

**Funktionelle Rolle von Smad 2 in der topischen Inflammation,
Granulationsgewebeformation und Konsolidierung im
Rahmen kutaner Wundheilung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Anna-Alexandra Klinger
geboren am 22.12.1981 in Jena

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau, Jena
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. G. O. Hofmann, Jena
3. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Dr. M. Thorwarth, Starnberg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.01.2012

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	alpha smooth muscle actin
aqua dest.	aqua destillata
bFGF	basic fibroblast growth factor
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin
BMP	bone morphogenetic protein
CTGF	connective tissue growth factor
EGF	epidermal growth factor
EZM	extrazelluläre Matrix
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
DNA	deoxyribonucleic acid
FAST 1	fork-head activin signal transducer 1
Fc-Region	fragment crystallizable region
FGF	fibroblast growth factor
HRP	horseradish peroxidase
IFN-gamma	interferon-gamma
IL-1, IL-2	Interleukin 1, 2
ILGF	insulin-like growth factor
LAP	latency associated peptide
LTBP	latent TGF beta binding protein
mad	mothers against decapentaplegic
MH 1/ MH 2	mad homology domains
NaCl	Natriumchlorid
PDGF	platelete derived growth factor
PMNL	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
SARA	smad anchor for receptor activation
sma	small genes
Smad	similar mother against decapentaplegic
TGF alpha, beta	transforming growth factor alpha, beta
TNF alpha	tumor necrosis factor alpha

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Wundheilung.....	2
2.1.1	Phasen der Wundheilung.....	2
2.1.2	Wundheilungsstörung.....	4
2.2	TGF beta.....	5
2.3	Smads.....	6
3	Zielstellung.....	8
4	Material und Methoden.....	9
4.1	Versuchstiere.....	9
4.2	Tieroperationen.....	9
4.3	Histologie und Histomorphometrie.....	10
4.3.1	Herstellung der Schnittpräparate.....	10
4.3.2	Hämalaun-Eosin Färbung.....	11
4.3.3	Histomorphometrische Analyse.....	11
4.4	Westernblot.....	12
4.4.1	Proteinisolierung.....	12
4.4.2	BCA Protein Assay.....	12
4.4.3	Gelelektrophorese.....	14
4.4.4	Proteintransfer auf die Membran.....	16
4.4.5	Detektion.....	17
5	Ergebnisse.....	19
5.1	Histomorphometrie – Qualitative Auswertung.....	19
5.1.1	Heilungs-assoziierte entzündliche Infiltration Tag 3 post operationem.....	19
5.1.2	Heilungs-assoziierte entzündliche Infiltration Tag 7 post operationem.....	20
5.1.3	Heilungs-assoziierte entzündliche Infiltration Tag 14 post operationem.....	21
5.1.4	Heilungs-assoziierte entzündliche Infiltration Tag 22 post operationem.....	22
5.2	Quantitativ histomorphometrische Auswertung.....	23
5.2.1	Gesamtzellzahl von Primärgruppe und Sekundärgruppe im Vergleich.....	24
5.2.2	Smad 2 Expression.....	25
5.2.3	Smad 7 Expression.....	26
5.2.4	Gesamtzellzahl und Korrelation mit den Signaltransduktoren.....	27
6	Diskussion.....	30
6.1	Entzündliche Infiltration.....	30
6.1.1	Physiologische Infiltration.....	31

6.1.2	Infiltration als Antwort auf Infektion	31
6.1.3	Infiltration aufgrund von Reizfaktoren	31
6.1.4	Ergebnisse (entzündliche Infiltration).....	32
6.2	Signalweg.....	32
6.2.1	TGF beta	32
6.2.2	Smads	33
6.2.3	Aktivität des TGF beta Pathways.....	34
6.3	Myofibroblastenaktivität.....	35
6.4	Ergebnisse	37
6.5	Korrelation	40
6.6	Limitationen der Studie.....	41
7	Schlussfolgerungen	42
8	Literaturverzeichnis	44

1 Zusammenfassung

Diverse Studien weisen immer wieder auf die Problematik der sekundären Wundheilung und die sich daraus ergebenden Folgen hin. Ästhetische und funktionelle Einschränkungen sind häufig das Resultat frei granulierender Wunden, bei welchen die Möglichkeit der adaptierten Wundränder nicht gegeben ist.

Zytokine spielen eine zentrale Rolle während der Wundheilung, vor allem TGF beta hat großen Einfluss auf die EZM Synthese und letztlich die Wundkontraktion. Sekundäre Wunden weisen hierbei häufig exzessive Kontraktionen auf, welche zu besagten Einschränkungen führen. Inwieweit der Signalweg die Wundheilung beeinflusst, soll in dieser Studie evaluiert werden.

Bei 55 Versuchstieren wurden je zwei Exzisionswunden in der Leistenregion gesetzt. Eine Wunde wurde dabei der freien Granulation überlassen (sekundäre Wunde), die Zweite mit drei Einzelknopfnähten verschlossen (primäre Wunde). Nach 3, 7, 14 und 22 Tagen wurden Proben aus dem Wundgebiet entnommen. Entzündliche Infiltration und EZM Synthese wurden histomorphometrisch und mittels Westernblot ausgewertet.

Es wurden Unterschiede im TGF beta Signalweg zwischen primärer und sekundärer Wundheilung festgestellt. Der Zellgehalt der Proteine Smad 2 und 7, die als Variablen fungierten, wies Unterschiede zwischen beiden Modellen auf. In der Zellularität der Wunden fanden sich ebenfalls Unterschiede zwischen primären und sekundären Wunden.

Es zeigten beide Wundmodelle einen signifikanten Anstieg der Zellzahl am 3. post operativen Tag (primär: $p=0,001$; sekundär $p=0,0001$) im Sinne einer entzündlichen Infiltration mit einem gleichzeitigen signifikanten Anstieg von Smad 2 im primären Modell ($p=0,016$), während im sekundären Modell Smad 2 infrabasal blieb. Tag 7 post operationem zeigte sekundär einen signifikanten Anstieg der Zellzahl ($p=0,001$) und einen signifikanten Smad 2 Anstieg ($p=0,004$), während die Zellzahl primär abnahm und ein signifikanter Anstieg von Smad 7 zu verzeichnen war ($p=0,048$). Insgesamt war primär eine Korrelation zwischen entzündlicher Infiltration und Signaltransduktoren zu verzeichnen. Im sekundären Modell blieb dies aus.

Die Untersuchung zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen beiden Wundmodellen hinsichtlich der Expression der Signalproteine als auch der Zellzahl. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf den Einfluss von TGF beta auf die Wundheilung, insbesondere während der sekundären Wundheilung.

2 Einleitung

2.1 Wundheilung

Der Vorgang der Wundheilung ist ein komplexer biologischer Prozess. Inter- und intrazelluläre Signalwege werden sofort nach Verletzung in Gang gesetzt. Gerinnungskaskade, Immunsystem und Entzündungsgeschehen werden aktiviert und organisiert (Gurtner et al. 2008).

Ziel der Wundheilung ist es, die volle Schutzfunktion des Gewebes wieder herzustellen. Der Prozess ist interaktiv und dynamisch. Viele Mediatoren sind in das Wundgeschehen involviert (Hosokawa et al. 2005, Garlick und Taichman 1994, Beanes et al. 2003).

2.1.1 Phasen der Wundheilung

Der Wundheilungsvorgang wird in drei Phasen unterteilt: Entzündungsphase, Proliferation und Remodeling.

Die erste Reaktion auf eine Verletzung ist die Koagulation, bei welcher es zu einer lokalen Thrombozytenaggregation kommt. Die Thrombozyten sezernieren Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF beta und bFGF.

Die Inflammation schließt sich an die Koagulation an und wird unterteilt in eine frühe und eine späte Entzündungsphase. Thrombozyten, Endothelzellen und Fibroblasten sezernieren Zytokine. Diese locken polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNL) via Chemotaxis in den Wundbereich, welche in der frühen Phase dominierend sind.

PMNL produzieren wiederum proinflammatorische Zytokine (Faler et al. 2006).

Unter anderem stellt TGF beta als Zytokin einen Botenstoff dar, von welchem PMNL vermehrt in den ersten 24 Stunden angelockt werden.

Etwa 48-72 Stunden nach der Verletzung setzt die späte Phase ein. In dieser Phase überwiegen Makrophagen, welche ebenso durch den Wachstumsfaktor TGF beta als Botenstoff migrieren. Makrophagen sind außerordentlich bedeutsam im Wundheilungsprozess. Sie sezernieren weitere wichtige Wachstumsfaktoren wie PDGF, ILGF, TGF alpha und beta und bFGF.

Diese Faktoren regulieren ihrerseits die Produktion und Organisation extrazellulärer Matrix durch Fibroblasten (Beanes et al. 2003). Durch mechanische Reize und TGF beta differenzieren sich Fibroblasten über Protomyofibroblasten in Myofibroblasten um. Diese besitzen mit dem kontraktile Element α -SMA die Fähigkeit zur Gewebekontraktion. TGF beta stimuliert vor allem die α -SMA Synthese in Fibroblasten. Somit kommt diesem Zytokin eine entscheidende Bedeutung hinsichtlich der Ausbildung von Myofibroblasten zu (Takeuchi et al. 2009, Evans et al. 2003). Morphologisch gesehen besteht der kontraktile Apparat aus Bündeln von Mikrofilamenten. Dadurch besitzen sie eine enorme Kontraktilität über eine sehr lange Zeitdauer.

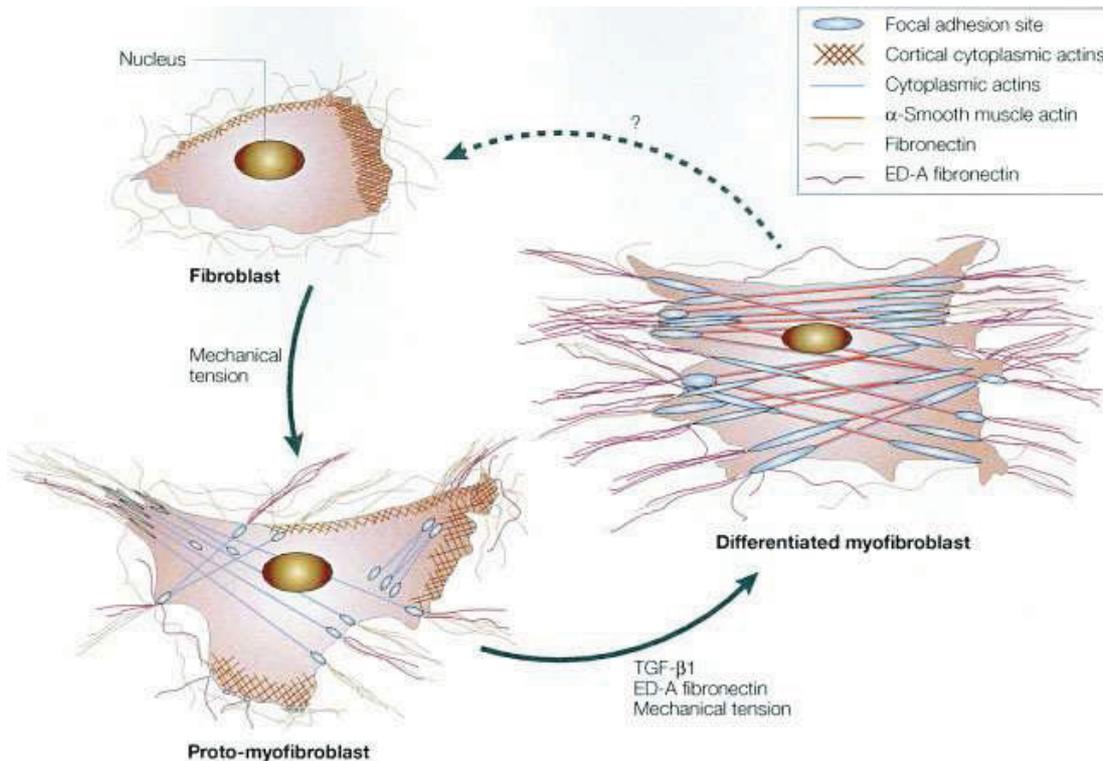


Abbildung 1: Differenzierung eines Fibroblasten über einen Protomyofibroblasten in einen Myofibroblasten nach (Gabbiani 2003)

Durch mechanische Stimuli wird der Fibroblast in den ersten 2-4 Tagen nach Wundsetzung in einen Protomyofibroblasten umgewandelt, (Abbildung 1). Durch weitere Mediatoren wie Fibronectin differenziert sich der Protomyofibroblast weiter in einen Myofibroblast, der zur Produktion von Alpha-smooth-muscle- aktin fähig ist (Hinz 2007, Hinz et al. 2007).

Die proliferative Phase setzt circa zwei bis zehn Tage nach Wundsetzung ein und ist gekennzeichnet von EZM Synthese, Angiogenese und Epithelialisierung. Fibroblasten produzieren extrazelluläre Matrix. Keratinozyten migrieren in die Wundränder, proliferieren und bilden eine Barriere (Eckes et al. 2000, Faler et al. 2006, Gurtner et al. 2008).

Fibroblasten stellen im weiteren Wundheilungsverlauf den dominierenden Zelltyp dar, welcher vor allem Kollagen vom Typ I und III produziert. Kollagen verleiht dem Gewebe Festigkeit. Der Kollagenstoffwechsel nimmt eine Schlüsselrolle in der Narbenbildung ein.

Der Gewebeumbau, das Remodeling, beginnt zwei bis drei Wochen nach dem Wundverschluss und dauert etwa ein Jahr. Dann ist die volle Festigkeit des Gewebes erreicht, die allerdings (for adult rats) nur bis zu 70% der ursprünglichen Festigkeit des unverletzten Gewebes entspricht. Die Umbauphase ist weiterhin gekennzeichnet von der Wundkontraktion, welche vor allem durch die Umdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten hervorgerufen wird. Actin und Myoactin interagieren um die Gewebefestigkeit zu steigern. Die Kontraktion wird vor allem von TGF beta stimuliert und kontrolliert (Beanes et al. 2003, Faler et al. 2006).

2.1.2 Wundheilungsstörung

Die Wunde ist definiert als Gewebsdurchtrennung von Haut, Schleimhaut oder Organen. Sie kann durch mechanische, thermische, chemische oder radiogene Einflüsse entstehen, aber auch in Folge von Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, chronisch venöser/arterieller Insuffizienz, oder immunologischer und dermatologischer Erkrankungen auftreten (Kujath und Michelsen 2008).

Der Defekt heilt entweder per primam intentionem (p.p.) oder per sekundam intentionem (p.s.).

Primäre Wundheilung liegt vor, wenn der Defekt nach Wundadaptation komplikationslos verheilt. Die primäre Wundheilung ist die angestrebte Heilungsform mit dem Ergebnis der Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes (restitutio ad integrum).

Sekundäre Wundheilung ist Heilung von Defektwunden mit klaffenden Wundrändern. Im zahnärztlichen Bereich sind vor allem die Alveolenheilung, Schleimhautentnahmen aus dem Gaumen oder Vestibulumplastiken mit freier Granulation als Beispiele der Heilung per sekundam intentionem zu nennen. Sie heilen unter Bildung von Granulationsgewebe ab. Die Wunde heilt vom Rand her zu, sie wird nicht verschlossen. Problematisch ist die Wundheilung mittels freier Granulation einerseits durch die Einschränkung der Lebensqualität infolge Schmerzsensationen. Andererseits können durch exzessive Kontraktion des entstehenden Narbengewebes Einschränkungen in Kosmetik und Funktion auftreten. Weiterhin besteht die Gefahr, dass sekundär heilende Wunden bakteriell besiedelt werden und Wundheilungsstörungen die Folge sind. Die häufigste Ursache für verzögerte Wundheilung ist die Wundinfektion. Dies ist ein multifaktorieller Vorgang, bei dem vor allem Menge und Virulenz der Erreger und die Konstitution des Patienten eine entscheidende Rolle spielen. Bei chronischen Wunden liegt meist eine Gewebeischämie vor, welche durch den ihr eigenen Sauerstoffmangel die Wundheilung hinauszögert. Weiterhin zu nennen sind Verbrennungswunden als sekundäre Wunden. Gewebeschädigung mit Gewebeverlust durch Verbrennungen entsteht durch Hitzeeinwirkung (Flüssigkeit, Dämpfe, Gase, Feuer oder Reibung). In Deutschland gibt es pro Jahr 600/100.000 Fälle. Verbrennungswunden, vor allem ab Grad 2, neigen durch die Heilung per sekundam zu einer verstärkten Narbenbildung mit kosmetischen und funktionellen Einschränkungen. Als problematisch zu erachten ist vor allem auch die Bewegungseinschränkung in Gelenkbereichen.

Primär können auch Wundheilungsstörungen durch Nahtspannung, Fremdkörper oder Infektion auftreten

Wunden, die nicht adäquat heilen wie Dekubiti, Verbrennungswunden, sekundäre ischämische Wunden oder Wunden nach Bestrahlung, stellen in der Praxis und im Gesundheitswesen ein großes gesundheitsökonomisches Problem dar.

Möglichkeiten der unmittelbaren Defektdeckung, mit aktiven Keratinozyten in der Epidermis oder aktiven Fibroblasten in der Dermis, sind verbreitete Maßnahmen um die Folgen der sekundären

Wundheilung zu umgehen. Gewebeersatz findet unter anderem Anwendung bei sekundären Wunden.

Vor allem Verbrennungswunden müssen zeitnah verschlossen werden, da die freie Granulation in exzessiver Narbenbildung mündet. Zudem sezernieren die Gewebe eine Mischung aus Wachstumsfaktoren und haben eine gewisse Schutzfunktion für die verletzte Region (Spiekstra et al. 2007).

Im Heilungsprozess spielt eine Reihe von Zytokinen die zentrale Rolle. Es existiert ein ganzes Netzwerk aus Zytokinen (z.B TGF-beta, CTGF, NF-alpha , IFN-gamma), dem Zytokin TGF beta wird eine Schlüsselrolle zugesprochen (Leask 2004).

2.2 TGF beta

Die TGF beta Superfamilie umfasst eine Reihe von strukturell ähnlichen Polypeptiden. Die Hauptgruppen sind TGF beta, Activin, Inhibin, Müller'sche inhibitorische Substanz und BMP.

Es handelt sich um multifunktionelle Zytokine, welche eine Vielzahl von zellulären Prozessen und biologischen Vorgängen wie Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung, Motilität, Adhäsion und Entwicklung beeinflussen (O'Kane und Ferguson 1997, Penheiter et al. 2002).

Die Wachstumsfaktoren der TGF beta Familie spielen eine große Rolle in der Entwicklung, Homöostase und Wiederherstellung von nahezu allen Geweben im Organismus, von der Fruchtfliege bis zum Mensch.

Das Zytokin TGF beta spielt vor allem in der Wundheilung und der Modulation des Immunsystems eine fundamentale Rolle. Es beeinflusst neben Entzündungsprozesse, Angiogenese, Bildung von EZM, Proliferation, Differenzierung auch weitere wichtige Prozesse, die eine Rolle im Reparaturprozess spielen. TGF beta wird dabei vor allem von Entzündungszellen, Keratinozyten, Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert, deren Funktionen es steuert (Varga 2002, Heldin et al. 1997, Frank et al. 1996).

TGF beta wird in nahezu allen Zellen im Zytoplasma in den zytoplasmatischen Ribosomen als Proprotein gebildet und in einer biologisch inaktiven Form sezerniert. Sofort nach Wundsetzung wird inaktives TGF beta mobilisiert und aktiviert (Lin et al. 2005).

Das TGF beta Propeptid (LAP) bleibt nonkovalent an TGF beta gebunden, sodass TGF beta als latente Form nicht am Rezeptor wirken kann. LAP muss im Prozess der TGF beta Aktivierung abgebaut werden. Die dritte Komponente des latenten TGF beta Komplexes ist LTBP (Massague 1998).

TGF beta erfüllt wichtige Funktionen in allen drei Phasen der Wundheilung durch Regulation der zentralen Zellen.

In der frühen Wundheilungsphase wird TGF beta vor allem von AlphaGranula der Blutplättchen sezerniert. TGF beta rekrutiert Entzündungszellen (PMNL, Monozyten) in den Wundbereich. Diese

sezernieren wiederum TGF beta, wodurch ein positiver Rückkopplungsmechanismus einsetzt.

Fibroblasten werden ebenso von TGF beta angezogen. Das Zytokin stimuliert ihre Proliferation und Entwicklung sowie EZM Synthese (Faler et al. 2006). Der TGF beta Signalweg wird vermittelt über Smad Proteine, welche sich im Zytoplasma der Zielzelle befinden, (Abbildung 2). Der Signalweg wird über Rezeptoren in der Zellmembran vermittelt. Strukturell und funktionell werden die Rezeptoren in Typ I- und Typ II-Rezeptoren unterteilt.

Der Serin/Threonin-Kinase-Rezeptorkomplex besteht aus den transmembranösen Proteinen Typ I und II (Typ I- und II-Rezeptoren sind Glycoproteine mit 55 kDa und 70 kDa). Es gibt sieben verschiedene Typ I-Rezeptoren und fünf Typ II-Rezeptoren, welche R-Smads aktivieren (Massague 1998).

TGF beta bindet zuerst an den Typ II-Rezeptor, welcher dann durch seine Kinasedomäne den Typ I-Rezeptor (in seiner GS-Domäne) phosphoryliert und somit aktiviert. Es entsteht vorübergehend ein Komplex aus Rezeptor I und II. Ohne den Typ II-Rezeptor ist eine Bindung des Liganden an den Typ I-Rezeptor offenbar nicht möglich (Heldin et al. 1997, Kawabata et al. 1999).

Der Typ I-Rezeptor phosphoryliert die R-Smads, woraufhin sich die aktivierten R-Smads mit dem Co-Smad 4 zu einem Komplex verbinden. Der Komplex wandert in den Zellkern und dort verbindet er sich mit Transkriptionsfaktoren (Corepressoren, Coaktivatoren) um die Genexpression der Zielzelle zu modulieren (Penheiter et al. 2002).

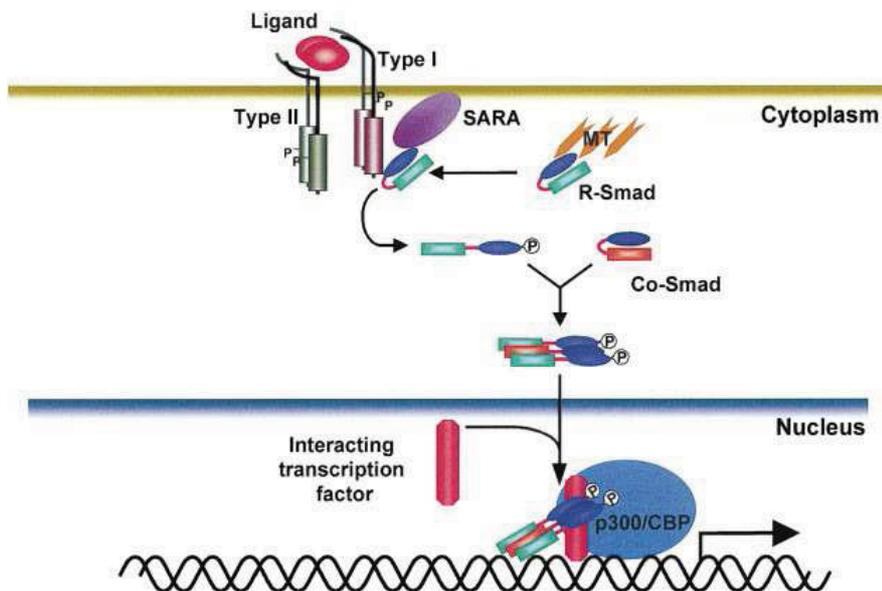


Abbildung 2: Schematische Darstellung des TGF beta Signalweges – Aktivierung der R-Smads und Bildung des R-Smad/ Co-Smadkomplexes mit Translokation in den Zellkern nach (Itoh et al. 2000)

2.3 Smads

Die Signalproteine der TGF beta Signalkaskade wurden erstmals in den Wirbellosen *Drosophila melanogaster* (*mad*) und *Caenorhabditis elegans* (*sma*) identifiziert.

Homolog zu ihnen konnte man in Vertebraten die Proteine der TGF beta Signalkaskade ebenfalls

isolieren. Aus mad und sma entstand der Name Smad (Derynck et al. 1996).

Smads sind intrazelluläre Proteine, welche Signale der TGF beta Superfamilie über Membranrezeptoren in den Zellkern weiterleiten.

Smads werden direkt phosphoryliert und formen heteromere Komplexe, welche im Zellkern die Transkription beeinflussen (Kretzschmar et al. 1997).

Nach ihren funktionellen Eigenschaften werden Smads in 3 Gruppen eingeteilt, (Abbildung 3): Rezeptor-aktivierte R-Smads (Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 5, Smad 8), Co-Smad (Smad 4) und inhibitorische Smads, sogenannte I-Smads (Smad 6, Smad 7).

Der Co-Smad 4 ist essentieller Partner der R-Smads. Er greift nicht direkt am Rezeptor an, ist aber über die Verbindung mit den R-Smads in den Signalweg involviert.

Smad 6 und Smad 7 sind inhibitorische I-Smads. Sie blockieren durch Interaktion mit dem TGF beta Rezeptor die Smad-abhängige Signaltransduktion. Smad 6 inhibiert ausschließlich den BMP Signalweg.

Smad 7 bindet an den TGF beta I-Rezeptor und konkurriert mit Smad 2 und Smad 3 um den Bindungsplatz an der Zellmembran. Die Smad-Phosphorylierung und somit Aktivierung wird blockiert und der TGF beta Signalweg unterbunden (Varga 2002).

Smads sind Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 42 kDa und 60 kDa. Charakteristisch für Smadproteine ist das Vorhandensein von zwei homologen Domänen, jeweils am Amino- und Carboxy-Ende, welche als MH 1 und MH 2 Domänen bezeichnet werden. In der Mitte befindet sich die Verbindungsregion, welche variable Aminosäuresequenzen aufweist (Heldin et al. 1997).

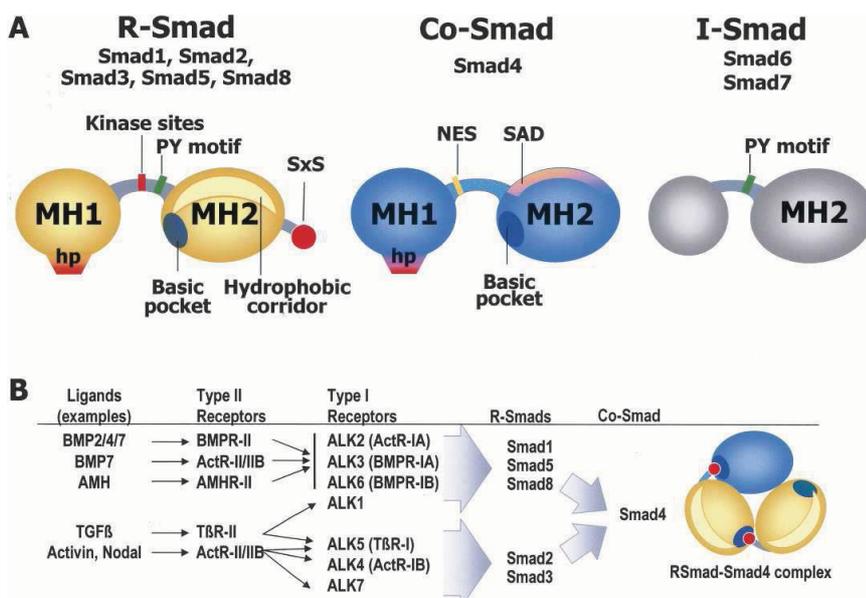


Abbildung 3: Einteilung und Aufbau der Smads sowie zugehörige Liganden und Rezeptoren nach (Massague et al. 2005)

3 Zielstellung

In verschiedenen Studien wird immer wieder auf die Problematik der sekundären Wundheilung in Bezug auf exzessive Wundkontraktion mit Folge von ästhetischen und funktionellen Einschränkungen hingewiesen. Vor allem in Gelenkbereichen kommt es zu Bewegungseinschränkungen, aber auch im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich sind funktionelle Einbußen durch Narbenzüge zu erwarten.

Eine zentrale Rolle nehmen Fibroblasten ein, welche sich während der Wundheilung durch mechanische Stimuli und TGF beta Signale zu Myofibroblasten umwandeln. Diese verfügen durch kontraktile Elemente (alpha-SMA) über die Fähigkeit zur Wundkontraktion. Somit ist eine vergleichende Untersuchung des TGF beta Signalweges zwischen primärer und sekundärer Wundheilung sehr wichtig, um mögliche Targets für eine pharmakologische Intervention zu identifizieren.

Ziel der in-vivo-Studie war es, Unterschiede der Aktivität des TGF beta Signalweges zwischen primärer und sekundärer Wundheilung zu evaluieren. Die Variable zur Bestimmung des TGF beta Signalweges war der Smad 2 und Smad 7 Gehalt der Zellen. Es galt folglich zu klären, welche Unterschiede in der Zielgenexpression zwischen primärem und sekundärem Modell an den verschiedenen post operativen Tagen bestanden.

Des Weiteren war von Interesse, ob bei sekundärer Heilung eine Störung der Smad 7 vermittelten TGF beta Rückkopplungshemmung zu verzeichnen war.

Ebenso sollte der Frage nachgegangen werden, in wieweit eine Korrelation zwischen Expression der Signaltransduktoren und Wundzellularität bestand. Zu verschiedenen post operativen Zeitpunkten wurden deshalb die Zellularität der Wunden und die Expression der Signaltransduktoren untersucht.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden 55 Mäuse des Inzuchtstammes C57/BL6 Jax (Service Einheit Kleinnager, Uniklinikum Jena) verwendet. Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug zu Studienbeginn 8-14 Wochen. Ihr Körpergewicht lag zwischen 16 und 31 g. Die Tiere wurden zur Identifikation mit Ohrlochmarkierungen versehen und während des Versuchszeitraumes (bis zu sechs Tiere pro Käfig) in Makrolon Typ II long-Käfigen (Techniplast, Varese, Italien) in den Räumen der Quarantäne-Einheit Kleinnager im Forschungszentrum Lobeda (FZL) gehalten. Die Umgebungstemperatur lag bei 22 ± 2 °C, die Luftfeuchte betrug 40-60%. Ein Luftaustausch von 12 x pro Stunde, sowie ein Hell-Dunkelrhythmus von 14 Stunden hell, 10 Stunden dunkel waren gewährleistet. Die Tiere erhielten eine pelletierte Nagerstandarddiät (V1534 300 Haltungsfutter Sniff, Soest) und mit Salzsäure pH 2,7-3,0 angesäuertes, (autoklaviertes) Leitungswasser ad libitum. Die Studie wurde auf Grundlage des vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz genehmigten Tierversuchsantrags (Reg.-Nr. 02-12/05) durchgeführt.

Die Eingriffe erfolgten bilateral. Probenentnahmen fanden pro Gruppe nach 3, 7, 14 und 22 Tagen statt, (Tabelle 1).

Tabelle 1: Entnahmezeitpunkte und Tierzahl

Entnahmezeitpunkt	Tierzahl	
	Histomorphometrie	Westernblot
Tag 3 post operationem	15	6
Tag 7 post operationem	13	6
Tag 14 post operationem	14	8
Tag 22 post operationem	7	8

4.2 Tieroperationen

Die Narkose der Tiere erfolgte mittels Ether-Dampf (Diethylether, Fischer, Saabrücken, Deutschland). Die Augen der Tiere wurden zum Schutz vor Austrocknung mit NaCl-getränkten Gazetupfern zugebunden. Die Tiere wurden im Anschluss in Rückenlage auf einem Plexiglas-OP-Brett fixiert. Im Anschluss wurde die Leistenregion bilateral enthaart und mit Softasept[®]N (Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

Es wurden 2 Exzisionswunden definierter Größe in der Leistenregion gesetzt. Die dabei anfallende Haut wurde zur Etablierung eines Kontrollstandards asserviert. Eine der Wunden wurde der freien

Granulation überlassen (sekundäre Wunde), während die Andere mit 3 Einzelknopfnähten (Mariderm 4-0, Catgut, Markneukirchen, Deutschland) verschlossen wurde (primäre Wunde).

Nach 3, 7, 14 und 22 Tagen wurden die Tiere durch Hyperinsufflation mit Etherdampf getötet und es wurden Proben aus dem Wundgebiet entnommen, (Abbildung 4).

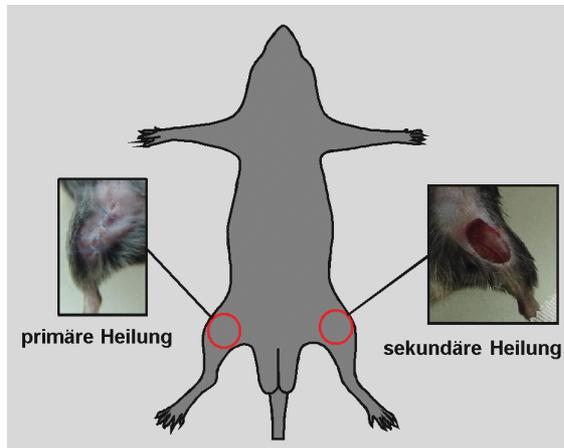


Abbildung 4: Abbildung der bilateralen Probenentnahme

4.3 Histologie und Histomorphometrie

4.3.1 Herstellung der Schnittpräparate

Die in Formalin aufbewahrten Gewebeprobeen wurden zunächst in Paraffin eingebettet. Zur Entwässerung diente hierfür das Gerät „Histokinette“ (Typ Leica TP 1020, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland). Die Einbettung des Gewebes in heißes Paraffin erfolgte durch das Gerät „Paraffinaußießstation“ (Typ Leica EG 1160, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland).

Danach wurden die Paraffinblöcke abgekühlt und anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Von jedem Block wurden $4\text{ }\mu\text{m}$ dünne Schnitte am Mikrotom (Leica RM 2145, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) angefertigt und anschließend in einem $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ heißen Wasserbad gestreckt. Die gestreckten Schnitte wurden auf Objektträger (Superfrost Plus, Menzel GmbH & CoKG, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wärmeschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) getrocknet. Danach trockneten sie einen Tag offen.

Anschließend wurden die Objektträger einer Hämalaun-Eosin-Färbung (Merck, Darmstadt, Deutschland) unterzogen.

4.3.2 Hämalaun-Eosin Färbung

Die Entparaffinisierung erfolgte mittels Eintauchen in Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 2 mal 15 min. Danach folgte zum Zweck der Rehydrierung eine jeweils einminütige Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 100 %, 96 %, 80 %, 60 % und 50 %) und anschließend gründliches Spülen mit Aqua dest. Hiernach wurden die Proben für 20min in Hämalaun (nach Mayer) inkubiert, dann mit handwarmem Leitungswasser 6-10min gebläut und abschließend mit destilliertem Wasser gespült. Nach 5-10 minütigem Färben mit Eosin folgte weiteres Spülen mit destilliertem Wasser. Im Anschluss wurden die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe jeweils eine Minute dehydriert (Isopropanol 50 %, 60 %, 80 %, 96 % und 100 %) sowie 2 min in Xylol inkubiert. Abschließend folgte das Aufbringen des Eindeckmediums (Eukitt), (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ablauf Hämalaun-Eosinfärbung

Xylol	2x15 min
Isopropanol 100%	1 min
Isopropanol 96%	1 min
Isopropanol 80%	1 min
Isopropanol 60%	1 min
Isopropanol 50%	1 min
Auqa dest.	1 min
Hämalaun	20 min
Leitungswasser	6–10 min
Aqua dest.	1 min
Eosin	5–10 min
Aqua dest.	1 min
Isopropanol	1 min
Xylol	2 min
Eukitt	

4.3.3 Histomorphometrische Analyse

Am Mikroskop „IMAGER M1“ von Zeiss wurde mittels des Programmes AxioVision (Axio Cam MR c5, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) und 400facher Vergrößerung der Wundbereich auf verschiedene Parameter/ Zielvariablen untersucht und photographisch festgehalten.

Es wurden dabei drei verschiedene Gesichtsfelder einer Wunde untersucht.

4.4 Westernblot

Der Westernblot ist eine immunologische Methode, mit der spezifische Proteine nachgewiesen werden können (Burnette 1981).

Die Proteine werden auf einem Gel durch das Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach in Proteinbanden aufgetrennt. Es erfolgen die Übertragung auf eine Membran und der Nachweis mittels spezifischer Antikörper.

Die Immundetektion erfolgt nach dem Antigen - Antikörperprinzip.

Der Primärantikörper koppelt direkt an das Epitop seines Antigens (Protein) und ein Sekundärantikörper bindet an die Fc-Region des Primärantikörpers, welchen er detektiert. Hierfür trägt er ein zur Sichtbarmachung entsprechendes Enzym (z.B. HRP).

4.4.1 Proteinisolierung

Mausproben der Versuchstage 3, 7, 14 und 22 wurden am Kryostat (Leica CM 3050 S Gefriermikrotom, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) in 20 µm dünne Stücke geschnitten, ca. 50 Schnitte einer Probe in ein Eppendorfgefäß mit 50 µl überführt und gevortext.

Anschließend wurde das Zelllysats 1 min bei 13.000 U/min und 4 C° durch Zentrifugation (Biofuge Heraeus, Hanau, Deutschland) geklärt.

Ein Ultraschallbad in Eiswasser für 15 min zum Aufschluss der Zellen und eine 30 minütige Proteindissoziation auf Eis folgten. Nach weiteren 5 min Zentrifugation wurden die Proben aliquotiert und bei -20 C° eingefroren.

4.4.2 BCA Protein Assay

Der BCA Protein Assay eignet sich sehr gut zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Walker 1994, Brenner und Harris 1995).

Nach dem Vorbereiten der Proben wurde der BCA Essay vorgenommen, in welchem die Proteinkonzentration mittels Detektion am ELISA Reader (Dynatech MR 5000, Dynatech Laboratories, Denkendorf, Deutschland) bei 550 nm bestimmt wurde. BSA war die verwendete Eichsubstanz. Anhand der BSA Eichgrade wurde die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

Zunächst wurden Standards (BCA Protein Assay Kit-Pierce Protein, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) vorbereitet.

Folgende Konzentrationen in µg/ml wurden in Eppendorfgefäßen hergestellt: 2000, 1500, 750, 500, 250, 125 und 62,5 (BSA + Lysepuffer), (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung Lysepuffer

Aqua bidest	3600 ml
5x Lyse-Puffer-Stock	1000 µl
25x Protease-Inhib.-Compl.-Stock	200 µl
NaF	125 µl
PMSF	50 µl
Na-Orthovanadat	25 µl

Die Proben wurden für eine Dreifachbestimmung zu 4 µl Probe und 36 µl Aqua bidest in Eppendorfgläsern verdünnt.

Zunächst wurden in einer 96 Well Mikrotiterplatte (Greiner bio one, Frickenhausen, Deutschland) 40 µl Aqua bidest vorgelegt. Des Weiteren wurden in jedes Well 10 µl der Probe/Blank/Standards eingespült. Anschließend wurden 200 µl Working Reagent A+B in die Wells pipettiert. Es folgte die Inkubation im Wärmeschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 C° für 30 min. Nach 10 min Abkühlphase erfolgte die Messung am ELISA Reader.

Die Reaktion kann man folgendermaßen beschreiben:

In einem basischen Medium findet eine Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} statt. Dieses Kupferkation wird mit einer Säure (BCA) mittels kolorimetrischer Detektion nachgewiesen.

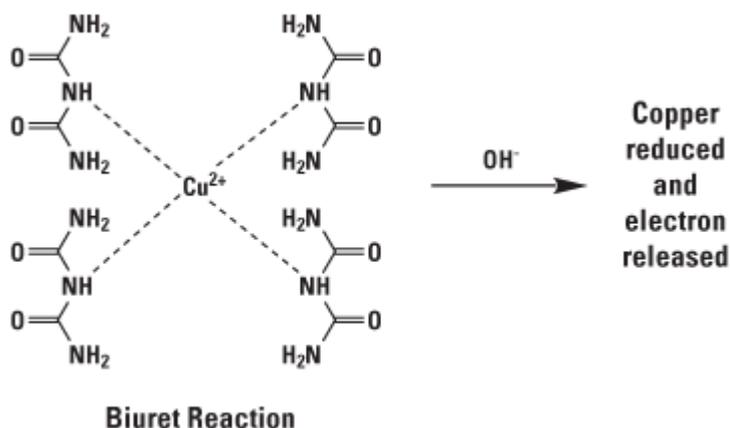


Abbildung 5: Biuret Reaktion (Protein bildet mit Kupferionen einen Komplex) (Quelle: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=876562B0-5056-8A76-4E0C-B764EAB3A339>)

Im ersten Schritt gehen das Protein und Kupfer Cu^{2+} eine Bindung ein, (Abbildung 5). In dieser Reaktion bilden drei oder mehr Aminosäurereste der Peptide einen farbigen Chelatkomplex mit Kupferionen.

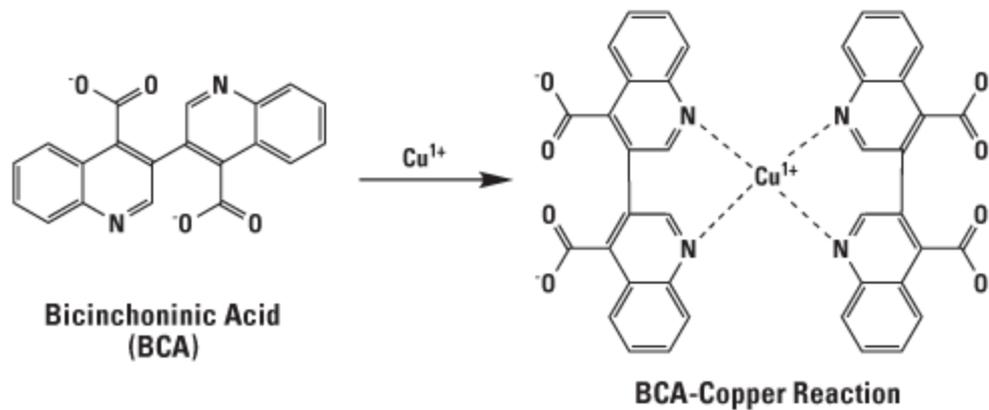


Abbildung 6: Zweiter Schritt der Reaktion - Cu^{2+} Ionen werden zu Cu^+ Ionen reduziert und bilden mit Bicinchonininsäure einen violetten Farbkomplex (Quelle: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=876562B0-5056-8A76-4E0C-B764EAB3A339>)

Im zweiten Schritt der Farbreaktion reagiert die BCA mit dem Kupferkation, (Abbildung 6). Die Farbreaktion resultiert aus einer Chelatbildung von zwei BCA Molekülen mit einem Kupferion. Die violette Farbe kann am effektivsten in einem Wellenlängenspektrum von 550 bis 570 nm gemessen werden.

4.4.3 Gelelektrophorese

Für die Durchführung des Westernblots wurden die Proben in ihrer im BCA-Test errechneten Konzentration derart mit destilliertem Wasser vermennt, dass ein Volumen von 16,2 μl resultierte. Hinzugefügt wurden noch ein Ladepuffer und ein Reducing agens. Daraufhin wurden die Proben 1 min bei 4 $^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und auf dem Thermorüttler bei 70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min erwärmt. Danach folgten 5 min Kühlung auf Eis und 5 min Zentrifuge bei 4 $^{\circ}\text{C}$. Für die Elektrophorese wurde ein Laufpuffer (MOPS, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) angesetzt, (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammensetzung MOPS Puffer

Aqua dest.	950 ml
MOPS SDS Running Buffer 20x	50 ml

MOPS Puffer eignet sich gut für Moleküle größer 50 kDa (Smad 2/3: 55-60 kDa, Smad 7: 51 kDa). 2 NuPage Bi-Tris Mini Gels (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) wurden laut Herstellerangaben vorbereitet und in die Kammer eingesetzt. Der MOPS Puffer wurde daraufhin eingefüllt und die Taschen des Gels mit den vorbereiteten Proben zu 25 μl (Probe, Aqua dest., Ladepuffer 6,25 μl , Reducing agens 2,5 μl) befüllt. Insgesamt 10 Taschen pro Gel standen zur Verfügung und in eine Tasche wurde standardmäßig ein Marker (Seeblue® Plus2 Pre-stained standard, Invitrogen,

Darmstadt, Deutschland) als Proteinstandard (aus Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 4 und 250 kDa) zu 10 µl eingefüllt.

Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V über 10 min, um die Proteine der Probe im Sammelgel zu konzentrieren, (Abbildung 7). Die weitere Auftrennung der Proteine erfolgte 40 min bei 200 V im vertikalen Elektrophoresesystem (X Cell Sure Lock, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland).

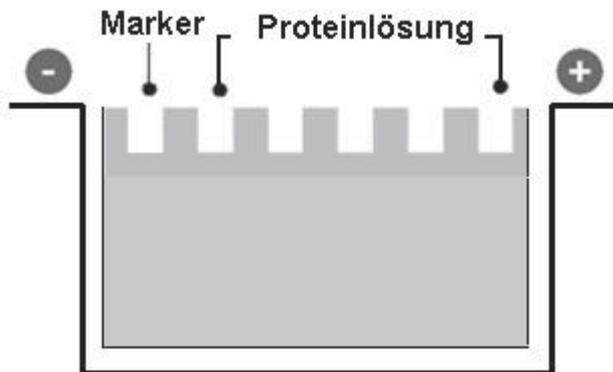


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Gelelektrophorese

Danach wurden die Proteine auf eine Membran transferiert.

Zwei Transfermembranen (Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) wurden hierfür zur Vorbereitung 10 min in Transferpuffer (NuPage Transfer Buffer 20x Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) gelegt, (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammensetzung Transferpuffer

Aqua dest.	750 ml
Methanol	200 ml
Transferpuffer Stock	50 ml

Zudem sind 5 Blotting Pads und 4 Filter Paper so vorzubereiten, dass sie auf die gleiche Größe des Gels zugeschnitten und 10 min in Transferpuffer eingelegt werden.

4.4.4 Proteintransfer auf die Membran

Nach der Elektrophorese wurden die Kassetten nach Herstellerangaben geöffnet und die Gele vorsichtig entnommen. Das Gel wurde in einer genormten Reihenfolge (Blottingsystem siehe Abbildung 8) mit Transfermembranen, Filterpapieren sowie Blotting Pads in die Blottingkammer „X Cell II Blot Module“ von Invitrogen eingebracht. Dabei sollte das Gel der Transfermembran direkt ohne Luftblasen anliegen.

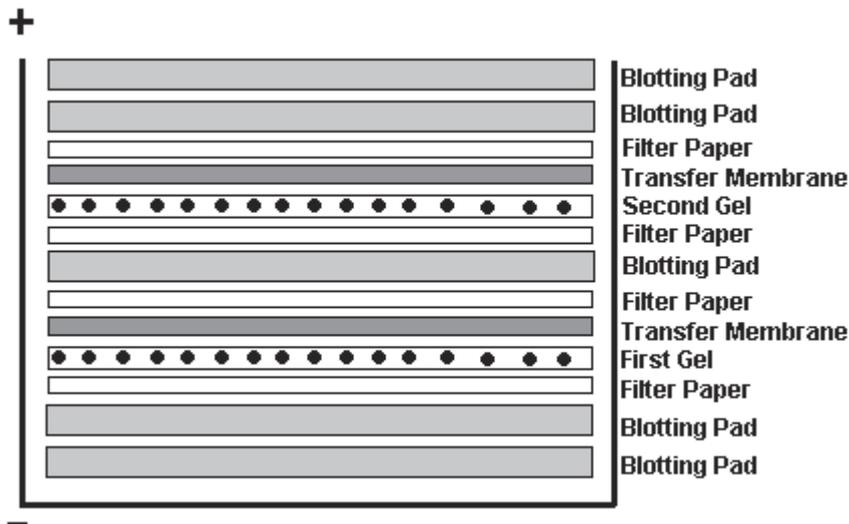


Abbildung 8: Schichtung des Blottings

Die Blottingkammer wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Deckel wurde aufgesetzt, Strom angeschlossen und 1 h bei 30 Volt geblottet.

Die Bindung der Proteine an die Membran erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen.

Nach 1 h wurden die Membranen in Blotto für 1 h in einer Schale auf einer Wippe gewaschen, (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zusammensetzung des Blottos

TRIS ph=8	50 ml
Magermilchpulver	2,5 g
Tween	50 μ l

Das Gel wurde mit Coomassie-Blau angefärbt um zu überprüfen, ob die Proteine auf die Nitrocellulosemembran übertragen wurden.

Das Waschen in Blotto blockiert freie Bindungsstellen und verhindert somit unspezifische Bindungen der Antikörper. Das Milchpulver des Blottos eignet sich sehr gut, da es für die Antikörper ein nicht erkennbares Protein ist.

Für die im Westernblot nachzuweisenden Proteine Smad 2 und Smad 7 wurden zwei Röhren vorbereitet, in welchen die Primärantikörper 1:200 angesetzt wurden.

In 5 ml Blotto wurden 25 µl Smad 2 (1:200)(Goat Polyklonal antibody, IgG, (N19) sc 6032, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) bzw Smad 7 (1:200)(Goat Polyklonal antibody, IgG, (N19) sc 7004, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) Primärantikörper und jeweils 1 µl beta Aktin (1:5000) (Sigma Aldrich, München, Deutschland) als Kontrolle angesetzt.

Da beta Aktin von allen Zellen stetig in gleicher Konzentration exprimiert wird, kann man die Smadexpression an Hand dessen vergleichen (Frericks und Esser 2008).

Die Membranen wurden nach dem Waschen in die vorbereiteten Röhren mit Primärantikörpern überführt. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Kühlraum auf der Rolle zur gleichmäßigen Verteilung. Die über Nacht gedrehten Membranen wurden am nächsten Morgen in TRIS Puffer 3x5 min gewaschen, (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung TRIS Puffer

Aqua dest.	900 ml
TRIS Stammlösung	100 ml
Natronlauge	
Tween	

Jeweils 5 µl (1:2000) Sekundärantikörper antigoat (gegen Smad gerichtet)(Dako Cytomation Polyklonal Rabbit Anti Goat Immunoglobulins/ Biotinylated, Hamburg, Deutschland) und antimouse (gegen beta Aktin gerichtet)(Dako Polyklonal Rabbit Anti mouse Immunoglobulins/ Biotinylated, Hamburg, Deutschland) wurden in einem Röhren mit 10 ml Blotto angesetzt.

Streptavidin HRP (BIO FX Laboratories, Freiburg, Deutschland) wurde zu 1 µl auf 10 ml hinzugefügt. Der Inhalt wurde auf beide Membranen in Röhren verteilt. Beide Röhren inkubierten 1 h auf der Rolle. Zum Schluss folgte abermaliges Waschen der Membranen 5 min in TRIS Puffer.

4.4.5 Detektion

Das Enzym-Antikörperkonjugat wurde mittels Chemilumineszenz detektiert.

Die Peroxidase, welche an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, katalysiert die Umsetzung von Luminol (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) in seine oxidierte Form (Grundform). Somit kann eine Lumineszenz detektiert werden.

Es folgte die Detektion am Computer (LAS 3000 Lumineszenz und Fluoreszenz Imager) und gegebenenfalls per Röntgenfilmentwickler (amersham pharmacia biotech Hyperprocessor).

Dafür wurden die Membranen 1 min in das Detektionsreagenz Luminol (Reagenz A+B jeweils 3 ml) eingelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Histomorphometrie – Qualitative Auswertung

5.1.1 Heilungs-assoziierte entzündliche Infiltration Tag 3 post operationem

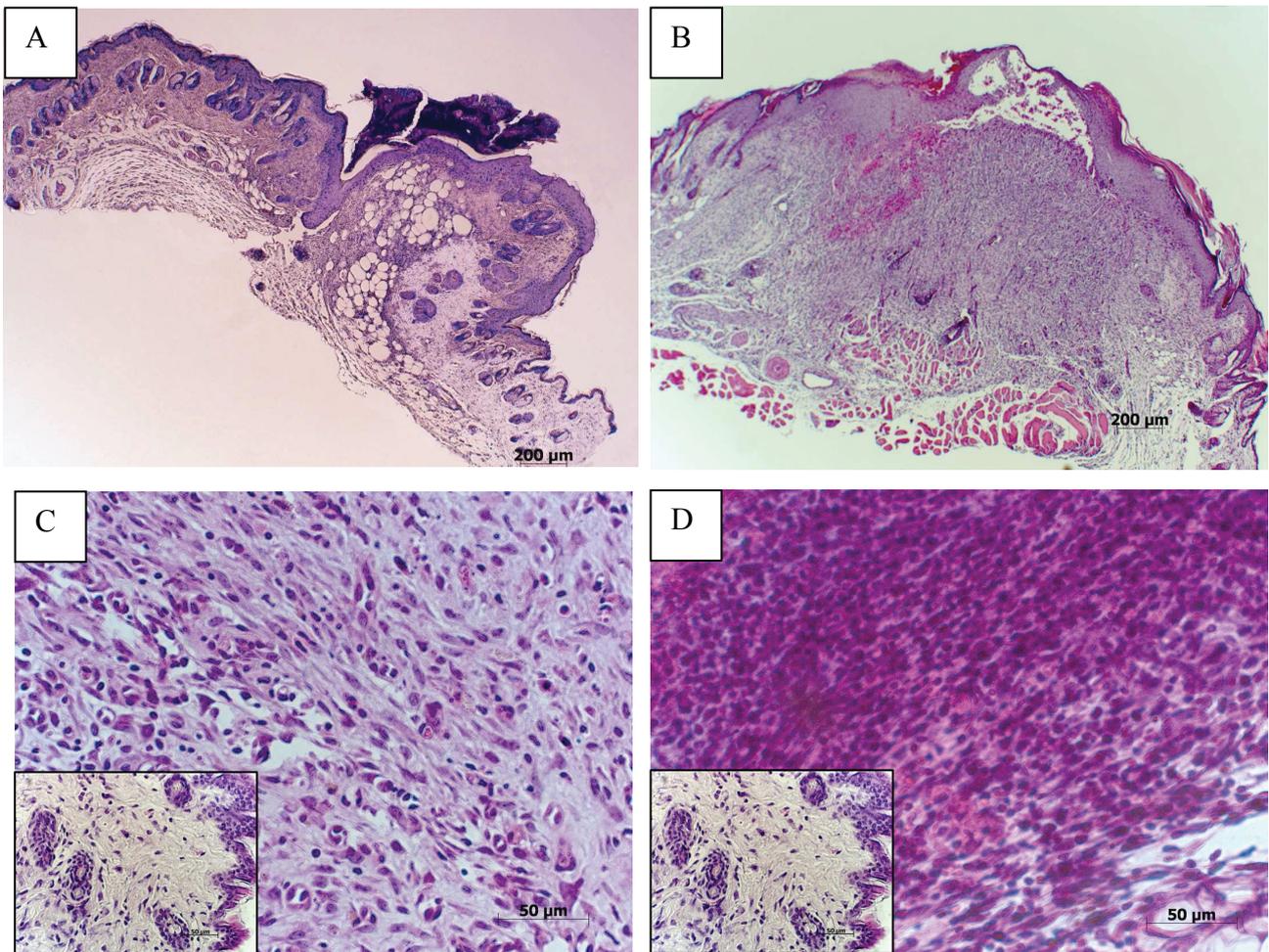


Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen des Wundgebietes an Tag 3 post operationem
Übersichtsaufnahmen der primären (A) und sekundären Wunden (B) mit 50x Originalvergrößerung.
Detailvergrößerung (400x Originalvergrößerung) der primären (C) und sekundären (D) Wundregion.
Unverwundete Haut aus der Leistenregion ist zur Kontrolle im Bild links unten dargestellt.

An Tag 3 post operationem fand sich in der primären Wunde vor allem ein gemischtzelliges Infiltrat in der Dermis mit Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten.

Die sekundären Wunden ließen ein massives diffuses gemischtzelliges Infiltrat der Dermis aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Erythrozytenextravasaten (Spaltraum mit Einblutung) erkennen, (Abbildung 9).

5.1.2 Heilungs-assoziierte entzündliche Infiltration Tag 7 post operationem

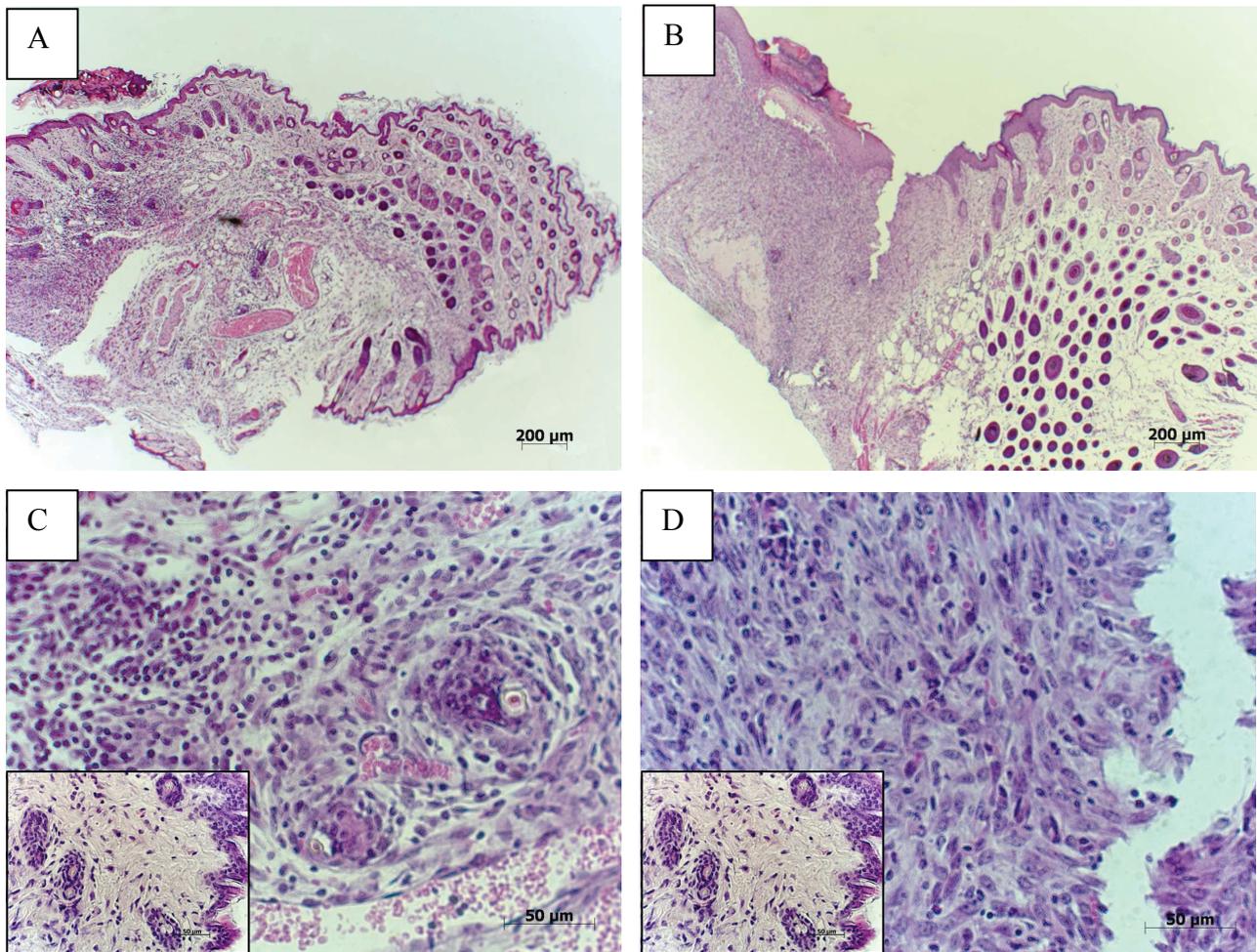


Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahmen des Wundgebietes an Tag 7 post operationem
 Übersichtsaufnahmen der primären (A) und sekundären Wunden (B) mit 50x Originalvergrößerung.
 Detailvergrößerung (400x Originalvergrößerung) der primären (C) und sekundären (D) Wundregion.
 Unverwundete Haut aus der Leistenregion ist zur Kontrolle im Bild links unten dargestellt.

An Tag 7 waren post operationem im primären Wundmodell interstitielle Ansammlungen von Entzündungszellen sowie perivaskuläre Lymphozyteninfiltrate und eosinophile Granulozyten sowie Gefäße mit Erythrozyten und Plasmazellen zu erkennen.

Im sekundären Modell war ein keilförmiges oberflächliches und tiefes interstitielles lymphozytäres Infiltrat mit Granulozyten und Plasmazellen/Erythrozytenextravasate zu beobachten sowie zunehmende Fibroblastenproliferation (längliche dunkle Zellkerne), (Abbildung 10).

5.1.3 Heilungs-assoziierte entzündliche Infiltration Tag 14 post operationem

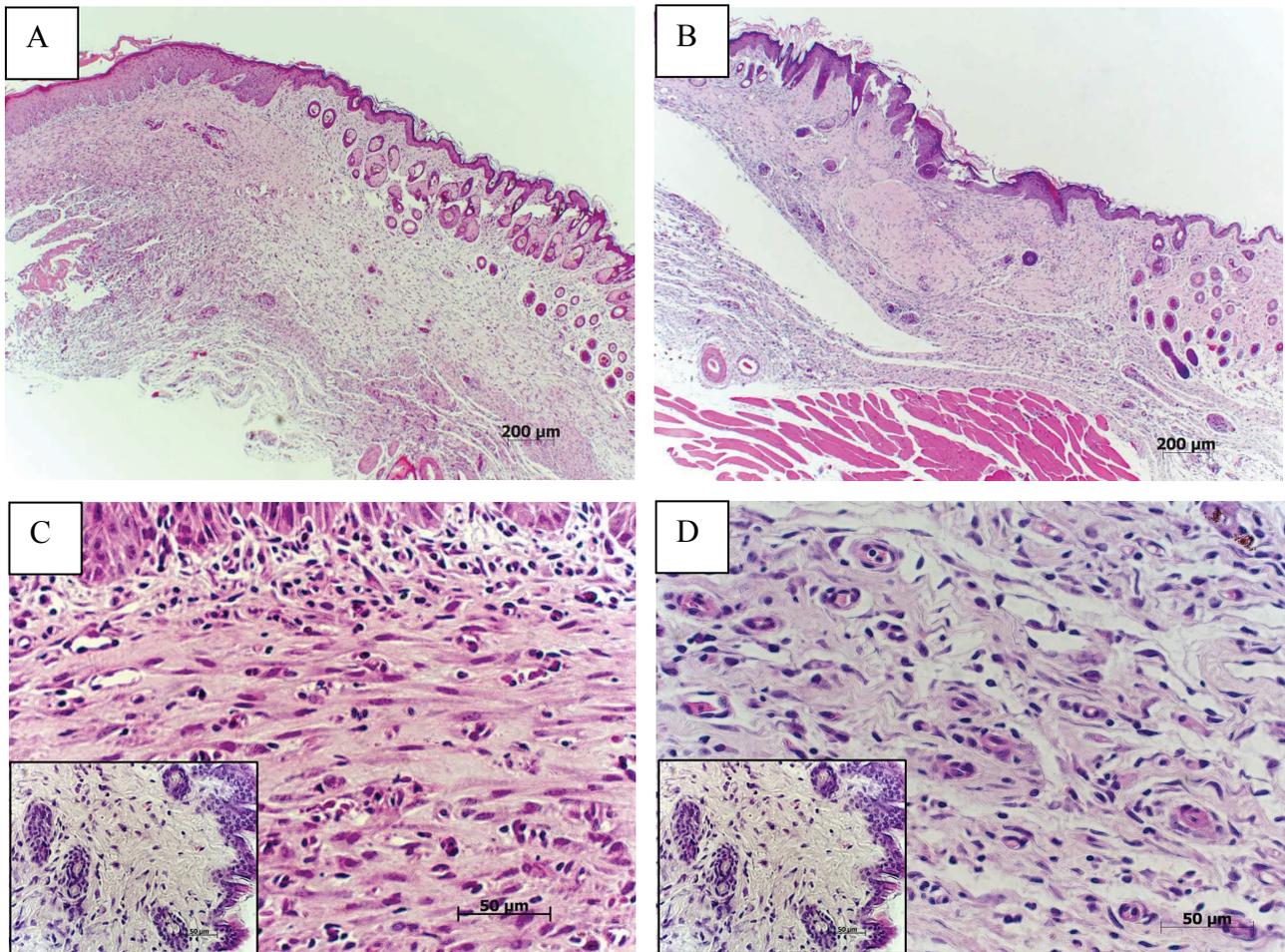


Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen des Wundgebietes an Tag 14 post operationem
 Übersichtsaufnahmen der primären (A) und sekundären Wunden (B) mit 50x Originalvergrößerung.
 Detailvergrößerung (400x Originalvergrößerung) der primären (C) und sekundären (D) Wundregion.
 Unverwundete Haut aus der Leistenregion ist zur Kontrolle im Bild links unten dargestellt.

Ein tiefes diffuses gemischtzelliges Infiltrat und vermehrte Fibroblastenproliferation waren nach 14 Tagen post operationem im primären Wundmodell zu erkennen.

Vereinzelte Lymphozyteninfiltrate und Fibroblasten dominierten das Bild des sekundären Modells 14 Tage post operationem, (Abbildung 11).

5.1.4 Heilungs-assoziierte entzündliche Infiltration Tag 22 post operationem

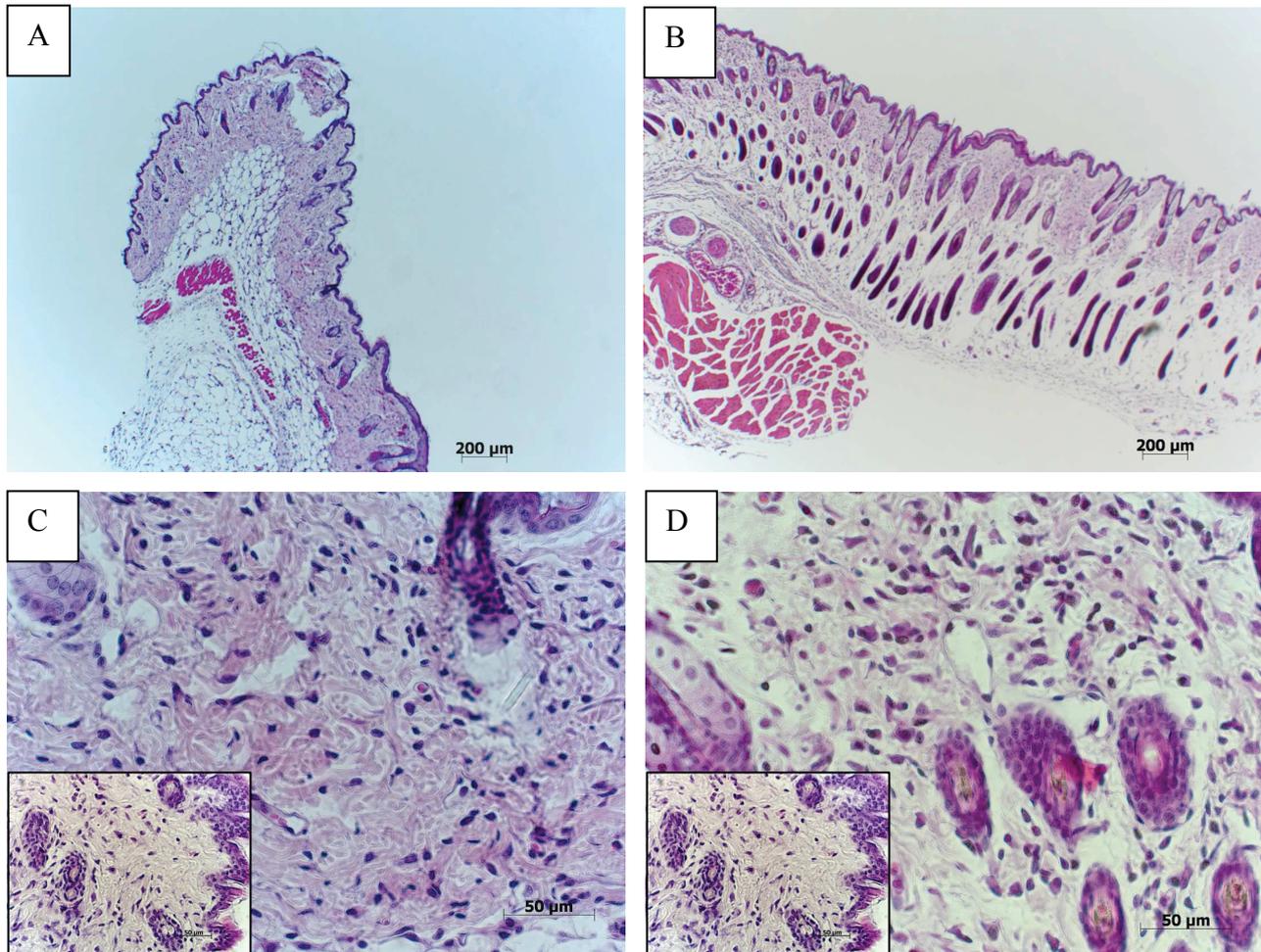


Abbildung 12: Mikroskopische Aufnahmen des Wundgebietes an Tag 22 post operationem
 Übersichtsaufnahmen der primären (A) und sekundären Wunden (B) mit 50x Originalvergrößerung.
 Detailvergrößerung (400x Originalvergrößerung) der primären (C) und sekundären (D) Wundregion.
 Unverwundete Haut aus der Leistenregion ist zur Kontrolle im Bild links unten dargestellt.

Das Zellbild beider Modelle war annähernd vergleichbar mit dem gesunder Maushaut. Vereinzelt Makrophagen und Fibroblastenzellkerne waren ersichtlich, (Abbildung 12).

5.2 Quantitativ histomorphometrische Auswertung

Die histomorphometrische Analyse diene vor allem der Quantifizierung der zu beobachtenden Veränderungen im Wundbereich.

Alle Daten wurden als Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte angegeben. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Globaltest (Kruskal-Wallis) und im Falle von Signifikanzen wurde dies mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unverbundene Stichproben untersucht (alpha Adjustierung mittels modifiziertem Bonferroniverfahren nach Shaffner). Das 95% Konfidenzintervall ($p < 0,05$) wurde als statistisch signifikant erachtet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Säulendiagrammen mit SPSS 13 (SPSS inc., Chicago, USA).

5.2.1 Gesamtzellzahl von Primärgruppe und Sekundärgruppe im Vergleich

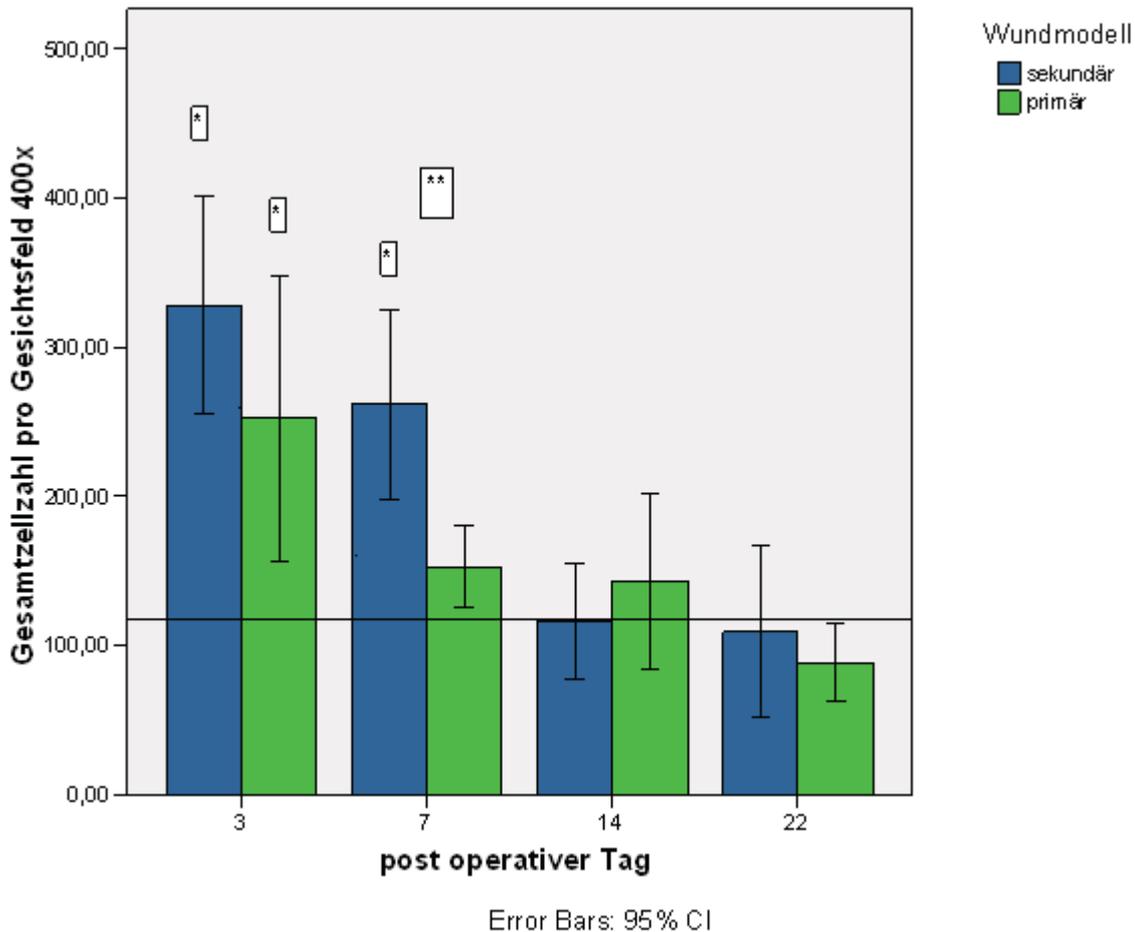


Abbildung 13: Darstellung der Gesamtzellzahl von Primärgruppe und Sekundärgruppe im Vergleich an den postoperativen Tagen 3, 7, 14 und 22

Referenzlinie zeigt die mittlere Zahl der Entzündungszellen in gesunder, unverwundeter Maushaut

*signifikante Ergebnisse einer Gruppe, **signifikante Ergebnisse zwischen beiden Gruppen

An Tag 3 post operationem zeigte sich bei primären Wunden eine signifikant suprabasale ($p=0,001$) Gesamtzellzahl. Auch in sekundären Wunden war die Gesamtzellzahl suprabasal an Tag 3 ($p=0,0001$), des Weiteren an Tag 7 ($p=0,0001$).

Im Vergleich steigt die Zellzahl der Sekundärwunde stärker an als im primären Wundmodell. An Tag 7 ist ein signifikanter Unterschied ($p=0,005$) der Sekundärgruppe im Vergleich zur Primärgruppe zu verzeichnen.

Primär ist im Vergleich zu sekundär höher an Tag 14 und verfehlt das Signifikanzniveau nur knapp mit $p=0,06$, (Abbildung 13).

5.2.2 Smad 2 Expression

Um die Korrelation der Gesamtzellzahl mit den aktiven Signaltransduktoren der TGF beta Signalkaskade zu untersuchen und um die Aktivität der Signaltransduktoren während der Wundheilung zu evaluieren, erfolgte die Bestimmung der Smad 2 Expression im Wundgebiet semiquantitativ mittels Western Blot.

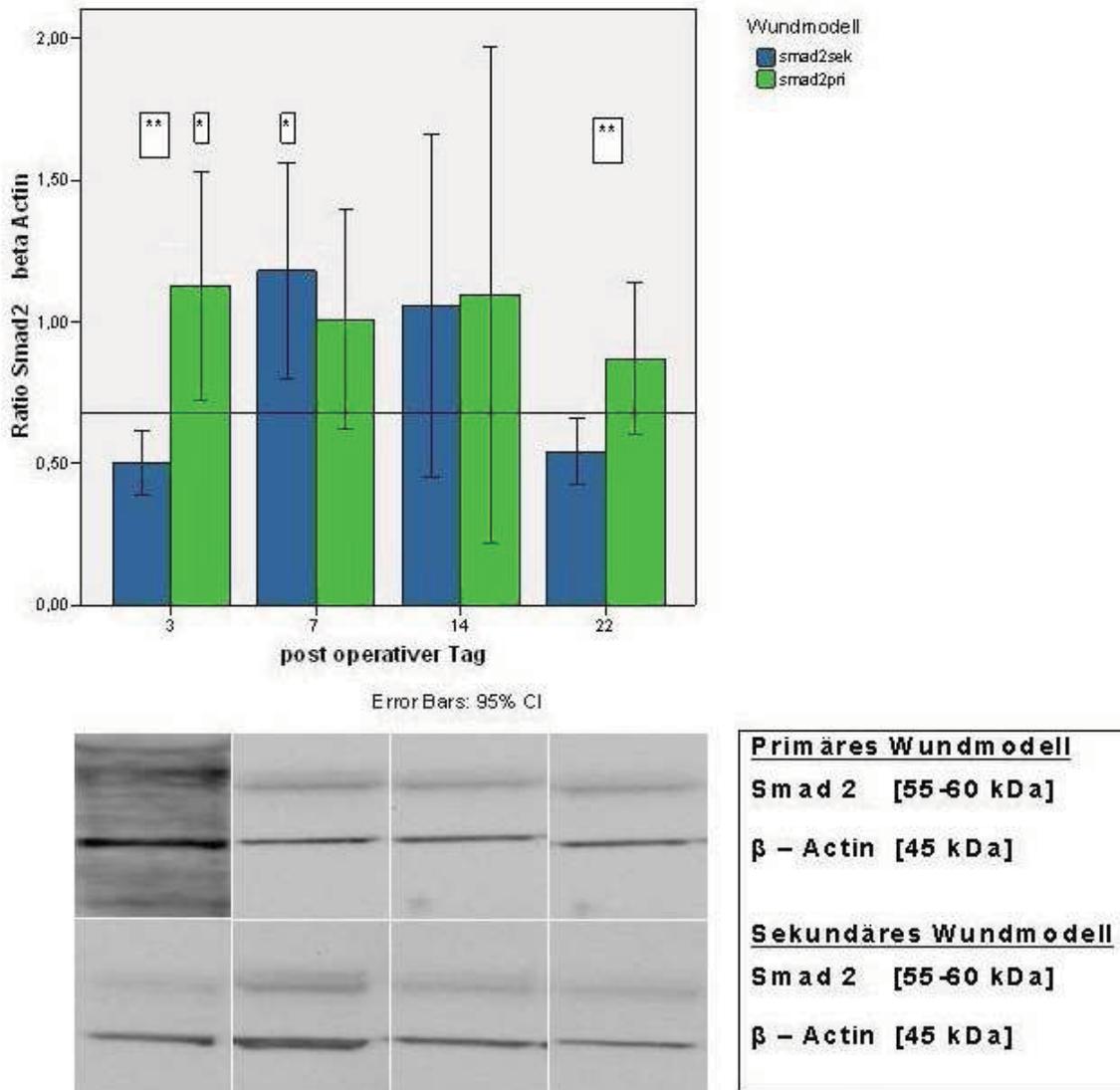


Abbildung 14: Verlauf der Smad 2 Expression über die Zeit in Abhängigkeit vom Wundmodell
Die Balken zeigen Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung, die horizontale Linie den Wert für gesunde Maushaut

*signifikante Ergebnisse einer Gruppe, **signifikante Ergebnisse zwischen beiden Gruppen

An Tag 3 post operationem zeigte sich bei primären Wunden eine signifikant suprabasale ($p=0,016$) Smad 2 Expression. In sekundären Wunden war die Expression an Tag 7 signifikant suprabasal ($p=0,004$).

Laut Globaltest (Kruskal-Wallis-Test) waren signifikante Unterschiede zwischen primärem und sekundärem Modell in der Smad 2 Expression zu verzeichnen.

Genauere Unterschiede waren mit dem Mann-Whitney-U Test zu bestimmen. Somit zeigten sich Signifikanzen an Tag 3 ($p=0,006$) und Tag 22 ($p=0,008$), (Abbildung 14).

5.2.3 Smad 7 Expression

Es erfolgte die Bestimmung der Smad 7 Expression im Wundgebiet semiquantitativ mittels Western Blot, um die Korrelation der Gesamtzellzahl mit den inhibitorischen Signaltransduktoren der TGF beta Signalkaskade zu untersuchen.

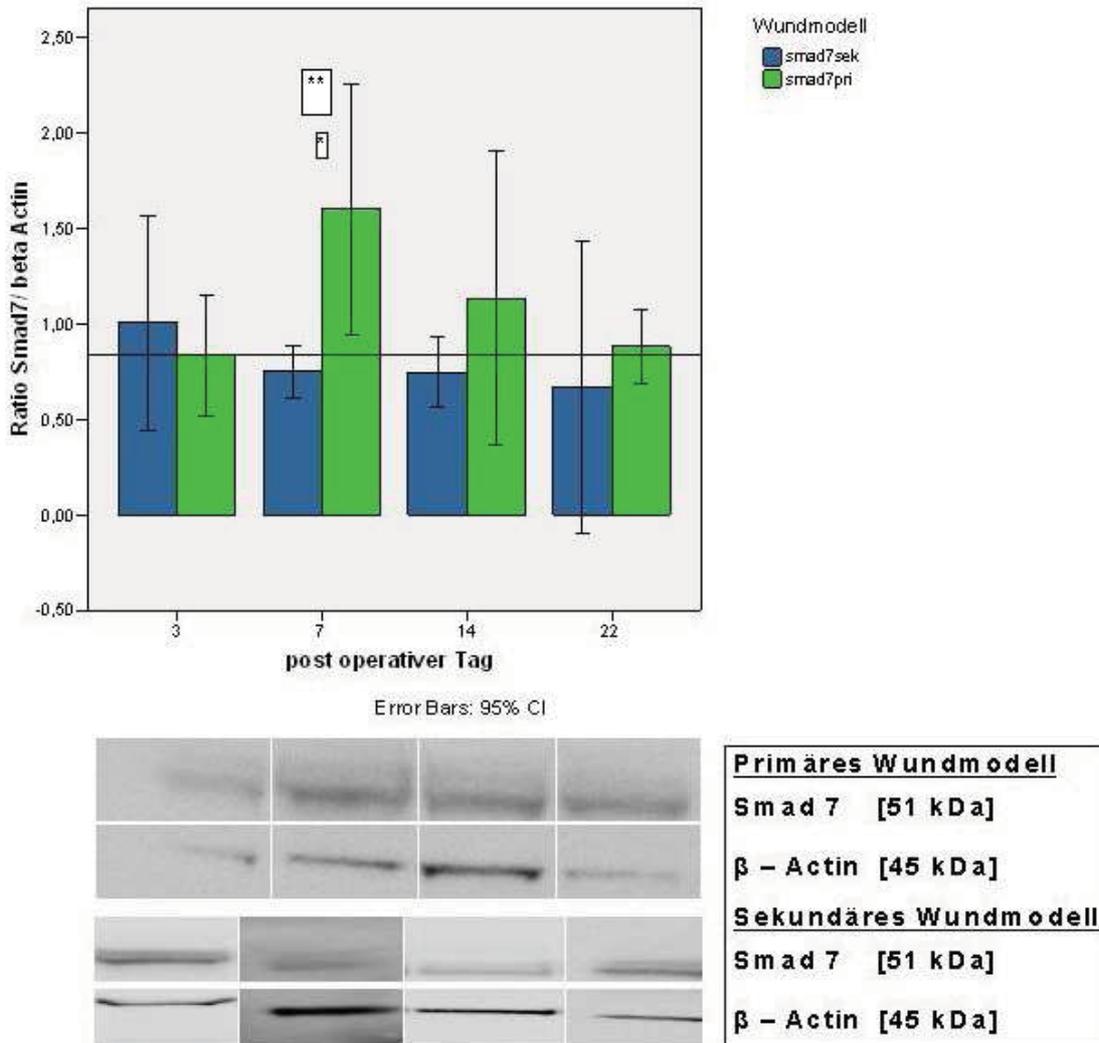


Abbildung 15: Verlauf der Smad 7 Expression über die Zeit in Abhängigkeit vom Wundmodell
Die Balken zeigen Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung, die horizontale Linie den Wert gesunder Maushaut

*signifikante Ergebnisse einer Gruppe, **signifikante Ergebnisse zwischen beiden Gruppen

An Tag 7 post operationem zeigte sich bei primären Wunden eine signifikant suprabasale ($p=0,048$) Smad 7 Expression.

Die Smad 7 Expression wies einen Unterschied der beiden Gruppen an Tag 7 mit einer Signifikanz von $p=0,006$ auf. Der Unterschied der beiden Gruppen an Tag 14 war mit $p=0,086$ nur knapp nicht

signifikant, (Abbildung 15).

5.2.4 Gesamtzellzahl und Korrelation mit den Signaltransduktoren

Primäres Wundmodell

Im allgemeinen Trend konnte man beobachten, dass in der Regel Gesamtzellzahl und Signaltransduktoren korrelieren.

An Tag 3 war bei Smad 7 im primären Wundmodell eine signifikante Korrelation zwischen Smad 7 und entzündlicher Infiltration zu verzeichnen ($r=1$, $p<0,01$).

Smad 7 zeigte weiterhin mit $r=-0,923$ ($p=0,009$) an Tag 7 eine hochsignifikante Korrelation und mit $r=-0,90$ ($p=0,037$) an Tag 14 eine signifikant starke Korrelation.

Bei primären Wunden bestand zwischen der entzündlichen Infiltration und Smad 2 eine positive Korrelation und Smad 7 eine negative Korrelation, (Abbildung 16 und 17).

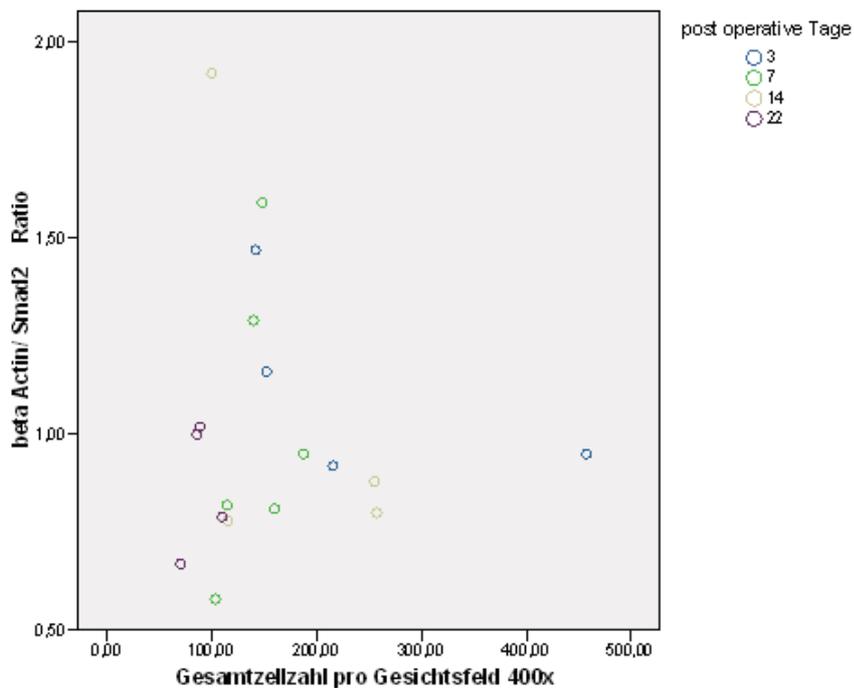


Abbildung 16: Zeigt die Korrelation der beta Actin/Smad 2 ratio und der entzündlichen Infiltration im primären Wundmodell

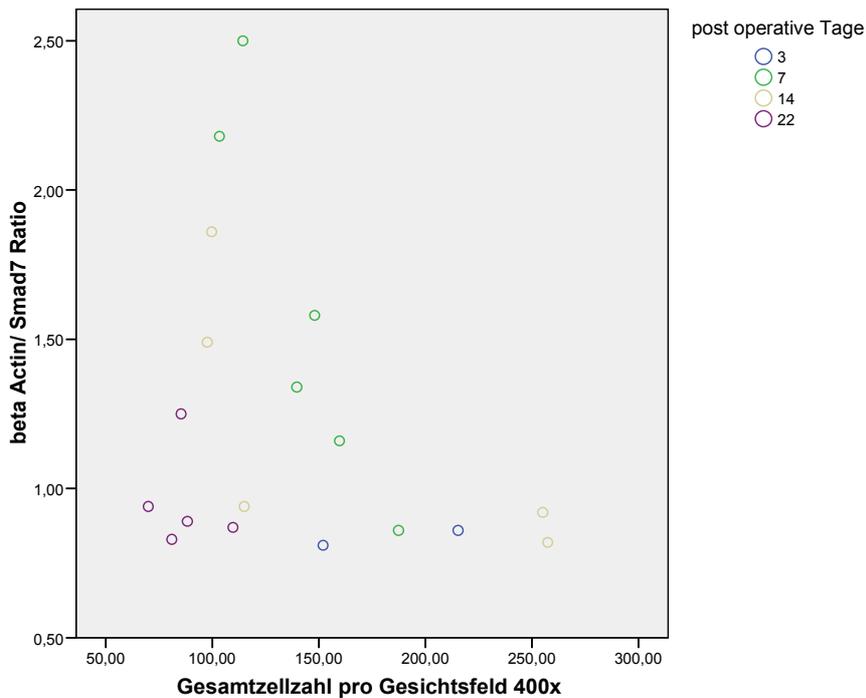


Abbildung 17: Zeigt die Korrelation der beta Actin/Smad 7 ratio und der entzündlichen Infiltration im primären Wundmodell

Sekundäres Wundmodell

Eine signifikant starke Korrelation fand sich an Tag 22 bei Smad 2 $r=-0,921$ ($p=0,026$). Weitere signifikante Korrelationen wurden nicht nachgewiesen, (Abbildung 18 und 19).

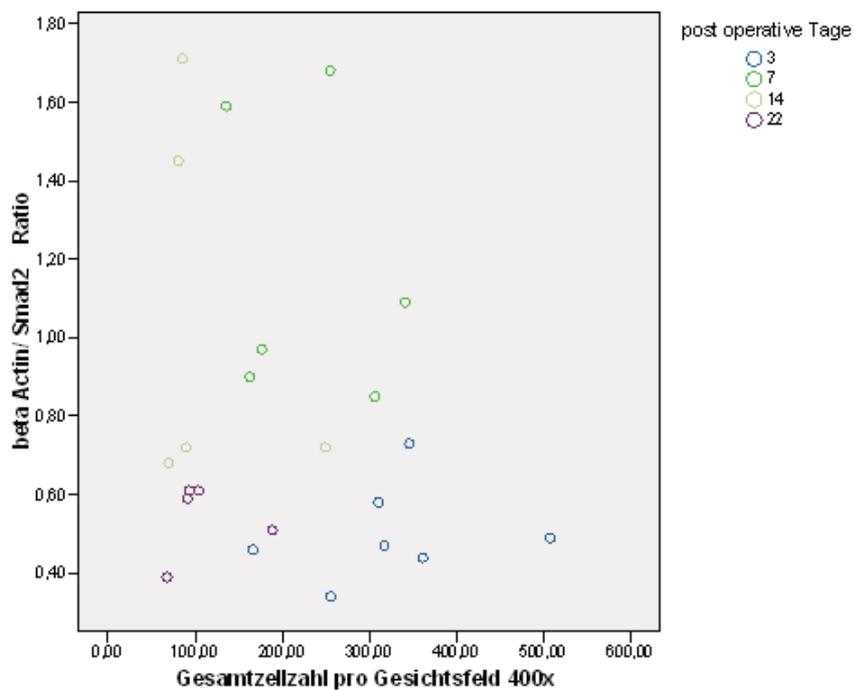


Abbildung 18: Zeigt die Korrelation der beta Actin/Smad 2 ratio und der entzündlichen Infiltration im sekundären Wundmodell

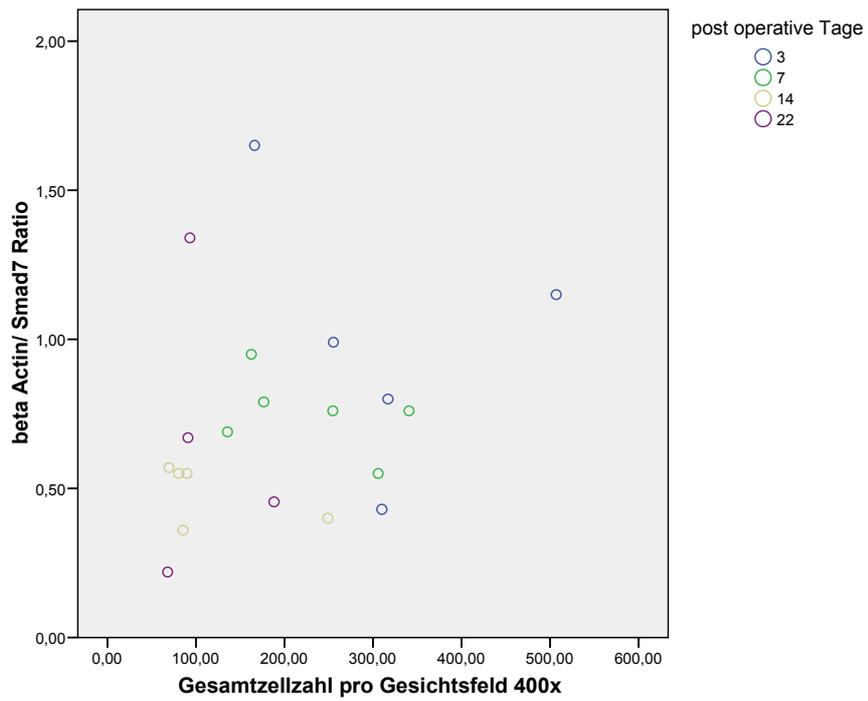


Abbildung 19: Zeigt die Korrelation der beta Actin/Smad 7 ratio und der entzündlichen Infiltration im sekundären Wundmodell

6 Diskussion

Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen entzündlicher Infiltration und Aktivität des TGF beta Pathways zwei verschiedener Wundmodelle an unterschiedlichen post operativen Tagen.

Die Untersuchung wurde anhand der Expression der TGF beta Signaltransduktoren Smad 2 und 7 durchgeführt, um über den Signalweg Rückschlüsse zu ziehen auf die Aktivität von TGF beta nach Wundsetzung. Dafür eignen sich Smads sehr gut (Penheiter et al. 2002, Liu et al. 2003). Um aufzuklären, wie sich TGF beta während der Wundheilung verhält, wurde die Smad 2 Phosphorylierung mittels Westernblot untersucht. Die Westernblotanalyse zeigte eine Expression von heterologen Smadproteinen während der Wundheilung, vor allem zu Beginn (Smad2 – primäres Wundmodell).

Eine erhöhte Smad 2 Expression deutet auf eine gesteigerte TGF beta Aktivität hin. In einer Studie wurden Smad 2 sowie Smad 7 nach TGF beta Stimulation von Fibroblasten hoch reguliert (Zandvoort et al. 2008). In der Studie von Nakao et al. (1997) wird belegt, dass TGF beta Stimulation von menschlichem Gewebe eine vermehrte Smad 2 Phosphorylierung zur Folge hatte (Nakao et al. 1997a).

Xie et al. verzeichneten ebenfalls einen Anstieg von Smad 2 nach Applikation von TGF beta (Xie et al. 2008).

Die Wundheilung zwei verschiedener Wundmodelle wurde anhand der Gesamtzellzahl quantifiziert und auf Korrelation mit den Signaltransduktoren Smad 2 und Smad 7 untersucht.

Es ergaben sich Unterschiede zwischen beiden Modellen an den verschiedenen post operativen Tagen sowohl in der Wundzellularität als auch in der Expression der Signaltransduktoren.

6.1 Entzündliche Infiltration

Die biologische Bedeutung der Entzündung ist die Abwehr und damit das Überwinden eines krankhaften Zustandes. Damit einher gehen Chemotaxis von Entzündungszellen und Entstehen von entzündlichen Infiltraten. Eine Rolle spielen dabei die unspezifische Abwehr (PMNL, Makrophagen) und die spezifische Abwehr (T-Lymphozyten). Die Ursachen entzündlicher Infiltrate sind vielfältig: Eine Wunde und somit heilungsassoziierte Infiltrate, eine Infektion oder traumatisierende Fremdkörper wie beispielsweise Nahtmaterial.

6.1.1 Physiologische Infiltration

Nach Wundsetzung kommt es zur Einblutung und Wundhämatombildung. Es bildet sich ein Fibringerüst aus und die verletzten Gefäße verschließen sich. Thrombozyten im Gerinnsel setzen Wachstumsfaktoren frei, die die weiteren Wundheilungsprozesse einleiten.

Es zeigte sich dann vor allem eine Migration von Entzündungszellen.

Das Heilungsgeschehen läuft in drei Phasen ab, von Welchen die Entzündung die erste Phase darstellt. Die Entzündungsphase wird geteilt in eine frühe und späte Phase. Die frühe Phase betrifft die ersten 24 Stunden und wird dominiert von neutrophilen Granulozyten (PMNL) die unter anderem von TGF beta angelockt werden und Zelltrümmer und Fremdkörper phagozytieren.

In den ersten Tagen werden dann vor allem Monozyten in den Wundbereich gelockt, welche sich zu Makrophagen umdifferenzieren. Diese sezernieren zusätzlich TGF beta, welches weitere Monozyten über Chemotaxis in den Wundbereich rekrutiert. Makrophagen spielen in allen Stadien der Wundheilung eine entscheidende Rolle, indem sie nicht nur phagozytieren, sondern auch wichtige Zytokine (IL-1, PDGF, EGF, FGF, ILGF) produzieren.

Weiterhin sind sie involviert in den Prozess der EZM Neubildung (Faler et al. 2006, Delavary et al, Beanes et al. 2003).

Bis zum dritten Tag sind vor allem Entzündungszellen im Wundgebiet. Drei bis zehn Tage nach Wundsetzung geht die Heilung über in die proliferative Phase die gekennzeichnet ist durch Angiogenese, Deposition und Epithelisierung und in welcher vermehrt Fibroblasten auftreten und EZM gebildet wird.

Die dritte Phase, der Gewebeumbau, ist gekennzeichnet durch die Umdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, was zu einer Wundkontraktion führt (Gurtner et al. 2008).

6.1.2 Infiltration als Antwort auf Infektion

Eine große Rolle spielt unter anderem antiseptisches Vorgehen zur Vermeidung einer Infektion durch Krankheitserreger. Durch bakterielle Kontamination findet ebenso eine Infiltration von Entzündungszellen statt und verringert somit die Aussagekraft der Studie hinsichtlich der Interpretation der physiologischen Wundheilung.

Mit den verwendeten Methoden war es nicht möglich zwischen einer Infektion und einer heilungsassoziierten Infiltration zu unterscheiden.

6.1.3 Infiltration aufgrund von Reizfaktoren

Der physiologische Ablauf der Wundheilung wird durch die Anwesenheit eines Fremdkörpers maßgeblich beeinflusst und mündet unter Umständen in einer chronischen Entzündungsreaktion.

Anwesenheit von Nahtmaterial kann eine Entzündungsreaktion triggern oder eine ungünstige

Narbenformation hervorrufen. Vor allem Catgut Nahtmaterial kann zu Wunddehiszenzen beitragen (Gabrielli et al. 2001, Willatt et al. 1988).

6.1.4 Ergebnisse (entzündliche Infiltration)

Die Zellzahl wurde anhand des leukocyte index nach Reid et al erhoben (Reid et al. 2004). Hämatogene und histiogene Zellen sind allerdings nur mit speziellen Markierungsmethoden im Wundfeld voneinander zu unterscheiden (Lindner 1982). Das Mausmodell ist als Wundmodell für kutane Wundheilungsstudien geeignet um Entzündung, Chemotaxis, Epithelialisierung, Angiogenese, Matrixproduktion und Kontraktion zu beurteilen. Allerdings verfügen Mäuse über einen 3-4fach schnelleren Metabolismus, weswegen die Wundheilung schneller als in humanen Modellen abläuft. Des Weiteren verfügen Mäuse über anatomische Strukturen (subcutaneous panniculus carnosus muscle), welche die Wundheilung positiv beeinflussen (Ksander et al. 1990a, Ksander et al. 1990b, Gottrup et al. 2000, Schultze-Mosgau et al. 2002).

Nach Wundsetzung zeigte sich an Tag 3 primär ein signifikant suprabasales lymphozytäres Infiltrat ($p=0,001$) welches durch die Einwanderung von Entzündungszellen entstanden ist. Im sekundären Wundmodell fanden sich ebenso ($p=0,0001$) an Tag 3 sowie an Tag 7 ($p=0,0001$) signifikante Infiltrate.

An Tag 7 bestand ein signifikanter Unterschied zwischen dem primären und dem sekundären Wundmodell ($p=0,005$). Die Erklärung hierfür ist der Verschluss der primären Wunde mit Nahtmaterial, während die sekundäre Wunde der freien Granulation überlassen wurde.

Im sekundären Wundmodell waren vermehrt Infiltrate, vor allem bis zum dritten Tag zu verzeichnen. Zwischen dem dritten und zehnten Tag findet eine Formation von neuem Gewebe statt indem Fibroblasten proliferieren und somit in der Wunde mit freier Granulation eine vermehrte Fibroblastenbildung mit gesteigerter EZM Synthese sowie vermehrt Keratinozytenmigration erfolgt.

6.2 Signalweg

6.2.1 TGF beta

TGF beta ist der Prototyp eines multifunktionalen Zytokins. Es ist ein Syntheseprodukt von Blutzellen wie Thrombozyten, Makrophagen und Lymphozyten (Wahl et al. 1987).

Im Mittelpunkt stehen Zielgene, welche unmittelbare Effekte auf den Zellzyklus haben. Nach Applikation von TGF beta im Wundbereich konnte eine beschleunigte Wundheilung festgestellt werden. Dies ging einher mit einer verbesserten Wundstärke, einem erhöhten Influx an

Entzündungszellen und einer erhöhten Fibroblastenproliferation (Mustoe et al. 1987). Sporn et al. wiesen in ihrer Studie nach, dass die Applikation von TGF beta Wundheilung beschleunigen kann (Sporn et al. 1983).

Der TGF beta Signalweg spielt in allen Phasen der Wundheilung eine wichtige Rolle indem es Zellen in der Wundheilung reguliert. In der frühen Wundheilungsphase wird TGF beta vor allem von Blutplättchen sezerniert. Des Weiteren wird das Zytokin von Keratinozyten, welche die Hautbarriere rekonstruieren, von Fibroblasten welche für die Matrixsynthese zuständig sind und von Monozyten, welche in frühen Wundstadien migrieren und weitere die Wundheilung beeinflussende Zytokine produzieren, sezerniert (Ignatz und Massague 1986, Varga 2002, Ashcroft et al. 1999, Massague 1999).

In diesen Zellen ist es aktiv und steuert deren Funktion durch Modulation der Transkription im Zellkern. Der Pathway reguliert in Monozyten die TGF beta Produktion, die Migration von Monozyten in die Wunde und die Produktion von Proteaseinhibitoren. In Fibroblasten regelt es ebenso die Produktion von TGF beta und Chemotaxis, sowie die Proliferation und Produktion von EZM. In Endothelzellen bewirkt das Zytokin eine Migration für die Angiogenese (Varga 2002, Faler et al. 2006).

B-Lymphozyten besitzen Rezeptoren für TGF beta. Über diese werden wichtige Funktionen der B-Lymphozyten gesteuert. Des Weiteren inhibiert TGF beta die IL-2 abhängige Synthese von B-Zellen. Das Zytokin TGF beta spielt deshalb eine wichtige Rolle in der Regulation der B-Zellen. Zudem sind Effekte auf Entwicklung und Funktion von T-Zellen bekannt (Kehrl et al. 1986a, Letterio und Roberts 1996, Kehrl et al. 1986b).

6.2.2 Smads

R-Smads werden direkt vom Typ I-Rezeptor phosphoryliert und somit aktiviert. Smad 4 ist ein Co-Smad, welcher zusammen mit Smad 2 und 3 einen Komplex bildet. Dieser Komplex tritt in den Zellkern ein (Kawabata et al. 1999).

Smads besitzen eine N-Terminal (MH 1) und eine C-Terminal (MH 2) Domäne und eine Verbindungsregion. Die MH 1 Domäne hat DNA Bindungsaktivität. Smad 3 und 4 binden über diese Region direkt an DNA. Diese Aktivität wird inhibiert durch die MH 2 Domäne.

Die MH 1 Domäne hemmt wiederum die Transkriptionsaktivität der MH 2 Domäne. Inhibitorische Smads besitzen nur eine MH 2 Domäne.

Smads befinden sich entweder im Ruhestadium oder im aktivierten Stadium.

Im Ruhestadium (in Abwesenheit von Ligandenstimulation) befinden sich Smads als Homooligomere im Zytoplasma. Nach Ligandenbindung am Rezeptor folgt die Phosphorylierung, Heterooligomerbildung und Aktivierung der Smads 2 und 3 am C-terminal Motiv SS(V/M)S.

Dieses Motiv fehlt in Smad 7.

Der Antikörper beim Westernblot richtete sich gegen das N-Terminal von Smad 2 und 7 und detektierte somit die aktiven Smads in Zellkern und Zytoplasma.

Rezeptoraktivierte Smads verbinden sich mit dem Co-Smad 4, welcher als Partner zur Aktivierung der Transkription erforderlich ist und führen ihn mit sich in den Kern (Massague 1998).

Smad 7 ist ein inhibitorischer Smad. Inhibitorische Smads binden an den TGF beta I-Rezeptor und konkurrieren mit Smad 2/3 um den Bindungsplatz an der Zellmembran.

Smad-Phosphorylierung wird blockiert und somit der TGF beta Signalweg unterbunden (Varga 2002, Yan et al. 2009).

6.2.3 Aktivität des TGF beta Pathways

Die Wirkung von TGF beta auf die Zielzelle wird über Rezeptoren in der Zellmembran vermittelt, welche eine extrazelluläre Domäne zur Bindung des Liganden, eine transmembrane und eine zytoplasmatische, Serin/Threonin-Kinase-tragende Domäne besitzen (Massague 1987, Massague et al. 2005).

Smads sind entscheidend für den TGF beta Signalweg. Die Bedeutung der Smad Proteine wurde in verschiedenen Studien untersucht.

Die Überexpression von Smad 2 führte zu verzögerter Heilung kutaner Wunden. Die Verzögerung der Heilung resultierte aus verminderter Einwanderung von Keratinozyten (Hosokawa et al. 2005). Mäuse mit Smad 3 knock-out zeigten dahingegen beschleunigte Wundheilung (Ashcroft et al. 1999).

Wundheilung wird aber möglicherweise von anatomischen Strukturen beeinflusst, da in den Studien unterschiedliche Wundmodelle zum Teil zu unterschiedlichen Ergebnissen führten.

In der Studie von Kim et al. (2005) untersuchte man die Wirkungen der R-Smads 2 und 3. Es wurde unter anderem eruiert, dass zytostatische Signale wie Zellproliferation in Zellen ohne Smad 2 (in vitro) verringert waren (Kim et al. 2005).

TGF beta bindet zuerst an den Typ II-Rezeptor, welcher dann durch seine Kinasedomäne den Typ I-Rezeptor (in seiner GS-Domäne) phosphoryliert und somit aktiviert. Es entsteht vorübergehend ein Komplex aus Rezeptor I-und II. Ohne den Typ II-Rezeptor ist eine Bindung des Liganden an den Typ I-Rezeptor offenbar nicht möglich (Wieser et al. 1993, Massague und Weis-Garcia 1996, Heldin et al. 1997).

Der phosphorylierte Typ I-Rezeptor leitet das Signal weiter an die R-Smads. Sie werden direkt vom Typ I-Rezeptor phosphoryliert.

Smad Cofactor SARA wird als Ankerprotein beschrieben, welches R-Smads zum TGF beta Rezeptorkomplex rekrutiert. SARA besitzt eine Smadbindungsdomäne (SBD), welche mit Smad 2

und 3 interagiert und eine C-Terminal Rezeptorkomplexinteraktionsdomäne. SARA spielt eine Rolle in der Präsentation von R-Smads am Rezeptorkomplex (Penheiter et al. 2002, Wrana und Attisano 2000, Runyan et al. 2005).

Nach der Phosphorylierung durch den Rezeptor unterbricht die Verbindung der MH 1 und MH 2-Domänen und Smads formen heteromere Komplexe mit dem Co-Smad an der MH 2 Domäne. Der R-Smad-Co-Smad Komplex wandert in den Zellkern mit dem Ziel, die Transkription der Zielgene zu regulieren.

Im Zellkern interagieren sie mit verschiedenen DNA Bindungsproteinen, zum Beispiel FAST1. FAST 1 ist ein Transkriptionsfaktor. Er verbindet sich mit Smad/CoSmad zu einem Komplex. Dies führt zur Aktivierung der Transkription. Zusammen mit den Smads binden sie an einer Promoterregion. Sie binden unter anderem an transkriptionale Coaktivatoren und Corepressoren, welche die Acetylierung oder Nichtacetylierung von Histonen induzieren und somit Transkription fördern oder hemmen (Itoh et al. 2000, Kawabata et al. 1999).

6.3 Myofibroblastenaktivität

Ein wichtiger Schritt des Wundheilungsprozesses ist die Produktion neuer EZM durch die Fibroblasten. Fibroblasten sezernieren extrazelluläre Matrixkomponenten wie Kollagen I und III (Gabbiani 2003).

Fibroblasten wandeln sich durch mechanische Reize um in Myofibroblasten, welche für die Wundkontraktion wesentlich sind. TGF beta induziert zusätzlich die Umwandlung der Fibroblasten in Myofibroblasten und spielt eine zentrale Rolle in der Umdifferenzierung (Montesano und Orci 1988, Desmouliere et al. 1993, Vaughan et al. 2000, Malmstrom et al. 2004, Hinz 2007, Hinz et al. 2007). Der ruhende Fibroblast im gesunden Gewebe besitzt keinerlei kontraktile Elemente.

Der Mikrofilamentapparat des Myofibroblasten beinhaltet Aktin und Myosin, zudem SMA.

Problematisch ist vor allem die sekundäre Wundheilung, da es durch Wundkontraktion zu Funktionseinschränkungen kommen kann. Die Aktivität der Myofibroblasten spielt dabei eine entscheidende Rolle. Bei primärer Wundheilung findet man diese Problematik eher nicht.

Smad 2 und 7 eignen sich als Signaltransduktoren von TGF beta gut zur funktionellen Charakterisierung der Myofibroblastenaktivität, (Tabelle 8 und 9):

Tabelle 8 zeigt Referenzen für Smad 2 als Signaltransduktor von TGF beta und Aktivator der Differenzierung von Fibroblast in Myofibroblast

Autor	Titel
(Piek et al. 2001)	Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts
(You und Kruse 2002)	Differential effect of activin A and BMP-7 on myofibroblast differentiation and the role of the Smad signaling pathway
(Liu et al. 2003)	Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent
(Evans et al. 2003)	TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins
(Gu et al. 2007)	Effect of TGF-beta/Smad signaling pathway on lung myofibroblast differentiation
(Sebe et al. 2008)	Transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle cell actin expression in renal proximal tubular cells is regulated by p38beta mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated protein kinase1,2 and the Smad signalling during epithelial-myofibroblast transdifferentiation
(George 2009)	Regulation of myofibroblast differentiation by convergence of the Wnt and TGF-beta1/Smad signaling pathways

Smad 7 hat als TGF beta Inhibitor einen hemmenden Effekt auf die TGF beta induzierte Myofibroblastendifferenzierung. In der Studie von Sobral et al verringerte sich durch Überexpression von Smad 7 die Phosphorylierung von Smad 2 und die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten (Sobral et al.). Liu et al stellten fest, dass eine verringerte Smad 7 Expression mit einer gesteigerten alpha SMA Bildung in Zusammenhang steht (Liu et al. 2005), (Tabelle 9).

Tabelle 9 zeigt Referenzen für Smad 7 als Inhibitor der Differenzierung von Fibroblast in Myofibroblast

Autor	Titel
(Kopp et al. 2005)	Abrogation of transforming growth factor-beta signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts
(Liu et al. 2005)	Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and expressions of hepatocyte growth factor and Smad7 in renal tissues of rat with experimental diabetes
(Shukla et al. 2009)	Hepatocyte growth factor inhibits epithelial to myofibroblast transition in lung cells via Smad7
(Sobral et al.)	Smad7 Blocks Transforming Growth Factor-beta1-Induced Gingival Fibroblast-Myofibroblast Transition via Inhibitory Regulation of Smad2 and Connective Tissue Growth Factor

6.4 Ergebnisse

Tag 3

Nach Auswertung der Ergebnisse war die Smad 2 Expression primär an Tag 3 signifikant suprabasal ($p=0,016$) und auch die Wundzellularität war signifikant suprabasal ($p=0,001$).

In der Studie von Lin et al. wurde die Reaktion von TGF beta nach Wundsetzung an Mäusen untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass nach Wundsetzung ein Anstieg von TGF beta zu verzeichnen ist (Lin et al. 2005). TGF beta ist ein wichtiges Zytokin im Wundheilungsprozess. Es rekrutiert unter anderem Entzündungszellen, anfangs PMNL, später Monozyten, in den Wundbereich (Mustoe et al. 1987, Amento und Beck 1991, Faler et al. 2006).

Anzunehmen ist des Weiteren, dass nach TGF beta Anstieg ein Smad 2 Anstieg folgt. Smad 2 ist ein intrazellulärer Mediator des TGF beta Signalweges. Das Protein leitet die Signale weiter in den Zellkern und steht somit funktionell im Dienst von TGF beta (Derynck et al. 1998, Massague 1998). Die biologische Funktion von Smad 2 ist noch nicht genau erforscht, da Smad 2 knock-out Mäuse schon als Embryos sterben (Yagi et al. 1999). Smad 2 hat eine wichtige Funktion in der frühen Entwicklung und knock-out Mausembryos zeigen Defekte in der Entwicklung unter anderem der Mandibula und der Augen (Nomura und Li 1998).

Es gibt verschiedene Studien welche belegen, dass Smad 2 in den Wundheilungsprozess involviert ist (Ishida et al. 2004, Cao et al. 2002).

Hosokawa et al. untersuchten die Rolle von Smad 2 in der Wundheilung und konnten dem Protein

eine wichtige Rolle in der Keratinozytenmigration und Formation von extrazellulärer Matrix während der Wundheilung zuschreiben. Nach Überexpression von Smad 2 war allerdings verzögerte Wundheilung die Folge (Hosokawa et al. 2005).

Die Smad 7 Expression war im primären Wundmodell auf dem Niveau von gesunder Maushaut. Smad 7 als Antagonist von TGF beta agiert in einem wichtigen negativen Feedbackloop (Varga 2002, Yan et al. 2009). An Tag 3 ist noch kein Rückkopplungsmechanismus in Gang gesetzt worden, der die Smad 7 Expression erhöht und somit den TGF beta Signalweg blockiert.

An Tag 3 im sekundären Wundmodell konnten signifikant suprabasale ($p=0,0001$) Ergebnisse hinsichtlich der Infiltration festgestellt werden. Der Smad 2 Wert war an diesem Tag infrabasal. Trotz der schwachen Smad 2 Expression, war histomorphometrisch ein großer Influx an Entzündungszellen schon an Tag 3 zu verzeichnen. Die Migration wird unter anderem auch durch proinflammatorische Zytokine wie IL 1, TNF alpha und IFN gamma gesteuert (Fraser 2007).

Die Smad 7 Expression sekundär war leicht suprabasal. Smad 7 wurde identifiziert als Inhibitor von TGF beta mit antiinflammatorischer und antifibrotischer Wirkung (Nakao et al. 1997b, Yan et al. 2009).

Signifikante Unterschiede an Tag 3 hinsichtlich Smad 2 Expression zwischen primärem und sekundärem Modell lagen vor ($p=0,006$). Dies zeigte, dass unterschiedliche Wundmodelle eine unterschiedliche Expression von Signalmediatoren zur Folge haben können.

Tag 7

An Tag 7 lagen die Werte der Wundzellularität der primären Wunden suprabasal, sowie auch die Werte von Smad 2. Gehäuft findet man in diesem Stadium Fibroblasten.

Die Smad 7 Expression primär war signifikant suprabasal ($p=0,048$). Der Anstieg unterliegt einem Rückkopplungsmechanismus. Mit steigender TGF beta Aktivität wird der Smad 7 Rückkopplungsmechanismus aktiviert (Heldin et al. 1997, Whitman 1997).

Inhibitorische Smads binden an den TGF beta I-Rezeptor und konkurrieren mit Smad 2 und Smad 3 um den Bindungsplatz an der Zellmembran. Die Smad-Phosphorylierung und somit Aktivierung wird blockiert und der TGF beta Signalweg unterbunden (Nakao et al. 1997b, Kretschmar et al. 1997, Varga 2002). Oder inhibitorische Smads gehen eine Verbindung mit dem Co-Smad 4 der R-Smads ein und verhindern so die Komplexbildung, welche in den Zellkern wandern kann (Itoh und ten Dijke 2007).

Smad 7 hemmt zudem die alpha-SMA Expression und nimmt somit Einfluss auf die Kontraktilität einer Wunde (Kopp et al. 2005).

Die Studie von Fraser (2007) belegte die hemmende Wirkung von Smad 7 auf den Influx von Entzündungszellen. Smad 7 inhibiert die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL 1, TNF

alpha und IFN gamma. Es unterbindet sozusagen den proinflammatorischen Signalweg (Fraser 2007).

Smad 7 wird als wichtiger Mediator von TGF beta Signalen betrachtet, welcher vor allem die proinflammatorischen Signale von TNF alpha hemmt. Eine Studie von Wang et. al. (2005) belegte die antiinflammatorische Wirkung von Smad 7 (Wang et al. 2005). Weiterhin bestätigt wird dies von der Arbeitsgruppe um Hong (Hong et al. 2007).

Sekundär lagen die Werte der Wundzellularityt signifikant suprabasal ($p=0,0001$) und die Werte für die Smad 2 Expression waren an Tag 7 ebenfalls signifikant suprabasal ($p=0,004$).

Wie schon beschrieben hängt dies mit der TGF beta Aktivierung nach Wundsetzung zusammen, welche in den ersten Tagen für die Infiltration von Entzündungszellen und am siebten Tag vor allem für die Proliferation von Fibroblasten verantwortlich ist.

Signifikante Unterschiede zwischen dem primären und sekundären Wundmodell in der Wundzellularityt waren zu verzeichnen ($p=0,005$), ebenso bestand ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,006$) bezüglich der Smad 7 Expression.

Da primär die Smad 7 Expression höher war als sekundär und signifikante Unterschiede in der Wundzellularityt zwischen beiden Modellen an Tag 7 zu verzeichnen waren (sekundär wesentlich höher als primär), wurde die Annahme bestätigt, dass im primären Modell der negative Feedbackloop wie in der Literatur beschrieben eingesetzt hatte, sekundär dies aber nicht der Fall war. Sekundär fand sich eine infrabasale Smad 7 Expression. Sekundär ist kein Rückkopplungsmechanismus erkennbar.

Das Zeitmanagement der Signalmediatoren spielt eine wichtige Rolle im Feedbackloop. Es weist laut der Ergebnisse in den Wundmodellen einen signifikanten Unterschied auf.

Die primäre Wunde war in der Ausdehnung kleiner als die sekundäre Wunde, welche der freien Granulation überlassen wurde. Folglich wurden mehr Zellen benötigt um den Defekt zu schließen und das zeitliche Verhalten der Wunden differierte. Demnach variierte die Expression der Zytokine. Die Smad 7 Expression war sekundär infrabasal, während sie primär suprabasal war. Die Zellzahl war primär entsprechend niedriger (signifikanter Unterschied ($p=0,005$)), da Smad 7 die Infiltration und auch Proliferation hemmt, indem es Smad 2 blockiert (Varga 2002).

Tag 14

Die Smad 2 Expression war primär und sekundär suprabasal. Möglicherweise stellte Primär das Nahtmaterial einen Reiz dar und es befanden sich Infiltrate aufgrund einer Fremdkörperreaktion in der Wunde.

TGF beta wird unter anderem ein Apoptose fördernder Effekt zu gesprochen (Wakefield und Stuelten 2007). Smad 7 blockiert proapoptotische Signale (Moustakas und Heldin 2005). In Smad 7

knock-out Mäusen war ein Anstieg der Apoptoserate zu verzeichnen (Chen et al. 2009).

Sekundär war Smad 7 infrabasal, konnte also die proapoptotischen Signale nicht unterbinden und somit fand man eine gehäufte Apoptose der Myofibroblasten. Die Erwartungen gingen eher in Richtung verzögerte Apoptose der Myofibroblasten im sekundären Modell. Das fehlende Protein Smad 7 schien hier eine zentrale Rolle einzunehmen.

Ergebnisse zwischen den beiden Modellen bezogen auf die Zellularität verfehlten das Signifikanzniveau nur knapp ($p=0,06$).

Für Unterschiede zwischen den Gruppen primär und sekundär bezogen auf Smad 7 wurde das Signifikanzniveau ebenso nur knapp verfehlt ($p=0,086$).

Tag 22

Die Gesamtzellzahl an Tag 22 war bei beiden Modellen infrabasal.

Es bestanden signifikante Unterschiede ($p=0,008$) zwischen den beiden Modellen bezüglich der Smad 2 Expression. Primär war die Smad 2 Expression suprabasal. Smad 7 war leicht suprabasal. Sekundär war die Smad 2 Expression infrabasal. Die Smad 7 Expression sekundär war ebenso infrabasal.

Xie et al. (2008) untersuchten die Expression der Smad Proteine 2 und 7 in Narbengewebe. Sie konnten im Vergleich zu gesundem Gewebe einen Anstieg von Smad 2 verzeichnen. Nach Applikation von TGF beta stieg die Smad 2 Rate nochmals an. Smad 7 wurde in gesundem Gewebe nachgewiesen. Nach Applikation von TGF beta stieg Smad 7 in gesundem Gewebe an. In unserem Modell vergleichbar mit der primären verschlossenen Wunde. Nach Stimulation mit TGF beta des hypertrophen Narbengewebes stieg Smad 7 nicht an. Vergleichbar mit unserem Sekundärmodell.

Die Studie von Xie zeigte, dass Smad 7 Expression mit der Stimulation von TGF beta zusammen hängt. Somit ist der autoinhibitorische Loop möglicherweise gestört (Xie et al. 2008).

Smad 7 Mangel in der Wundumgebung mündet in der Regel in übermäßiger Aktivität von TGF beta und führt zu unregelmäßiger Matrixakkumulation (Varga 2002).

6.5 Korrelation

Im allgemeinen Trend konnte man beobachten (Korrelation nach Pearson), dass in der Regel im primären Modell Gesamtzellzahl und Signaltransduktoren korrelierten und zwar in der Form, dass bei zunehmendem Smad 2 die Zellzahl stieg und bei abnehmendem Smad 2 die Zellzahl sank.

Bei Smad 7 war das Verhältnis zur Zellzahl gegensinnig. Stieg Smad 7 sank die Zellzahl und umgekehrt.

Ein Trend, wie festzustellen im primären Modell, konnte im sekundären Modell leider nicht

verzeichnet werden.

Die Smad 2 Expression korrelierte zwar mit der Gesamtzellzahl an Tag 3 ($r=0,653$) in sofern, dass beide stiegen, an Tag 7 ($r=-0,602$) führte der Wert der Korrelation aber wiederum zu einer gegensinnigen Aussage.

Diese Schwankungen waren im Sekundärmodell bei jedem Protein zu finden, d.h. ein direkter Zusammenhang mit der Zellularität der Wunden schien nicht zu bestehen.

6.6 Limitationen der Studie

In-vivo- Studien am Menschen sind aus ethischen Gründen nur in limitierter Form durchzuführen. Aus diesem Grund werden verschiedene Tierstudien herangezogen. Es wird versucht die Studie einerseits ethisch vertretbar und andererseits die klinische Situation so repräsentativ wie möglich zu gestalten. Tiermodelle sind nutzbringend aber auch weniger repräsentativ. Hautwundenmodelle beinhalten das Setzen eines Defektes, welcher reepithelialisiert und das Erfassen verschiedener Parameter (Inflammation, Epithelialisation, Kontraktion, Chemotaxis). Allerdings sind die Strukturen im Tiermodell nicht komplett übereinstimmend mit den menschlichen Strukturen und somit ist der direkte Vergleich nur eingeschränkt möglich. Die Wundheilung der Maus ist zudem beschleunigt aufgrund des bis zu 4mal höheren Metabolismus (Gottrup et al. 2000, Schultze-Mosgau et al. 2003).

Für die Tierzahl wurde eine Fallzahlberechnung durchgeführt (nach $n = 1 + 2C (s/d)^2$). Somit ist die Zahl der Tiere als statistisch relevant anzusehen (Snedecor G 1989).

In der histomorphometrischen Auswertung sind Zellen allerdings nur mit speziellen Markierungsmethoden im Wundfeld voneinander zu unterscheiden (J. Lindner 1982).

Zur Proteinanalyse standen verschiedene Methoden (ELISA, RT-PCR, Westernblot) zur Auswahl. Es wurde bewusst die Methode des Westernblot gewählt, da Proteine besonders die Funktionalität des Organismus widerspiegeln. So konnten vor allem die aktivierten Smads in Zellkern und Plasma detektiert werden (Schultze-Mosgau et al. 2004b, Schultze-Mosgau et al. 2004a). Allerdings besteht die Gefahr, dass Ergebnisse durch Blut- und Fettzellen verändert werden.

Die RT-PCR ist wesentlich sensitiver als Westernblot oder ELISA, unterliegt allerdings Einschränkungen in der Funktionalität und die Probengewinnung ist sehr aufwendig.

7 Schlussfolgerungen

Bezogen auf die Wundzellulartität war an Tag 3 post operationem ein deutlicher Anstieg bei beiden Wundheilungsmodellen (primär und sekundär) zu verzeichnen. Es bestand allerdings ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Modellen ($p=0,006$). Primär an Tag 3 fand sich ein signifikanter Smad 2 Anstieg ($p=0,016$), sekundär war Smad 2 infrabasal.

An Tag 7 post operationem gab es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Zellzahl ($p=0,05$). Sekundär fand sich eine signifikante Zellzahl die deutlich höher als primär war ($p=0,0001$).

Sekundär an Tag 7 war eine signifikante Steigerung der Smad 2 Expression festzustellen ($p=0,004$), primär war die Smad 2 Expression ebenfalls suprabasal.

An Tag 7 post operationem war die Expression von Smad 7 im primären Modell signifikant erhöht ($p=0,048$), während Smad 7 sekundär infrabasal blieb. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,006$).

An Tag 22 post operationem fand sich erneut ein Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich Smad 2 ($p=0,0008$).

Zwischen Signaltransduktoren und Zellgehalt bestand im primären Modell eine deutliche Korrelation, Sekundär war dies leider nicht festzustellen.

Mit der Methodik dieser Studie konnte das Expressionsprofil der Signaltransduktoren des TGF beta Signalweges sowie deren Zusammenhang mit der Zellzahl nach Wundsetzung an den post operativen Tagen untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigten Unterschiede zwischen den beiden Wundmodellen und mögliche Ursachen für die Störung während der freien Granulation von sekundären Wunden.

Es wurden signifikante Unterschiede im TGF beta Signalweg zwischen primärer und sekundärer Wundheilung an den verschiedenen post operativen Tagen herausgestellt. Der Zellgehalt der Proteine Smad 2 und 7, die als Variablen fungierten, wies Unterschiede zwischen beiden Modellen auf.

Die Untersuchung zeigte, dass die Problematik der sekundären Wundheilung möglicherweise auf eine Deregulation des TGF beta induzierten Smad 7 Rückkopplungsmechanismus zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse weisen auf eine Störung der TGF beta vermittelten Rückkopplungshemmung hin. Es zeigte sich ein Unterschied zwischen beiden Wundmodellen hinsichtlich der Expression der Signalproteine als auch der Zellzahl. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf den Einfluss von TGF beta auf die Wundheilung, insbesondere während der sekundären Wundheilung.

8 Literaturverzeichnis

- Amento EP, Beck LS. 1991. TGF-beta and wound healing. *Ciba Found Symp*, 157:115-123; discussion 123-119.
- Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C, Roberts AB. 1999. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol*, 1 (5):260-266.
- Beanes SR, Dang C, Soo C, Ting K. 2003. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. *Expert Rev Mol Med*, 5 (8):1-22.
- Brenner AJ, Harris ED. 1995. A quantitative test for copper using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 226 (1):80-84.
- Burnette WN. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112 (2):195-203.
- Cao Z, Wu HK, Bruce A, Wollenberg K, Panjwani N. 2002. Detection of differentially expressed genes in healing mouse corneas, using cDNA microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (9):2897-2904.
- Chen Q, Chen H, Zheng D, Kuang C, Fang H, Zou B, Zhu W, Bu G, Jin T, Wang Z, Zhang X, Chen J, Field LJ, Rubart M, Shou W, Chen Y. 2009. Smad7 is required for the development and function of the heart. *J Biol Chem*, 284 (1):292-300.
- Delavary BM, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*.
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*, 95 (6):737-740.
- Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massague J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH, Vogelstein B, Wang XF. 1996. Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell*, 87 (2):173.
- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 122 (1):103-111.
- Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T. 2000. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol*, 19 (4):325-332.
- Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO. 2003. TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res*, 282 (2):90-100.
- Faler BJ, Macsata RA, Plummer D, Mishra L, Sidawy AN. 2006. Transforming growth factor-beta and wound healing. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*, 18 (1):55-62.
- Frank S, Madlener M, Werner S. 1996. Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, 271 (17):10188-10193.
- Fraser. 2007. SMAD7: AT THE INTERFACE OF TGF-b AND PROINFLAMMATORY SIGNALING. *Peritoneal Dialysis International*, Vol. 27, pp. 523-525.
- Frericks M, Esser C. 2008. A toolbox of novel murine house-keeping genes identified by meta-analysis of large scale gene expression profiles. *Biochim Biophys Acta*, 1779 (12):830-837.
- Gabbiani G. 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*, 200 (4):500-503.
- Gabrielli F, Potenza C, Puddu P, Sera F, Masini C, Abeni D. 2001. Suture materials and other factors associated with tissue reactivity, infection, and wound dehiscence among plastic surgery outpatients. *Plast Reconstr Surg*, 107 (1):38-45.
- Garlick JA, Taichman LB. 1994. Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Invest*, 70 (6):916-924.
- George SJ. 2009. Regulation of myofibroblast differentiation by convergence of the Wnt and TGF-

- beta1/Smad signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol*, 46 (5):610-611.
- Gottrup F, Agren MS, Karlsmark T. 2000. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair Regen*, 8 (2):83-96.
- Gu L, Zhu YJ, Yang X, Guo ZJ, Xu WB, Tian XL. 2007. Effect of TGF-beta/Smad signaling pathway on lung myofibroblast differentiation. *Acta Pharmacol Sin*, 28 (3):382-391.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature*, 453 (7193):314-321.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390 (6659):465-471.
- Hinz B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*, 127 (3):526-537.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 170 (6):1807-1816.
- Hong S, Lim S, Li AG, Lee C, Lee YS, Lee EK, Park SH, Wang XJ, Kim SJ. 2007. Smad7 binds to the adaptors TAB2 and TAB3 to block recruitment of the kinase TAK1 to the adaptor TRAF2. *Nat Immunol*, 8 (5):504-513.
- Hosokawa R, Urata MM, Ito Y, Bringas P, Jr., Chai Y. 2005. Functional significance of Smad2 in regulating basal keratinocyte migration during wound healing. *J Invest Dermatol*, 125 (6):1302-1309.
- Ignatz RA, Massague J. 1986. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 261 (9):4337-4345.
- Ishida Y, Kondo T, Takayasu T, Iwakura Y, Mukaida N. 2004. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. *J Immunol*, 172 (3):1848-1855.
- Itoh S, ten Dijke P. 2007. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*, 19 (2):176-184.
- Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. 2000. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem*, 267 (24):6954-6967.
- Kawabata M, Imamura T, Inoue H, Hanai J, Nishihara A, Hanyu A, Takase M, Ishidou Y, Udagawa Y, Oeda E, Goto D, Yagi K, Kato M, Miyazono K. 1999. Intracellular signaling of the TGF-beta superfamily by Smad proteins. *Ann N Y Acad Sci*, 886:73-82.
- Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. 1986a. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol*, 137 (12):3855-3860.
- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. 1986b. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med*, 163 (5):1037-1050.
- Kim SG, Kim HA, Jong HS, Park JH, Kim NK, Hong SH, Kim TY, Bang YJ. 2005. The endogenous ratio of Smad2 and Smad3 influences the cytostatic function of Smad3. *Mol Biol Cell*, 16 (10):4672-4683.
- Kopp J, Preis E, Said H, Hafemann B, Wickert L, Gressner AM, Pallua N, Dooley S. 2005. Abrogation of transforming growth factor-beta signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*, 280 (22):21570-21576.
- Kretzschmar M, Doody J, Massague J. 1997. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature*, 389 (6651):618-622.
- Ksander GA, Pratt BM, Desilets-Avis P, Gerhardt CO, McPherson JM. 1990a. Inhibition of connective tissue formation in dermal wounds covered with synthetic, moisture vapor-permeable dressings and its reversal by transforming growth factor-beta. *J Invest Dermatol*, 95 (2):195-201.
- Ksander GA, Chu GH, McMullin H, Ogawa Y, Pratt BM, Rosenblatt JS, McPherson JM. 1990b. Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 enhance connective tissue formation in

- animal models of dermal wound healing by secondary intent. *Ann N Y Acad Sci*, 593:135-147.
- Kujath P, Michelsen A. 2008. Wounds - from physiology to wound dressing. *Dtsch Arztebl Int*, 105 (13):239-248.
- Leask A. 2004. TGF- β signaling and the fibrotic response. *THE FASEB Journal*, Vol. 18:816-829.
- Letterio JJ, Roberts AB. 1996. Transforming growth factor-beta1-deficient mice: identification of isoform-specific activities in vivo. *J Leukoc Biol*, 59 (6):769-774.
- Lin AH, Luo J, Mondschein LH, ten Dijke P, Vivien D, Contag CH, Wyss-Coray T. 2005. Global analysis of Smad2/3-dependent TGF-beta signaling in living mice reveals prominent tissue-specific responses to injury. *J Immunol*, 175 (1):547-554.
- Lindner J. 1982. [Morphology and biochemistry of wound healing]. *Langenbecks Arch Chir*, 358:153-160.
- Liu C, Gaca MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. 2003. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem*, 278 (13):11721-11728.
- Liu QJ, He N, Liu SX, Wang LH, Shi YH, Duan HJ. 2005. [Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and expressions of hepatocyte growth factor and Smad7 in renal tissues of rat with experimental diabetes]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 17 (11):675-678.
- Malmstrom J, Lindberg H, Lindberg C, Bratt C, Wieslander E, Delander EL, Sarnstrand B, Burns JS, Mose-Larsen P, Fey S, Marko-Varga G. 2004. Transforming growth factor-beta 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus. *Mol Cell Proteomics*, 3 (5):466-477.
- Massague J. 1987. Identification of receptors for type-beta transforming growth factor. *Methods Enzymol*, 146:174-195.
- Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67:753-791.
- Massague J. 1999. Wounding Smad. *Nat Cell Biol*, 1 (5):E117-119.
- Massague J, Weis-Garcia F. 1996. Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv*, 27:41-64.
- Massague J, Seoane J, Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev*, 19 (23):2783-2810.
- Montesano R, Orci L. 1988. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (13):4894-4897.
- Moustakas A, Heldin CH. 2005. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci*, 118 (Pt 16):3573-3584.
- Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. 1987. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science*, 237 (4820):1333-1336.
- Nakao A, Roijer E, Imamura T, Souchelnytskyi S, Stenman G, Heldin CH, ten Dijke P. 1997a. Identification of Smad2, a human Mad-related protein in the transforming growth factor beta signaling pathway. *J Biol Chem*, 272 (5):2896-2900.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. 1997b. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, 389 (6651):631-635.
- Nomura M, Li E. 1998. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature*, 393 (6687):786-790.
- O'Kane S, Ferguson MW. 1997. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*, 29 (1):63-78.
- Penheiter SG, Mitchell H, Garamszegi N, Edens M, Dore JJ, Jr., Leof EB. 2002. Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway. *Mol Cell Biol*, 22 (13):4750-4759.
- Piek E, Ju WJ, Heyer J, Escalante-Alcalde D, Stewart CL, Weinstein M, Deng C, Kucherlapati R,

- Bottinger EP, Roberts AB. 2001. Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem*, 276 (23):19945-19953.
- Reid RR, Sull AC, Mogford JE, Roy N, Mustoe TA. 2004. A novel murine model of cyclical cutaneous ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*, 116 (1):172-180.
- Runyan CE, Schnaper HW, Poncelet AC. 2005. The role of internalization in transforming growth factor beta1-induced Smad2 association with Smad anchor for receptor activation (SARA) and Smad2-dependent signaling in human mesangial cells. *J Biol Chem*, 280 (9):8300-8308.
- Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Rodel F, Amann K, Radespiel-Troger M, Grabenbauer GG. 2003. Transforming growth factor-beta receptor-II up-regulation during wound healing in previously irradiated graft beds in vivo. *Wound Repair Regen*, 11 (4):297-305.
- Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Grabenbauer G, Amann K, Radespiel-Troger M, Neukam FW, Rodel F. 2002. Transforming growth factor beta1 and beta2 (TGFbeta2 / TGFbeta2) profile changes in previously irradiated free flap beds. *Head Neck*, 24 (1):33-41.
- Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Rodel F, Amann K, Radespiel-Troger M, Kopp J, Grabenbauer G. 2004a. Anti-TGFbeta1 antibody for modulation of expression of endogenous transforming growth factor beta 1 to prevent fibrosis after plastic surgery in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 42 (2):112-119.
- Schultze-Mosgau S, Blaese MA, Grabenbauer G, Wehrhan F, Kopp J, Amann K, Rodemann HP, Rodel F. 2004b. Smad-3 and Smad-7 expression following anti-transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1)-treatment in irradiated rat tissue. *Radiother Oncol*, 70 (3):249-259.
- Sebe A, Leivonen SK, Fintha A, Masszi A, Rosivall L, Kahari VM, Mucsi I. 2008. Transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle cell actin expression in renal proximal tubular cells is regulated by p38beta mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated protein kinase1,2 and the Smad signalling during epithelial-myofibroblast transdifferentiation. *Nephrol Dial Transplant*, 23 (5):1537-1545.
- Shukla MN, Rose JL, Ray R, Lathrop KL, Ray A, Ray P. 2009. Hepatocyte growth factor inhibits epithelial to myofibroblast transition in lung cells via Smad7. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40 (6):643-653.
- Snedecor G CW. 1989. *Statistical Methods* (8th edition).
- Sobral LM, Montan PF, Zecchin KG, Martelli-Junior H, Vargas PA, Graner E, Coletta RD. Smad7 Blocks Transforming Growth Factor-beta1-Induced Gingival Fibroblast-Myofibroblast Transition via Inhibitory Regulation of Smad2 and Connective Tissue Growth Factor. *J Periodontol*.
- Spiekstra SW, Breetveld M, Rustemeyer T, Scheper RJ, Gibbs S. 2007. Wound-healing factors secreted by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in skin substitutes. *Wound Repair Regen*, 15 (5):708-717.
- Sporn MB, Roberts AB, Shull JH, Smith JM, Ward JM, Sodek J. 1983. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science*, 219 (4590):1329-1331.
- Takeuchi H, Kubota S, Murakashi E, Fukada T, Hashimoto S, Takigawa M, Numabe Y. 2009. Effect of transforming growth factor-beta1 on expression of the connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) gene in normal human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*, 44 (2):161-169.
- Varga J. 2002. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum*, 46 (7):1703-1713.
- Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. 2000. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res*, 257 (1):180-189.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. 1987. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (16):5788-5792.

- Wakefield LM, Stuelten C. 2007. Keeping order in the neighborhood: new roles for TGFbeta in maintaining epithelial homeostasis. *Cancer Cell*, 12 (4):293-295.
- Walker JM. 1994. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 32:5-8.
- Wang W, Huang XR, Li AG, Liu F, Li JH, Truong LD, Wang XJ, Lan HY. 2005. Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation: role of Smad7. *J Am Soc Nephrol*, 16 (5):1371-1383.
- Whitman M. 1997. Signal transduction. Feedback from inhibitory SMADs. *Nature*, 389 (6651):549-551.
- Wieser R, Attisano L, Wrana JL, Massague J. 1993. Signaling activity of transforming growth factor beta type II receptors lacking specific domains in the cytoplasmic region. *Mol Cell Biol*, 13 (12):7239-7247.
- Willatt DJ, Durham L, Ramadan MF, Bark-Jones N. 1988. A prospective randomized trial of suture material in aural wound closure. *J Laryngol Otol*, 102 (9):788-790.
- Wrana JL, Attisano L. 2000. The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11 (1-2):5-13.
- Xie JL, Qi SH, Pan S, Xu YB, Li TZ, Liu XS, Liu P. 2008. Expression of Smad protein by normal skin fibroblasts and hypertrophic scar fibroblasts in response to transforming growth factor beta1. *Dermatol Surg*, 34 (9):1216-1224; discussion 1224-1215.
- Yagi K, Goto D, Hamamoto T, Takenoshita S, Kato M, Miyazono K. 1999. Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J Biol Chem*, 274 (2):703-709.
- Yan X, Liu Z, Chen Y. 2009. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 41 (4):263-272.
- You L, Kruse FE. 2002. Differential effect of activin A and BMP-7 on myofibroblast differentiation and the role of the Smad signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (1):72-81.
- Zandvoort A, Postma DS, Jonker MR, Noordhoek JA, Vos JT, Timens W. 2008. Smad gene expression in pulmonary fibroblasts: indications for defective ECM repair in COPD. *Respir Res*, 9:83.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau danke ich für die uneingeschränkte Nutzung aller Einrichtungen seines Institutes sowie die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau und Cornelia Müller danke ich für die exzellente Unterstützung sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch bei der Verfassung der schriftlichen Arbeit. Ich bedanke mich vor allem für die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei anstehenden Fragen und Problemen.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente möchte ich mich ebenfalls bei den Mitarbeitern des MKG-Forschungslabores der FSU Jena und im Besonderen bei Frau Nora Moll bedanken.

Danken möchte ich meiner Mutter, Anita Klinger, welche mich während der gesamten Zeit des Studiums sehr unterstützt hat, sowie Dr. Jörg Hagner, der mir ebenfalls seine Unterstützung zu teil werden lies.

Ich danke auch meinem Freund, Dr. Michael Kirschbaum, der mich vor allem während des Examens unheimlich unterstützt hat und mit viel Geduld an meiner Seite stand.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau und Cornelia Müller

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.