Antagonisten zu entwickeln, der die TGF- β -Aktivierung zu großen Teilen oder sogar vollständig hemmt.

Um die Umsetzung solcher Eingriffe zu ermöglichen, müssen aber weitere Studien und Versuche unternommen und Techniken verbessert bzw. entwickelt werden.

Solche Eingriffe bergen aber auch ein Risiko, da TGF- β nicht nur schädigende Einflüsse, sondern auch positive Eigenschaften für die Wundheilung hat. Darüber hinaus könnte als Langzeitnebenwirkung z. B. ein Tumor entstehen, da durch die Deaktivierung von TGF- β auch dessen tumorsuppressive Eigenschaften fehlen. Zudem kommen über die Inhibierung von Rezeptoren andere lebenswichtige Signalwege nicht zustande. Auch sind Gentherapien derzeit noch nicht in dem Maße umsetzbar, wie es erforderlich wäre, um eine gezielte Ausschaltung zu erreichen.

Es wurden auch bereits Experimente mit Hautkulturen durchgeführt. Aus den Hautkulturen wurden größere Hautstücke gewonnen, die dann auf die chronische Wunde gelegt wurden. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass der von Fibroblasten sezernierte Anteil von TGF- β durch die

Anwesenheit von Keratinozyten und deren parakrine Stoffwechselprozesse in den Hautkulturen drastisch reduziert wurde (Le Poole und Boyce, 1999). Dieser Therapieansatz ist nicht präventiv, kann aber durchaus eine Möglichkeit der TGF- β -Aktivitätsreduzierung sein, indem die Menge an vorhandenem Substrat reduziert wird.

5. Fazit

In dieser Arbeit ging es darum, die molekularen Risiken für Dekubitus bei Querschnittsgelähmten in Teilen zu untersuchen. Das Hauptaugenmerk fiel auf den Wachstumsfaktor TGF- β und sein Vorkommen in gelähmter Haut.

Die Hypothese ist, dass es durch die fehlende Nervenaktivität der Haut zur Ausbildung von Ödemen und durch die dadurch bedingte Permeabilitätssteigerung zu einem Austritt von festen Blutbestandteilen kommt, so dass sich TGF- β -Aktivität auch in der Haut findet. Der als latente Vorstufe vorliegende Faktor wird über ausgetretene Thrombozyten aktiviert.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei Druckgeschwüren querschnittsgelähmter Patienten TGF- β eine entscheidende Rolle spielt. So ist die TGF- β -Aktivität in gelähmter Haut durchweg höher als in Kontrollproben gesunder, nicht gelähmter Haut. Die Aktivität in nicht verwundeter gelähmter Haut ist bereits mehr als doppelt so hoch wie in nicht gelähmter Haut. Bestimmt man dann die TGF- β -Aktivität gelähmter, verwundeter Haut, so ist die Aktivität des Faktors im Vergleich zu gesunder Haut nahezu viermal so hoch. Dieser Umstand legt nahe, dass durch die hohe Aktivität des Faktors eine Veranlagung zur Ausbildung von Druckgeschwüren gegeben ist.

In der Klinik kann dies zu veränderten Therapien führen, indem TGF- β selbst bzw. die TGF- β -Aktivität blockiert oder gehemmt wird. Dies kann durch ein Eingreifen in das molekulare Gefüge, das heißt z. B. durch ein Einwirken auf die TGF- β -aktivierenden Substanzen oder die TGF- β -

Rezeptoren, geschehen. Diese Substanzen könnten mittels Gentherapie zur Reduzierung der TGF- β -Aktivität führen. Denkbar sind auch Medikamente, die Antagonisten oder stärker bindende Liganden zur Verfügung stellen, welche eine Aktivierung verhindern.

Literaturverzeichnis

1. Abe, M., Harpel, J. G., Metz, C. N., Nunes, I., Loskutoff, D. J., Rifkin, D. B. (1994): An Assay for Transforming Growth Factor- β Using Cells Transfected with a Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promoter-Luciferase Construct. *Anal Biochem* **216**;276-284.
2. Abe, M., Oda, N. und Sato, Y. (1998): Cell associated activation of latent transforming growth factor- β by calpain. *J Cell Physiol* **174**;186-193.
3. Adzick, N. S. und Longaker, M. T. (1992): Fetal Wound Healing. Elsevier Scientific Press, New York.
4. Adzick, N. S. und Longaker, M. T. (1991): Scarless wound healing in the fetus: the role of extracellular matrix. *Prog Clin Biol Res* **365**;177-192.
5. Antonelli-Orlidge, A., Saunders, K. B., Smith, S. R. und D'Amore, P. A. (1989): An activated form of transforming growth factor β is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**;4544-4548.
6. Applied Biosystems Inc.: TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping Assays for Basic and Clinical Research,
Abrufbar unter: <http://www.biopharm.de/d/page.php?pageID=1>
(Abrufdatum: 26.07.2009).
7. Arnason, B. G. W. (2000): Immunology and the autonomic nervous system. In: Appenzeller (Ed.) Handbook of Clinical Neurology. Elsevier Science, Amsterdam Vol. **75 (31)**; 551-566.
8. Babu, M., Diegelmann, R. F. und Olivier, N. (1992): Keloid fibroblasts exhibit an altered response to TGF- β . *J Invest Dermatol* **99**;650-655.
9. Baisch, A. und Riedel, F. (2006): Hyperplastische Narben und Keloide – Teil 1: Grundlagen und Prävention. *HNO* **54**;893-905.
10. Barcellos-Hoff, M. H., Derynck, R., Tsang, M. L. und Weatherbee, J. A. (1994): Transforming Growth Factor- β Activation in Irradiated Murine Mammary Gland. *J Clin Invest* **93**;892-899.

11. Barrandon, Y. und Green, H. (1987): Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: The roles of transforming growth factor- α and epidermal growth factor. *Biochem Biophys Res Comm* **126**;358-364.
12. Bendy, R. H. Jr, Nuccio, P. A., Wolfe, E., Collins, B., Tamburro, C., Glass, W. und Martin, C. M. (1964): Relationship of quantitative wound bacterial counts to healing of decubiti: effect of topical gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* **10**;147-155.
13. Biopharm AG: Wachstums- und Differenzierungsfaktor GDF-5,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042072.pdf,
Link „Wachstums- und Differenzierungsfaktor rhGDF-5“,
(Abrufdatum: 22.07.2009).
14. Blakytyn, R., Ludlow, A., Martin, G. E. M., Ireland, G., Lund, L. R., Ferguson, M. W. J., Brunner, G. (2004): Latent TGF- β 1 Activation by Platelets. *J Cell Pathol* **199**;67-76.
15. Bomnüter, G. (2005): Der Einfluss des Faktor XIII auf die Wundheilung nach operativer Behandlung von Druckgeschwüren bei querschnittgelähmten Patienten. Lübeck, Univ., Dissertation.
16. Brachmann, R., Lindquist, P. B., Nagashima, M., Kohr, W., Lipari, T., Napier, M. und Derynck, R. (1989): Transmembrane TGF- α precursors activate EGF/TGF- α receptors. *Cell* **56**;691-700.
17. Brown, P. D., Wakefield, L. M., Levinson, A. D. und Sporn, M. B. (1990): Physiochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2 and 3. *Growth Factors* **3**;35-43.
18. Brunner, G. und Blakytyn, R. (2004): Extracellular regulation of TGF- β activity in wound repair: Growth factor latency as a sensor mechanism for injury. *Thromb Haemost* **92**;253-61.
19. Chamak, B., Morandi, V. und Mallat, M. (1994): Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J Neurosci Res* **38**;221-233.

20. Clark, R. A. F. (1996): Wound repair: Overview and general considerations. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (Second Edition), Clark R. A. F. (Ed.). Plenum Press, New York;3–50.
21. Clark, R. A. F., Lanigan, J. M., DellaPelle, P., Manseau, E., Dvorak, H. F. und Colvin, R. B. (1982): Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* **79**;264-269.
22. Clark, R. A. F., Nielsen, L. D., Welch, M. P. und McPherson, J. M. (1995): Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF- β . *J Cell Sci* **108**;1251-1261.
23. Coffey, R. L., Derynck, R., Wilcox, J. N., Bringman, T. S., Goustin, A. S., Moses, H. L. und Pittelkow, M. R. (1987): Production and auto-induction of transforming growth factor- α in human keratinocytes. *Nature* **328**;817-820.
24. Compton, C. C., Gill J. M., Bradford, D. A., Regauer, S., Galico, G. G. und O'Connor, N. E. (1989): Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscope and immunohistochemical study. *Lab Invest* **60**;600-612.
25. D'Angelo, M., Billings, P. C., Pacifi, M., Leboy, P. S. und Kirsch, T. (2001): Authentic Matrix Vesicles Contain Active Metalloproteases (MMP). *J Biol Chem* **276**;11347-11353.
26. Daltrey, D. C., Rhodes, B. und Chattwood, J. G. (1981): Investigation into the microbial flora of healing and non-healing decubitus ulcers. *J Clin Pathol* **34**;701-705.
27. Deetjen, P. und Speckmann, E.-J. (1999): Physiologie. Urban & Fischer Verlag, München, 3. Auflage.
28. Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Bell, J. R., Assoian, R. K., Roberts, A. B., Sporn, M. B. und Goeddel, D. V. (1985): Human transforming growth factor- β complementary DNA Sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316**;701-705.

29. Diegelmann, R. F. und Evans, M. C. (2004): Wound Healing: an Overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* **9**;283-289.
30. Diegelmann, R. F., Cohen, I. K. und McCoy, B. J. (1979): Growth kinetics and collagen synthesis of normal skin, normal scar and keloid fibrosis in vitro. *J Cell Physiol* **98**;341-346.
31. Durham, L. A., Krummel, T. M., Cawthorn, J. W., Thomas, B. L. und Diegelmann, R. F. (1989): Analysis of transforming growth factor beta receptor binding in embryonic, fetal and adult rabbit fibroblasts. *J Pediatr Surg* **24**;784-788.
32. Edsberg L. E., Cutway, R., Anain, S. und Natiella, J. R. (2000): Microstructural and mechanical characterization of human tissue at and adjacent to pressure ulcers. *J Rehabil Res Dev* **37**;463-472.
33. Fickenscher K., Aab A. und Stüber W. (1991): A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost* **65**;535-540.
34. Flaumenhaft, R. und Rifkin, D. B. (1992): Cell density dependent effects of TGF-beta demonstrated by a plasminogen activator-based assay for TGF-beta. *J Cell Physiol* **152**;48-55.
35. Frank, S., Madlener, M. und Werner, S. (1996): Transforming Growth Factors β 1, β 2 and β 3 and Their Receptors Are Differentially Regulated during Normal and Impaired Wound Healing. *J Biol Chem* **271**;10188-10193.
36. Gabbiani, G., Chaponier, C. und Huttner, I. (1978): Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *J Cell Biol* **76**;561-568.
37. Gentry, L. E. und Nash, B. W. (1990): The Pro Domain of Pre-Pro-Transforming Growth Factor β 1 When Independently Expressed Is a Functional Binding Protein for the Mature Growth Factor. *Biochemistry* **29**;6851-6857.
38. Goldberg, P. L., MacNaughton, D. E., Clements, R. T., Minnear, F. L. und Vincent, P. A. (2002): p38 MAPK activation by TGF- β 1 increases MLC phosphorylation and endothelial monolayer permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**;L146-L154.

39. Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L. und Neufeld, G. (1987): Structural Characterization and Biological Functions of Fibroblast Growth Factor. *Endocr Rev* **8**;95-114.
40. Gray, A. M. und Mason, A. J. (1990): Requirement for activin A and transforming growth factor- β pro-regions in homodimer assembly. *Science* **247**;1328-1330.
41. Grohndal-Hansen, J., Lind, L. R., Ralfkiaer, E., Ottevanger, V. und Dano, K. (1988): Urokinase- and tissue-type plasminogen activators in keratinocytes during wound reepithelialization in vivo. *J Invest Dermatol* **90**;790-795.
42. Häkkinen, L., Koivisto, L., Gardner, H., Saarialho-Kere, U., Carroll, J. M., Lakso, M., Rauvala, H., Laato, M., Heino, J. und Larjava, H. (2004): Increased Expression of β 6-Integrin in Skin Leads to Spontaneous Development of Chronic Wounds. *AJP* **164**;229-242.
43. Harpel, J. G., Metz, C. N., Kojima, S. und Rifkin, D. B. (1992): Control of transforming growth factor beta activity: latency vs. activation. *Prog Growth Factor Res* **4**;321-335.
44. Hebda, P. A. (1988): Stimulatory Effects of Transforming Growth Factor-beta and Epidermal Growth Factor on Epidermal Cell Outgrowth from Porcine Skin Explant Cultures. *J Invest Dermatol* **91**;440-445.
45. Heimark, R. L. und Schwartz, S. M. (1996): The role of cell-cell interaction in the regulation of endothelial cell growth (1988). In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair (Second Edition)*, Clark, R. A. F. (Ed.), Plenum Press, New York;3-50.
46. Higashiyama, S., Abraham, J. A., Miller, J., Fiddes, J. C. und Klagsbrun, M. (1991): A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* **251**;936-939.
47. Huang, J. S., Wang, Y.-H, Ling, T.-Y., Chuang, S.-S., Johnson, F. E. und Huang, S. S. (2002): Synthetic TGF- β antagonist accelerates wound healing and reduces scarring. *FASEB J* **16**;1269-1270.

48. Hübner, G., Qianjin, H., Smola, H. und Werner, S. (1996): Strong Induction of Activin Expression after Injury Suggests an Important Role of Activin in Wound Repair. *Dev Biol* **173**;490-498.
49. Hunt, T. K. (1980): Wound healing and wound infection: Theory and Surgical Practice. Appleton-Century-Crofts, New York.
50. Jichici, D. und Frank, J. (2000): Spinal cord disease, trauma and autonomic nervous system dysfunction. In: Appenzeller (Ed.) Handbook of Clinical Neurology. Elsevier Science, Amsterdam Vol. **75 (31)**; 581.
51. Kane, C. J. M., Hebda, P. A., Mansbridge, J. N. und Hanawalt, P. C. (1991): Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor- β 1 expression during cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* **148**;157-173.
52. Kiritsy, C. P. und Lynch, S. E. (1993): Role of Growth Factors in Cutaneous Wound Healing: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med* **4**;729-760.
53. Kojima, S. und Rifkin, D. B. (1993): Mechanism of retinoid-induced activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells. *J Cell Physiol* **155**;323-332.
54. Kojima, S., Nara, K. und Rifkin, D. B. (1993): Requirement for Transglutaminase in the Activation of Latent Transforming Growth Factor- β in Bovine Endothelial Cells. *J Cell Biol* **121**;439-448.
55. Kovacina, K. S., Steele-Perkins, G., Purchio, A. F., Lioubin, M., Miyazono, K., Heldin, C. H. und Roth, R. A. (1989): Interactions of recombinant and platelet transforming growth factor- β precursor with the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *Biochem Biophys Res Comm* **160**;393-403.
56. Krawczyk, W. S. und Wilgram, G. F. (1973): Hemidesmosome and desmosome morphogenesis during epidermal wound healing. *J Ultrastruct Res* **45**;93-101.
57. Krawczyk, W. S. (1971): A pattern of epidermal cell migration during wound healing. *J Cell Biol* **49**;247-263.

58. Kurkinen, M., Vaheri, A., Roberts, P. J. und Stenman, S. (1980): Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest* **43**;47-51.
59. Lee, Y. C. G., Melkerneker, D., Thompson, P. J., Light, R. W. und Lane, K. B. (2002): Transforming Growth Factor β Induces Vascular Endothelial Growth Factor Elaboration from Pleural Mesothelial Cells in vivo and in vitro. *Am J Resp Crit Care Med* **165**;88-94.
60. Leibovich, S. J. und Ross, R. (1975): The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *AJP* **78**;71-100.
61. Levine, J. H., Moses, H. L., Gold, L. I. und Nanney, L. B. (1993): Spatial and Temporal Patterns of Immunoreactiv Transforming Growth Factor β 1, β 2 and β 3 during Excisional Wound Repair. *AJP* **143**;368-380.
62. Loskutoff, D. J. und Samad, F. (1998): The Adipocyte and Hemostatic Balance in Obesity: Studies of PAI-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**;1-6.
63. Lyons, R. M., Keski-Oja, J. und Moses, H. L. (1988): Proteolytic Activation of Latent Transforming Growth Factor- β from Fibroblast-conditioned Medium. *J Cell Biol* **106**;1659-1665.
64. Mansbridge, J. N. und Knapp, A. M. (1987): Changes in Keratinocyte Maturation During Wound Healing. *J Invest Dermatol* **89**;253-263.
65. Martin, G. E. M. (2002): Regulation of transforming growth factor- β family members in wound repair. University of Manchester School of Biological Sciences Division of Immunology, Microbiology and Development.
66. Matthis, O., Paridon-Edauw, D. und Winkel, D. (2006): Manuelle Therapie der peripheren Gelenke Bd. 3. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München.
67. Mazar, A. P. (2008): Urokinase Plasminogen Activator Receptor Choreographs Multiple Ligand Interactions: Implications for Tumor Progression and Therapy. *Clin Cancer Res* 2008, **14**;5649-5655.

68. McCallion R. L. und Ferguson, M. W. J. (1996): Fetal Wound Healing and the Development of Antiscarring Therapies for Adult Wound Healing. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (2nd Edition). Clark, R. A. F. (Ed.), Plenum Press, New York;561-600.
69. McTigue, D. M., Popovich, P. G., Morgan, T. E. und Stokes, B. T. (2000): Localisation of Transforming Growth Factor- β 1 and Receptor mRNA after Experimental Spinal Cord Injury. *Exp Neurol* **163**;220-230.
70. Meiners, T. (2003): Kapazitive Druckverteilungsmessungen bei Decubitalulcera. Habilitationsschrift, Westfälische-Wilhelms-Universität Münster.
71. Miller, D. M., Ogawa, Y., Iwata, K. K., ten Dijke, P., Purchio, A. F., Soloff, M. S. und Gentry, L. E. (1992): Characterization of the binding of transforming growth factor- β 1, - β 2 and - β 3 to recombinant β 1-latency associated peptide. *Mol Endocrinol* **6**;694-702.
72. Morgan, J. E. (1975): Topical therapy of pressure ulcers. *Surg Gynecol Obstet* **141**(6);945-947.
73. Moshell, A. N. (1993): Chronic Wounds: Pathophysiologic and Experimental Considerations. *J Invest Dermatol* **100**;721-725.
74. O'keefe, E. J., Chiu, M. L. und Payne, R. E. Jr. (1988): Stimulation of Growth of Keratinocytes by Basic Fibroblast Growth Factor. *J Invest Dermatol* **90**;767-769.
75. O'Kane, S. und Ferguson, M. W. J. (1997): Transforming Growth Factor β s and Wound Healing. *Int J Biochem Cell Biol* **29**(1);63-78.
76. Odland, G. und Ross, R. (1968): Human Wound Repair: I. Epidermal Regeneration. *J Cell Biol* **39**;135-151.
77. Oursler, M. J., Riggs, B. L. und Spelsberg, T. C. (1993): Glucocorticoid-induced activation of latent transforming growth factor-beta by normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology* **133**;2187-2196.

78. Paul Hartmann AG (1999): Das Problem Dekubitus gemeinsam lösen. *Pflegedienst*, Heft 16,
Abrufbar unter:
http://www.hartmanngroup.info/images/PflegeDienst_1999_16.pdf
(Abrufdatum: 23.07.2009).
79. Paul Hartmann AG (2008): Dekubitus: Pathogenese, Prophylaxe und
Behandlung. *Wundforum*, Heft 4,
Abrufbar unter:
http://www.hartmanngruppe.info/images/WundForum_2008_4.pdf
(Abrufdatum: 23.07.2009).
80. Pfaffl, M. W. (2004): Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA
Quantifizierung. *BIOspektrum* 1/04 - **10**;92-95.
81. Poole, I. C. Le und Boyce, S. T. (1999): Keratinocytes suppress
transforming growth factor- β 1 expression by fibroblasts in cultured skin
substitutes. *Brit J Derm* **140**;409-416.
82. Prud'homme, G. J. (2007): Pathobiology of transforming growth factor β in
cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic
considerations. *Lab Invest* **87**;1077-1091.
83. Purchio, A. F., Cooper, J. A., Brunner, A. M., Lioubin, M. N., Gentry, L. E.,
Kovacina, K. S., Roth, R. A. und Marquardt, H. (1988): Identification of
mannose 6-phosphate in two asparagine-linked sugar chains of
recombinant transforming growth factor-beta 1 precursor. *J Biol Chem*
263;14211-14215.
84. Reed, M. J., Iruela-Arispe, L., O'Brien, E. R., Truong, T., LaBell, T., Bornstein,
P. und Sage, E. H. (1995): Expression of thrombospondins by endothelial
cells. Injury is correlated with TSP-1. *AJP* **147**;1068-1080.
85. Rhett, J. M., Ghatnekar, G. S., Palatinus, J. A., O'Quinn, M., Yost, M. J. und
Gourdie, R. G. (2008): Novel therapies for scar reduction and
regenerative healing of skin wounds. *Trends in Biotechnology* **26(4)**;173-
180.

86. Riley, P. A. (1994): Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* **65**;27-33.
87. Roberts, A. B. und Sporn, M. B. (1990): The transforming growth factor β 's. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Peptide Growth Factors and their Receptors/Contributors. Springer Verlag, New York;419-472.
88. Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K., Smith, J. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., Heine, U. I., Liotta, L. A., Falanga, V., Kehrl, J. H. und Fauci, A. S. (1986): Transforming growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis an angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**;4167-4171.
89. Sauer, B., Vogler, R. und Kleuser, B. (2004): Wundheilung durch thrombozytäre Wachstumsfaktoren. *PZ* **149**;26-32.
90. Schmid, P., Cox, D., Bilbe, G., McMaster, G., Morrison, C., Stähelin, H., Lüscher, N. und Seiler, W. (1993): TGF- β s and TGF- β type II receptor in human epidermis: differential expression in acute and chronic skin wounds. *J Pathol* **171**;191-197.
91. Schultz-Cherry, S. und Murphy-Ullrich, J. E. (1993): Thrombospondin Causes Activation of Latent Transforming Growth Factor- β secreted by Endothelial Cells by a Novel Mechanism. *J Cell Biol* **122**;923-932.
92. Schultz-Cherry, S., Lawler, J. und Murphy-Ullrich, J. E. (1994): The Type 1 Repeats of Thrombospondin 1 Activate Latent Transforming Growth Factor- β . *J Biol Chem* **269**;26783-26788.
93. Shipley, G. D., Pittelkow, M. R., Wille, J. J. Jr, Scott, R. E. und Moses, H. L. (1986): Reversible Inhibition of Normal Human Prokeratinocyte Proliferation by Type β Transforming Growth Factor-Growth Inhibitor in Serum-free Medium. *Cancer Res* **46**;2068-2071.
94. Smola, H., Eming, S. A., Hess, S., Werner, S. und Krieg, T. (2001): Wundheilung und Wundheilungsstörungen: Moderne Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie. *Dtsch Ärztebl* **98(43)**;A-2802/B-2387/C-2235.

95. Somasundaram, K. und Prathrap, K. (1972): The effect of exclusion of amniotic fluid on intra-uterine healing of skin wounds in rabbit fetuses. *J Pathol* **107**;127-130.
96. Sporn, M. B., Roberts, A. B., Shull, J. H., Smith, J. M., Ward, J. M. und Sodek, J. (1983): Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science* **219**;1329-1311.
97. Taipale, J. und Keski-Oja, J. (1997): Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* **11**;51-59.
98. Taipale, J., Miyazono, K., Heldin, C. H. und Keski-Oja, J. (1994): Latent Transforming Growth Factor- β 1 Associates to Fibroblast Extracellular Matrix via Latent TGF- β Binding Protein. *J Cell Biol* **124**;171-181.
99. Tesseur, I., Zou, K., Esposito, L., Bard, F., Berber, E., Van Can, J., Lin, A. H., Crews, L., Tremblay, P., Mathews, P., Mucke, L., Masliah, E. und Wyss-Coray, T. (2006): Deficiency in neuronal TGF- β signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. *J Clin Invest* **116**;3060-3069.
100. Vande Berg, J. S., Rose, M. A., Haywood-Reid, P. L., Rudolph, R., Payne, W. G. und Robson, M. C. (2005): Cultured pressure ulcer fibroblasts show replicative senescence with elevated production of plasmin, plasminogen activator inhibitor-1, and transforming growth factor- β 1. *Wound Rep Reg* **13**;76-83.
101. Wahl, S. M., Hunt, D. A., Wakefield, L., McCartney-Francis, N., Wahl, L. M., Roberts, A. B. und Sporn, M. B. (1987): Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**;5788-5792.
102. Werner, S., Peters, K. G., Longaker, M. T., Fuller-Pace, F., Banda, M. J. und Williams, L. T. (1992): Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**;6896-6900.
103. Whitby, D. J. und Ferguson, M. W. J. (1991): The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. *Development* **112**;651-668.

104. Whitby, D. J. und Ferguson, M. W. J. (1991 a): Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev Biol* **147**;207-215.
105. Wilhelm, O. G., Wilhelm, S., Escott, G. M., Lutz, V., Magdolen, V., Schmitt, M., Rifkin, D. B., Wilson, E. L., Graeff, H. und Brunner, G. (1999): Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. *J Cell Physiol* **180**;225-235.
106. Winter, G. D. (1962): Formation of the Scab and the Rate of Epithelialization of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig. *Nature* **193**;293-294.
107. Woodley, D. T., Kalebic, T., Banes, A. J., Link, W., Prunieras, M. und Liotta, L. A. (1986): Adult Human Keratinocytes Migrating over Nonviable Dermal Collagen Produce Collagenolytic Enzymes That Degrade Type I and Type IV Collagen. *J Invest Dermatol* **86**;418-423.
108. Yang, L., Qiu, C. X., Ludlow, A., Ferguson, M. W. J. und Brunner, G. (1999): Active Transforming Growth Factor- β in Wound Repair. Determination Using a New Assay. *AJP* **154**;105-111.
109. Younai, S., Nichter, L. S., Wellisz, T., Reinisch, J., Nimni, M. E. und Tuan, T. L. (1994): Modulation of Collagen Synthesis by Transforming Growth Factor- β in Keloid and Hypertrophic Scar Fibroblasts. *Ann Plast Surg* **33(2)**;148-151.
110. Yu, Q. und Stamenkovic, I. (2000): Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* **14**;163-176.
111. Martinez-Ferrer, M., Afshar-Sherif, A.-R., Uwamariya, C., de Crombrughe, B., Davidson, J. M. und Bhowmick, N. A. (2010): Dermal Transforming Growth Factor- β Responsiveness Mediates Wound Contraction and Epithelial Closure. *Am J Pathol* **176**;98-107.

Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
AJP	The American Journal of Pathology
ALK5	Activin Receptor Like Kinase 5
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology
Am J Resp Crit Care Med	American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine
Anal Biochem	Analytical Biochemistry
Ann Plast Surg	Annals of Plastic Surgery
Arterioscler Thromb Vasc Biol	Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology
ATP	Adenosintriphosphat
Bacteroides spp.	Bacteroides species pluralis
Bd.	Band
Biochem Biophys Res Comm	Biochemical and Biophysical Research Communications
BMP	bone morphogenetic proteins
bp	Basenpaare
Brit J Derm	British Journal of Dermatology

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
Cancer Res	Cancer Research
cDNA	komplementäre DNA
Clin Cancer Res	Clinical Cancer Research
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Crit Rev Oral Biol Med	Critical Reviews in Oral Biology and Medicine
C _t	Cycle Threshold (für Schwellenwert-Zyklus)
dec-RVKR-cmk	Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketone
DEPC	Diethylen Pyrocarbonat
Dev Biol	Developmental Biology
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
Dtsch Ärztebl	Deutsches Ärzteblatt
DTT	Dithiothreitol
Ed.	Editor; Edition
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
Endocri Rev	Endocrine Reviews

Abkürzungsverzeichnis

et al.	und andere
evtl.	eventuell
Exp Neurol	Experimental Neurology
FASEB J	The FASEB Journal
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Front Biosci	Frontiers of Bioscience
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GDF-5	Growth differentiation factor-5
gel.	gelähmt
Genes Dev	Genes & Development
GPI-PLD	Glykosylphosphatidylinositol-spezifische Phospholipase D
H ₂ O	Wasser
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
HB-EGF	Heparin Binding Epidermal Growth Factor
HCl	Salzsäure
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
Inc.	Incorporated

Abkürzungsverzeichnis

Int J Biochem Cell Biol	The International Journal of Biochemistry & Cell Biology
Int J Radiat Biol	International Journal of Radiation Biology
J Biol Chem	The Journal of Biological Chemistry
J Cell Biol	The Journal of Cell Biology
J Cell Physiol	Journal of Cellular Physiology
J Cell Sci	Journal of Cell Science
J Clin Invest	The Journal of Clinical Investigation
J Clin Pathol	Journal of Clinical Pathology
J Invest Dermatol	Journal of Investigative Dermatology
J Neurosci Res	Journal of Neuroscience Research
J Pathol	The Journal of Pathology
J Pediatr Surg	Journal of Pediatric Surgery
J Rehabil Res Dev	Journal of Rehabilitation Research and Development
J Ultrastruct Res	Journal of Ultrastructure Research
Jr	Junior
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
Lab Invest	Laboratory Investigation
LAP	Latency Associated Peptide

Abkürzungsverzeichnis

LLC	Large Latent Complex
LTBP	Latent TGF- β Binding Protein
M	Molar
M6P	Mannose-6-Phosphat
M6P-IGF-II-R	Mannose-6-Phosphat-Insulin-like-Growth-Factor-II-Rezeptor
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgCO ₃	Magnesiumcarbonat
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MLEC	Mink Lung Epithelial Cell
mm	Milimeter
mM	Millimolar
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
MMLV	Monolay-Maus-Leukämie-Virus
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
Mol Endocrinol	Molecular Endocrinology
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
MV	Matrixvesikel
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat

Abkürzungsverzeichnis

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NY	New York
P. Mirabilis	Proteus Mirabilis
PACE4	Paired Basic Amino Acid Cleaving System 4
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PAI/L Bioassay	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1/Luciferase Bioassay
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pg / ml	Pikogramm / Milliliter
pg / mm ³	Pikogramm / Kubikmillimeter
pH	pH-Wert (pondus Hydrogenii)
pM	Pikomol
Proc Natl Acad Sci USA	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
Prog Clin Biol Res	Progress in Clinical and Biological Research
Prog Growth Factor	Progress in Growth Factor
Res	Research
Ps. Aeruginosa	Pseudomonas Aeruginosa

Abkürzungsverzeichnis

PZ	Pharmazeutische Zeitung
RLU	Relative Light Unit
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real-Time Polymerasekettenreaktion
SEM	Standard Error of the Mean
SLC	Small Latent Complex
SMAD-Protein	zusammengesetzt aus: Mad (Mother against decapentaplegic); Sma (Small body size)
Surg Gynecol Obstret	Surgery, Gynecology & Obstretics
Tab.	Tabelle
TAE Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	Tris gepufferte physiologische Kochsalzlösung
TGF- α	Transforming Growth Factor α
TGF- β	Transforming Growth Factor β
Thromb Haemost	Thrombosis and Haemostasis
Trends Biotechnol	Trends in Biotechnology
TSP-1	Thrombospondin-1
UK	United Kingdom

Abkürzungsverzeichnis

unverl.	unverletzt
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R3	Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor 3
Vol.	Volume
Wound Rep Reg	Wound Repair and Regeneration
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Meiners für die Betreuung der Dissertation und die Zurverfügungstellung der benötigten Gewebeproben bedanken.

Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Hans Henning Wetz für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Für die unermüdliche und gleichermaßen kompetente Unterstützung bei den praktischen, experimentellen Anteilen der Arbeit danke ich dem Team der Tumorforschung der Fachklinik Hornheide, im Besonderen Dr. Georg Brunner, Tamara Berger und Maryla Brode.

Schließlich möchte ich allen danken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit begleitet und in vielfältiger Weise unterstützt haben. Dabei gilt ein ganz besonderer Dank meiner Ehefrau Dr. Katrin Kahlke, die stets mit Rat und Tat an meiner Seite stand und mich immer wieder motivierte.

Anhang

I) Herstellung des Luciferasesubstratpuffers für den PAI/L Bioassay

Reagenz (Aufbewahrt bei -20°C)	Stockkonzentration [Endkonzentration im Puffer]	Menge an Stocklösung für 10 ml Luciferasesubstrat
Tricine	1 M (179,2 g / l – pH 7,8) [20 mM]	200 µl
Mg(CO) ₃ Mg(OH) ₂ 5H ₂ O	10,7 mM (10,394 g / l) * [1,07 mM]	1020 µl
MgSO ₄	2,67 M (658,1 g / l) [2,67 mM]	10 µl
EDTA	0,1 M (37,2 g / l) ** [0,1 mM]	10 µl
DTT	0,333 M (51 g / l) [33,3 mM]	1000 µl
Luciferin	17,6 mM (5,2 mg / ml) [800 µM]	454 µl
ATP	53 mM (29,2 mg / ml) [750 µM]	142 µl

* = Zur Auflösung muss konzentrierte Salzsäure (HCl / ca. 1,5 – 2,5 ml) zugegeben oder CO₂ durchgeleitet werden.

** = In 0,1 M NaOH angesetzt.

Die Reagenzien werden wie angegeben mit 7,164 ml H₂O dest. vermengt und auf Raumtemperatur gebracht. Dabei werden Luciferin und ATP zuletzt vor der Benutzung des Substrates hinzugegeben.

Wird das hergestellte Substrat nicht vollständig verbraucht, kann es bei -4°C bis zu einer Woche gelagert werden. Vor erneuter Benutzung muss die Lösung auf Raumtemperatur gebracht und frisches ATP in der entsprechenden Menge beigefügt werden.

II) Luminometereinstellungen

Variable	Benutzte Einstellung
Calculation mode	Total integral (in RLU [summed])
Gain setting	Autogain 90 - 10000 RLU
Dispense Volume A	0 µl
Dispense Volume B	110 µl
Dispense Volume C	0 µl
Total read time	4 seconds
Start integration at	1 second
Before peak time	0,1 seconds
Scaling factor	Scaling data by 1
Heating plate	Disabled
Delay between A & C	0 seconds
Minimum delay after B	0 seconds
Dispense method	Normal refill
Shaking	Enabled for each well
Stop integration at	4 seconds
After peak time	0,1 seconds

III) Ansetzen von DMEM Medium für MLECs (complete DMEM)

Dem ursprünglichen, gekauften Medium werden 10 % fötales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES und 250 µg / ml G418 (Geneticin) und 1 mM Natrium-Pyruvat zugegeben. Außer dem fötalen Kälberserum und dem Medium selbst muss alles steril gefiltert werden.

IV) Ansetzen von 0,1 % BSA/DMEM Medium

Das BSA (Bovine Serum Albumin) / DMEM Medium gleicht dem „complete DMEM“ mit dem Unterschied, dass anstelle des fötalen Kälberserums 0,1 % low endotoxin BSA hinzugegeben wird. Das BSA liegt in Pulverform vor und muss ebenfalls filtriert werden.

V) Ansetzen von PBS (Phosphate Buffered Saline)

a) Folgende Komponenten müssen vermengt und auf pH 7,4 gebracht werden:

Reagenz	1 Liter
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,442 g
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	2,171 g
Na ₂ HPO ₄ *	1,25 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g

* = Am besten kein wasserfreies Salz oder Na₂HPO₄ x 12H₂O benutzen!

- b) CaCl_2 (wasserfrei) 0,1 g (10x, 10 mM)
auflösen und auf 100 ml mit H_2O dest. auffüllen.
- c) $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g (10x, 5 mM)
auflösen und auf 100 ml mit H_2O dest. auffüllen.

Die Komponenten unter a), b) und c) werden bei Raumtemperatur gemischt und steril filtriert.