



Aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
der Universität Würzburg

Lehrstuhlinhaberin: Professor Dr. Heike Walles

In-vitro-Untersuchungen zur Biokompatibilität modifizierter Silikonoberflächen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Ann-Kathrin Berninger
aus Walldürn

Würzburg, Oktober 2014

Referentin: Prof. Dr. Heike Walles
Koreferent: PD Dr. Sönke Frey, i.V. Prof. Dr. Blunk
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2015

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 EINSATZ VON SILIKONIMPLANTATEN ZUR MAMMA-AUGMENTATION	1
1.2 KOMPLIKATIONEN NACH MAMMA-AUGMENTATION MIT SILIKONIMPLANTATEN.....	4
1.3 BIOTECHNOLOGISCHE MODIFIKATION DER MATERIALOBERFLÄCHE.....	5
1.4 WEITERE EINSATZMÖGLICHKEITEN VON SILIKONMATERIALIEN IN DER MEDIZIN	6
1.5 ZIEL DER ARBEIT.....	7
2. MATERIAL.....	8
2.1 VERBRAUCHS-, LABORMATERIALIEN UND GERÄTE.....	8
2.2 CHEMIKALIEN.....	11
2.3 MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR	13
2.4 LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN FÜR DIE HISTOLOGIE	14
2.5 MATERIALIEN FÜR DIE GENEXPRESSIONSANALYSE	15
2.6 BIOLOGISCHES MATERIAL.....	16
2.6.1 Auswahl der Zellen für die In-vitro-Versuchsreihen.....	16
2.6.2 Hautgewebe	17
2.6.3 Fettgewebe.....	17
2.6.4 Leukozytenproben.....	17
3. METHODEN.....	18
3.1 ALLGEMEINE ZELLKULTURTECHNIK	18
3.1.1 Passagieren von Zellen	18
3.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	19
3.1.3 Fixierung von Zellen auf Chamberslides und Silikonoberflächen	19
3.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT FLUORESCENZ-GEKOPPELTEN ANTIKÖRPERN.....	19
3.3 BESTIMMUNG VON PROLIFERATION UND VITALITÄT.....	21
3.3.1 CellTiter-Glo®.....	21
3.3.2 Quant-iT™ PicoGreen®.....	21
3.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	22
3.4.1 RNA-Extraktion.....	22
3.4.2 Messung der RNA-Konzentration und -qualität.....	23
3.4.3 cDNA-Synthese.....	23
3.4.4 real-time PCR.....	24
3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	25
3.5 AUFARBEITUNG VON GEWEBEN UND KULTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG DER ZELLEN .25	
3.5.1 Isolation und Kultivierung primärer Fibroblasten	25
3.5.2 Isolation und Kultur von Adipozyten-Vorläuferzellen	26
3.5.3 Isolation und Kultivierung von Monozyten.....	28
4. ERGEBNISSE.....	31
4.1 HANDHABUNG DER SILIKONMATRICES	31
4.2 KULTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG PRIMÄRER ZELLEN	32
4.3 BESTIMMUNG VON PROLIFERATION UND VITALITÄT.....	34
4.3.1 Cell-TiterGlo®-Assay.....	34

4.3.2 Quant-iT™ PicoGreen®	36
4.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT FLUORESCENZ-GEKOPPELTEN ANTIKÖRPERN	37
4.3.1 Färbung von Fibroblasten mit Kollagen I	38
4.3.2 Färbung von Adipozyten und ihrer Vorläuferzellen mit GLUT4	39
4.3.3 Färbung von Monozyten/Makrophagen mit CD68	41
4.4 MESSUNG DER RNA-KONZENTRATION UND -QUALITÄT	42
4.5 GENEXPRESSIONSANALYSE	43
4.5.1 Kollagen I, III, TGF-β	44
4.5.2 CD68, TNF-α, Lysozym, IL-1, IL-6, IL-10	45
5. DISKUSSION	47
5.1 BESTIMMUNG VON PROLIFERATION UND VITALITÄT	47
5.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG	48
5.3 MOLEKULARBIOLOGISCHER NACHWEIS SPEZIFISCHER MARKER	49
5.3.1 Haushaltsgene GAPDH und Aktin-β	49
5.3.2 Wundheilung und Gewebeumbau in der Genexpression	50
5.3.3 Fibroblasten und ihre Markergene	51
5.3.4 Makrophagen und spezifisch exprimierte Gene	52
5.4 VERÄNDERUNG DER BIOKOMPATIBILITÄT VON IMPLANTATEN	57
6. ZUSAMMENFASSUNG	58
7. LITERATURVERZEICHNIS	59
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	63
9. TABELLENVERZEICHNIS	65
DANKSAGUNG	66
LEBENS LAUF	67

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
3D	dreidimensional
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD 14	Cluster of differentiation 14
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTG	Promega Cell Titer-Glo
DAPI	4'6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
dest.	Destilliert
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3,3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DiO	3,3'-Dioctadecyloxacarbocyaninperchlorat
DMEM(r)	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ready)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FASN	Fettsäuresynthase
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glucosetransporter 4
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-2
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IL	Interleukin
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
Kol I	Kollagen I
Kol III	Kollagen III
LZZ	Lebendzellzahl
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

MW _{LZZ}	Mittelwert der Lebendzellzahl
MW _{ZZ.tot}	Mittelwert der toten Zellen
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NK	Negativkontrolle
OD	optische Dichte
PBS ⁻	phosphatgepufferte Salzlösung ohne zweiwertige Kationen (phosphate buffered saline)
PBS ⁺	phosphatgepufferte Salzlösung mit zweiwertigen Kationen
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PP	Polypropylen
RLU	Relative Luminescence Unit
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TGF- β	Transforming-growth-factor-beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
λ_{\max}	Absorptionswellenlänge
$\lambda_{\text{Ref.}}$	Referenzwellenlänge

1. Einleitung

1.1 Einsatz von Silikonimplantaten zur Mamma-Augmentation

Pro Jahr werden in Deutschland nach Schätzungen der Gesellschaft für Ästhetisch-Plastische Chirurgie (DGÄPC) ca. 30.000 – 45.000 Brustimplantate verkauft. (Deutsche Gesellschaft für Ästhetisch-Plastische Chirurgie 02.2012) Die Gründe für eine Mamma-Augmentation sind vielfältig und sehr individuell. Dazu zählen primäre und sekundäre Rekonstruktionen nach Mamma-Ablatio bei Brustkrebspatientinnen, bei Involutionstrophie z.B. nach Schwangerschaft und Stillzeit oder starker Gewichtsreduktion, Ausgleich von Fehlbildungen und Asymmetrien, sowie rein kosmetische Vergrößerungen. In den USA werden jährlich ca. 300.000 Brustvergrößerungen durchgeführt, ca. 30% davon nach Mamma-Ablatio. (American Society for Aesthetic Plastic Surgery)

Jährlich erkranken in Deutschland ca. 60.000 Frauen an einem Mamma-Karzinom. Somit zählt Brustkrebs zu den häufigsten bösartigen Neubildungen der Frau. (Robert Koch Institut 2010)

Wird nach ausführlicher Untersuchung der Patientin mittels Mammographie, Ultraschall, Galaktographie und ggf. einer Biopsie die Diagnose „Brustkrebs“ gestellt, so erfolgt in der Regel die operative Entfernung des Tumors mit immunhistochemischer Bestimmung von Östrogen-, Progesteronrezeptoren und HER-2-Status. Durch eine Kombination mit Bestrahlung, Chemo- und Hormontherapie oder den Einsatz von Biologika, wie dem Antikörper Trastuzumab, wird eine hohe Heilungsrate unter Erhaltung der Brust erzielt. Trotz dieser weitreichenden Fortschritte in der (neo-) adjuvanten und operativen Therapie wird auch heute noch in ungefähr 30% der Fälle die Indikation zur Mastektomie gestellt. Folgende Kriterien sind hierfür entscheidend: Es zeigen sich diffuse, ausgedehnte Kalzifikationen vom malignen Typ. Der Tumor wächst multizentrisch, also in mindestens zwei Quadranten mit ungünstigem Tumor-Brust-Verhältnis und einer Größe über 3cm. Freie Tumorränder, unter Einschluss der intraduktalen Komponente, können auch durch Nachresektion nicht erreicht werden. Es besteht ein inflammatorisches Karzinom, ein ausgedehnter Befall der Lymphgefäße oder eine Kontraindikation zu anschließender Bestrahlung. Die brusterhaltende Therapie erbringt wahrscheinlich kein zufriedenstellendes kosmetisches Ergebnis oder die aufgeklärte Patientin wünscht eine Mastektomie. (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2011; Voogd et al. 2001)

Bei der heutzutage zu meist angewandten modifizierten radikalen Mastektomie werden das gesamte Brustdrüsengewebe einschließlich Haut und Mamillen-Areola-Komplex, sowie die Pektoralisfaszie entfernt. Der Pektoralismuskel bleibt dabei erhalten.

Allerdings bedeutet diese Operation nicht nur eine Auseinandersetzung mit einer lebensbedrohlichen Erkrankung, sondern durch den damit verbundenen Verlust der körpereigenen Integrität gleichzeitig eine sehr hohe psychische Belastung für die betroffenen Patientinnen. Ursache dafür ist, dass die weibliche Brust neben ihrer funktionellen Bedeutung, seit jeher auch als Symbol für Weiblichkeit, Attraktivität, Sexualität, Erotik und Mutterschaft gilt. (Broer et al. 2001) So geben viele Frauen, die sich für eine Rekonstruktion der Brust entschieden haben an, dass Druck, ausgeübt durch ihren Partner oder das soziale Umfeld und der Einfluss der Medien hinsichtlich des weiblichen Schönheitsideals eine bedeutsame Rolle bei ihrer Entscheidung gespielt habe. (Puskas und Luebbers 2011)

Aus diesem Grund ist bei der Behandlung betroffener Patientinnen das interdisziplinäre Zusammenwirken der verschiedenen Fachbereiche wie Gynäkologie, Psychiatrie und Plastische Chirurgie von großer Wichtigkeit. Somit leistet nicht zuletzt die Brustrekonstruktion nach einer Mastektomie einen wichtigen Beitrag zur Wiederherstellung des Selbstbewusstseins und der Lebensqualität und zur Verarbeitung der Krankheit. (Alderman et al. 2000)

Seit Beginn des 19. Jahrhunderts wurde eine Reihe von Materialien zur Mamma-Augmentation eingesetzt. Dabei wurde den Frauen Paraffin, Bienenwachs, Petroleum und Silikonöle injiziert oder Elfenbein, Wolle, tierisches Knorpelgewebe, Glaskugeln oder modernere Grundstoffe wie Nylon, Polypropylen, Polyethylen oder Teflon implantiert. Diese Versuche führten jedoch nahezu alle zu unbefriedigenden kosmetischen Ergebnissen, schwerwiegenden Komplikationen und zum Nachweis bedenklicher Abbauprodukte. (Bondurant et al. 2000; Young und Watson 2001)

Heute stehen der modernen Plastischen Chirurgie zum Wiederaufbau der Brust zwei bewährte Methoden zur Verfügung. Einerseits kann eine Rekonstruktion mit Eigengewebe durch eine Lappenplastik erfolgen, zum Beispiel durch Verschieben des *Musculus Latissimus dorsi*, des *Musculus Rectus Abdominis* oder unter Verwendung eines sogenannten *DIEP-flap* (*deep inferior epigastric artery perforator*), der nicht aus Muskulatur sondern aus einem Gewebblock aus Bauchfett besteht. Alternativ dazu besteht die Möglichkeit eines Brustaufbaus mit Hilfe eines Silikonimplantats und gegebenenfalls einer vorhergehenden Vordehnung der Haut durch einen Expander.



Abbildung 1 Mamma-Rekonstruktion mit Silikonimplantat nach Vordehnung der Haut mit Kochsalzgefülltem Expander. (Deutsche Gesellschaft der Plastischen 2009)

Seit Einführung der Brustimplantate im Jahre 1961 erschienen bis heute circa 8300 verschiedene Implantattypen auf dem Markt. Unterschiede gibt es dabei unter anderem hinsichtlich der Hüllenstruktur (glatt-texturiert), der Füllsubstanz (Silikongel, Kochsalz, Sojaöl, Hydrogel), der Form (anatomisch-rund) und der Größe.

Wichtige Kriterien bei der Wahl des Verfahrens zur Brustrekonstruktion nach Mamma-Abtatio sind die Akzeptanz der Patientin für die operative Methode, und deren Sicherheit, sowie ein dauerhaft zufriedenstellendes ästhetisches Ergebnis. Dabei stehen vor allem der Ersatz des fehlenden Hautmantels und des fehlenden Brustgewebes, das Erreichen eines ausreichenden Volumens der Brust, mit natürlicher Ptose und Symmetrie zur Gegenseite im Vordergrund. Um zusammen mit der Patientin die richtige Entscheidung zu treffen, gilt es folgende Vor- und Nachteile abzuwägen. Zum einen erzielt man durch Einsatz von Silikonprothesen sehr gute kosmetische Ergebnisse in einer technisch einfachen und schnellen Operation. Verglichen mit einer Mamma-Rekonstruktion durch Eigengewebe entstehen dabei keine Hebemorbidität, kein Funktionsverlust und keine Narbenbildung am Ort der Entnahme. Lappenplastiken sind technisch sehr anspruchsvolle, zeitintensive Operationen, die ein hohes Maß an mikrochirurgischer Erfahrung und eine gute postoperative Überwachung erfordern. Nicht selten kommt es dabei zu vaskulären Komplikationen, die eine erneute Operation, eine Lappennekrose oder sogar einen Lappenverlust nach sich ziehen.

Aber auch der Einsatz von Silikonimplantaten birgt Nachteile. So ist zum Beispiel eine postoperative Bestrahlung kontraindiziert und in der Regel ein Austausch der Prothese nach zehn bis fünfzehn Jahren notwendig. Darüber hinaus geben viele Patientinnen ein Fremdkörpergefühl an und es kann zu Falten- und Keloidbildung, Infektionen, Kapselkontrakturen mit Brustschmerzen, Implantatruptur mit Leckage oder Austritt des Füllmaterials bei intakter Oberfläche, dem sog. Bleeding, kommen.

Letztlich ist außerdem, trotz der Vielzahl an unterschiedlichen Größen und Formen, eine Symmetrie zur Gegenseite nicht immer erreichbar und erfordert in einigen Fällen ein

Angleichen der anderen Brust. (Medizinischer Dienst des Spitzenverbandes Bund Deutscher Krankenkassen e.V. 2003)

Ein Einfluss auf die Entstehung eines Tumor-Rezidivs, sowie ein kausaler Zusammenhang zwischen Brustimplantaten und Autoimmunerkrankungen oder Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, konnten in Studien, wie zum Beispiel in Auftrag des Europäischen Parlaments, bisher nicht belegt werden. (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2011)

Grundsätzlich kann ein Brustimplantat subglandulär, also hinter der Brustdrüse oder subpektoral, hinter den Brustmuskel eingebracht werden, wobei prinzipiell fünf Zugangswege möglich sind: submammar (unter der Brustfalte), areolar (unterhalb des Warzenvorhofes), axillär und transumbilical (im Bereich des Nabels) oder die Narbe nach Mastektomie. Im Anschluss an den primären Wiederaufbau der Brust, kann in einem zweiten Schritt die Rekonstruktion des Mamillen-Areolakomplexes erfolgen.

1.2 Komplikationen nach Mamma-Augmentation mit Silikonimplantaten

Zu den häufigsten Langzeitkomplikationen bei der Verwendung von Silikonimplantaten, zählt, vor allem bei primärer Rekonstruktion, die Kapselkontraktur. (Siggelkow et al. 2004) Dabei wird das Implantat von der körpereigenen Immunabwehr als Fremdmaterial erkannt und durch eine dicke Schicht aus Zellen und extrazellulärer Matrix umschlossen. Während eine dünne Kapsel einen vorteilhaften Schutz gegen das Verrutschen des Implantats und die Körperabwehr bietet, führt eine ausgeprägte Verhärtung des umgebenden Gewebes dagegen zu sichtbaren Verformungen, Dislokationen und starken Schmerzen. (Gayou 1979)



Verformtes Implantat mit kalzifizierter Kapsel

Kapselkontraktur mit Verlagerung der Prothese nach kranial

Abbildung 2 Auswirkungen der Kapselkontraktur auf Implantat und optische Erscheinungsform der Brust. (Pittet et al. 2005), (Abdallah A. et al. 2003)

Die gebräuchliche Klassifikation nach Baker unterscheidet dabei fünf Grade der Kapselkontraktur nach Brustrekonstruktion:

Tabelle 1 Baker-Klassifikation nach Mamma-Rekonstruktion (Spear und Baker 1995)

Grad Ia	Natürliche Konsistenz, kein sichtbarer Nachweis einer Rekonstruktion
Grad Ib	Weich, aber Implantat durch körperliche Untersuchung aufgrund der Mastektomie erkennbar
Grad II	Weniger weich, das Implantat ist fühlbar aber nicht sichtbar
Grad III	Deutlich härtere Brust, das Implantat ist deutlich fühlbar und sichtbar
Grad IV	Stark ausgeprägte Kapselbildung, häufig schmerzhaft, disloziert, eine chirurgische Intervention ist nötig

Die Rate an Reoperationen nach sechs Jahren beträgt in der Folge, je nach Hersteller und verwendetem Implantattyp, zwischen 30-50%. (Cunningham und McCue 2009; Spear et al. 2007)

Zu den Risikofaktoren für die Ausbildung einer Kapselbildung zählen der operative Zugangsweg, die Lage des Implantats (submuskulär versus subglandulär), bakterielle und andere Infektionen, die Abgabe von Silikonpartikeln an die Umgebung, die Zusammensetzung des Füllmaterials (Silikon, Kochsalz, Sojaöl, Hydrogel) und der Oberflächenmatrix (glatt, texturiert), Hämatom- und Serombildung und das Einbringen immunmodulatorischer Medikamente wie Corticosteroide und Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten, wie z.B. Montelukast. (Gylbert et al. 1990; Araco et al. 2009; Moreira et al. 2009)

Rauchen, Alkoholkonsum, Implantatgröße, BMI und Händigkeit haben laut neusten Untersuchungen dagegen keinen Einfluss auf die Entstehung einer Kontraktur. (Dancey et al. 2011)

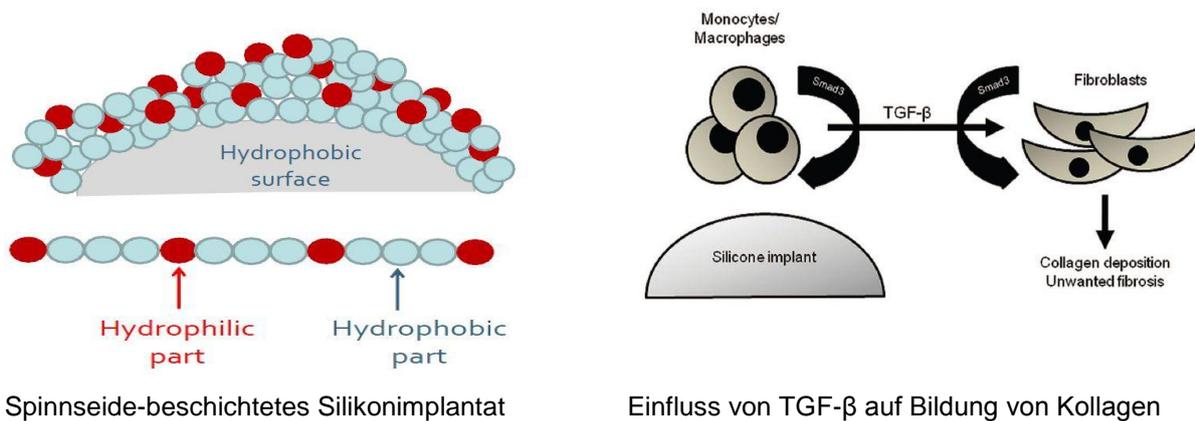
Unter den genannten Einflussfaktoren scheint die Beschaffenheit der Silikonoberfläche dabei eine besondere Rolle einzunehmen. So zeigen vergleichende Studien signifikante Unterschiede zwischen glatten und texturierten Matrices. (Wong et al. 2006)

1.3 Biotechnologische Modifikation der Materialoberfläche

Um die Verträglichkeit alloplastischer Implantate zu erhöhen, muss das Material so verändert werden, dass die körpereigenen Immunreaktion vermindert und somit der Bildung einer Fibrosekapsel entgegengewirkt wird. Zwei unterschiedliche Modifikationen erscheinen dabei vielversprechend. Eine Möglichkeit besteht darin, die Biokompatibilität der Außenseite durch eine Beschichtung mit rekombinanter Spinnseide zu erhöhen. Neben hoher Elastizität und Stabilität steigern die amphiphilen Spinnseide-Proteine die Hydrophilität des Materials. (Hardy und Scheibel 2009) Dies bewirkt eine verminderte Anlagerung von Proteinen, Zellen,

Mikroorganismen und die reduzierte Ausbildung eines bakteriellen Biofilms, die u.a. als Auslöser der T-zellvermittelten Immunantwort gelten.

Ein weiterer Ansatz ist die gezielte Beeinflussung der Kollagenbildung, als entscheidendem Bestandteil der Kapsel durch das Chinazolinon-Derivat Halofuginon. Gebunden an die Silikonoberfläche beeinflusst es den TGF- β abhängigen Signalweg zur Bildung von Kollagen I. (Zeplin et al. 2010)



Spinnseide-beschichtetes Silikonimplantat

Einfluss von TGF- β auf Bildung von Kollagen

Abbildung 3 Modifizierung der Silikonoberfläche durch Beschichtung mit Spinnseide und TGF- β -Inhibitor Halofuginon. (AmSilk; Zeplin et al. 2010)

1.4 Weitere Einsatzmöglichkeiten von Silikonmaterialien in der Medizin

Medizinische Materialien aus Silikon werden heute allerdings nicht nur in der Mamma-Chirurgie verwendet, sondern kommen auch in Form von Venen- und Blasenverweilkathetern, Intraokularlinsen, Schrittmachern, Herzklappen und Endoprothesen, wie z.B. für Hüft- und Kniegelenke oder Gefäße zum Einsatz. Auch hier treten durch die Verwendung körperfremder Stoffe Komplikationen wie Hämolyse, Thrombosierung, Infektionen mit Auftreten eines bakteriellen Biofilmes, Immunreaktionen mit Ausbildung einer Fibrosekapsel, unerwünschtes Einwachsen des Materials in das Gewebe oder Verschluss eines Gefäßes auf. In der Folge erhalten viele Patienten eine Dauermedikation beispielsweise zur Antikoagulation, Immunsuppression oder in Form von Antibiotika oder müssen sich einer weiteren Operation unterziehen. Eine Langzeiteinnahme dieser Medikamente oder ein weiterer chirurgischer Eingriff sind nicht nur mit weiteren Risiken für den Betroffenen, sondern auch mit hohen Kosten verbunden. Somit ist eine Oberflächenmodifizierung alloplastischer Materialien zur Steigerung ihrer Biokompatibilität nicht nur auf einen medizinischen Einsatzbereich beschränkt.

1.5 Ziel der Arbeit

Durch den Einsatz zweier verschiedener Silikonoberflächenbeschichtungen soll die Biokompatibilität silikonhaltiger Medizinprodukte im menschlichen Körper verbessert werden. Dazu wurden die Implantate zum Einen mit rekombinanter Spinnseide, zum Anderen mit dem Chinazolinonderivat Halofuginon behandelt. Ziel der vorliegenden experimentellen Doktorarbeit ist es verschiedene, bei der Fremdkörperreaktion beteiligte Zelltypen auf ihr Proliferationsverhalten und die Expression unterschiedlicher Genprodukte in-vitro hinsichtlich bestehender Unterschiede zwischen den jeweiligen Oberflächenbeschichtungen zu evaluieren.

2. Material

2.1 Verbrauchs-, Labormaterialien und Geräte

In den folgenden Tabellen sind die in der Arbeit verwendeten Verbrauchs-, Labormaterialien und Geräte mit Angabe der Hersteller aufgelistet.

Tabelle 2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Alufolie	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Chamberslides	Nunc (Wiesbaden, D)
Permanox	
Glas	
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
Einmalpipetten	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Experion RNA Analysis Kit	Bio-Rad (München, D)
Filterpapier, gefaltet	Albet Lab Science (Dassel, D)
Handschuhe	
Latex	Cardinal Health (Kleve, D)
Nitril	Kimberley-Clark (Koblenz D)
Klarsicht-Sterilisierverpackung	Melag (Berlin, D)
MACS-Columns, MS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Objekträger	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
Parafilm	Pechiney (Düsseldorf, D)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim, D)
Petrischale, unbeschichtet	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen, steril	Eppendorf (Hamburg, D)
RNeasy MinElute [®] Cleanup Kit	Qiagen (Hilden, D)
Septophag-Ersatzbeutel	Porod (Frauenhofen, A)
Skalpellklingen	Bayha (Tuttlingen, D)
Sterilfilter Sartolon	Stedium Biotech (Göttingen, D)
Vernichtungsbeutel PP	Hartenstein (Würzburg, D)
Weithalsflaschen PP	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Zellkulturflaschen 25/75/150cm ²	TPP (Trasadingen, CH)
Zellkulturplatten Multiwell 6/12/24/96	TPP (Trasadingen, CH)

Zellsieb, 100µm	BD Bioscience (Heidelberg, D)
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)

Tabelle 3 Labormaterial und Geräte

Labormaterial/Gerät	Hersteller
Aufbewahrungbox Plastik	neoLab (Heidelberg, D)
Absaugsystem Vacusafe	Integra Bioscience (Fernwald, D)
Abzug	Prutscher (Neudörfel, A)
Analysenwaage	Kern (Balingen-Frommern, D)
Autoklav	
Tecnoklav	Biomedis (Gießen, D)
Tischautoklav	Systemec (Wettenberg, D)
Varioklav	H+P (Hackermoos, D)
Becherglas	Schott-Glas (Mainz, D)
Beschwerungsringe	Hartenstein (Würzburg, D)
Brutschrank	Heraeus (Hanau, D)
Chemikalienlöffel	VWF (Darmstadt, D)
Desinfektionswanne	Schülke (Norderstedt, D)
Doppelspatel	VWR (Darmstadt, D)
Dose HDPE mit Schraubverschluss	neoLab (Heidelberg, D)
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
FACs-Gerät Guava	Millipore/Merck (Darmstadt, D)
Feuchteammer	Werkstadt der univ. Klinik und Poliklinik MKG (Würzburg, D)
Gefrierschrank	
- 20°C	Liebherr (Biberach a.d. Riss, D)
- 80°C	Kendro (München, D)
Glaspipetten, steril 2/5/10/25ml	Brand (Wertheim, D)
Glaspipettenreinigungsautomat	Hölzel (Hörlkofen, D)
Handzähler	neoLab (Heidelberg, D)
Heißluftsterilisator	Memmert (Schwabach, D)
Injektionskanüle	Braun (Melsungen, D)
Inkubationsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Inkubationsgefäßständer	neoLab (Heidelberg, D)
Kühlraum	Genheimer (Höchberg, D)

Kurzzeitmesser	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Laborflaschen Glas	Schott-Glas (Mainz, D)
Thermocycler	Sensoquest (Göttingen, D)
Magnetrührer mit Heizung	VWR (Darmstadt, D)
Magnetrührstäbchen	Hartenstein (Würzburg, D)
Magnetstabentferner	Hartenstein (Würzburg, D)
Medibox	Braun (Melsungen, D)
Messzylinder	Brand (Wertheim, D)
Microplate-Reader	Sunrise basic Tecan (Crailsheim, D)
Mikroskop	
Axiovert 40	Zeiss (Göttingen, D)
AxioVision	Zeiss (Göttingen, D)
Mikrowelle	Panasonic (Wiesbaden, D)
MiniMACS Magnet, Separator, Ständer	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein (Würzburg, D)
NanoDrop-Platte	Tecan (Crailsheim, D)
Objektträgerboxen	neoLab (Heidelberg, D)
pH-Meter	Mettler Toledo (Gießen, D)
Pinzetten	VWR (Darmstadt, D)
Pipetboy	Brand (Wertheim, D)
Pulvertrichter PP	neoLab (Heidelberg, D)
Reinstwasseranlage	Millipore (Schwalbach, D)
Röhrchengestell	neoLab (Heidelberg, D)
Schutzbrille	Hartenstein (Würzburg, D)
Schwimmständer	Hartenstein (Würzburg, D)
Septophag	Hesse (Emmerich, D)
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher (Schwerte, D)
Skalpellhalter	Bayha (Tuttlingen, D)
Spiegelreflexkamera	Canon (Krefeld, D)
Spritzflaschen	neoLab (Heidelberg, D)
Spülmaschine	Miele (Gütersloh, D)
Sterilfiltrationsaufsatz	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
Thermocycler	SensoQuest (Göttingen, D)
Tischständer für Vernichtungsbeutel	Hartenstein (Würzburg, D)
TissueLyser LT	Qiagen (Hilden, D)
Wägeschale Plastik	VWF (Darmstadt, D)
Wasserbad	Lauda (Lauda-Köngishofen, D)

Wasserbad mit Schüttleinrichtung	Lauda (Lauda-Köngishofen, D)
Wippschüttler	neoLab (Heidelberg, D)
Vortex	Thermo Fisher (Schwerte, D)
Zellkronen	Werkstatt der univ. Klinik und Poliklinik MKG (Würzburg, D)
Zentrifuge	
Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, D)
Centrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, D)

2.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Konzentrate, die für die Herstellung von Puffern, Lösungen und Medien eingesetzt wurden, sind mit Angabe des Herstellers in der Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Agarose	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Biocoll-1077 Gradient	Biochrom (Berlin, D)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt, D)
cDNA Synthese Kit iScript™	Bio-Rad (München, D)
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega (Mannheim, D)
Chloroform	AppliChem (Darmstadt, D)
Dexamethason	Sigma-Aldrich GmbH (München, D)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Dispase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
EDTA-Natriumsalz x 2 H ₂ O	Sigma Aldrich (München, D)
Ethanol absolut	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Fetales Kälberserum	Lonza (Köln, D)
Fluoromount G	Biozol Diagnostica (Eching, D)
HEPES	Sigma Aldrich (München, D)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, D)

Material

Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, D)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D)
Kalziumchlorid	VWR (Darmstadt, D)
Kollagenase (500 U/ml)	
Korsolex AF	Bode Chemie (Hamburg, D)
Large Volume UltraClean Diluent	Thermo Scientific (Dreieich, D)
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Carl Roth (Karlsruhe, D)
M-CSF	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid in Plätzchen	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumlaurylsulfat (SDS) 10%	Bio-Rad (München, D)
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich (München, D)
Natronlauge 1M	Merck (Darmstadt, D)
Paraformaldehyd	AppliChem (Darmstadt, D)
Penicillin-Streptomycin (5U/l)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Quant-iT™ PicoGreen®	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Salzsäure 1M	Merck (Darmstadt, D)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	Bio-Rad (München, D)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma Aldrich (München, D)
Triton-X	Sigma Aldrich (München, D)
Trypanblau	Sigma Aldrich (München, D)
Trypsin/EDTA (0,5%, 10x mit EDTA, 4 Na)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Tween	Merck (Darmstadt, D)
100bp DNA Ladder Plus	PEQLAB GmbH (Erlangen, D)

2.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die Zusammensetzung der Verwendeten Medien und Lösungen für Zellkultur und Isolation.

Tabelle 5 Medien für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
DMEM	66,9g DMEM-Pulver (DMEM+ 4500mg/l Glucose - Pyruvate - NaHCO ₃) + 18,5g NaHCO ₃ → pH 7,2 einstellen, auf 5l Reinstwasser auffüllen, sterilfiltrieren
DMEMr	DMEM + 10% FCS
DMEM Ham's F12r	DMEM Ham's F12 + 10% FCS
RPMI	10,41g/l RPMI 1640-Pulver (RPMI + L-Glutamin + 25mM HEPES - NaHCO ₃) + 2g/l NaHCO ₃ → pH 7,2 einstellen, auf 5l Reinstwasser auffüllen, sterilfiltrieren
RPMIr	RPMI + 10% FCS + Il-4 + M-CSF
Transportmedium	PBS ⁺ + 10mg/ml (1%) PenStrep

Tabelle 6 Lösungen für die Zellisolation

Lösung	Zusammensetzung
Dispase-Lösung (2,0 U/ml)	2 U/ml in PBS ⁻ lösen, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern
HEPES-Lösung (3M)	35,745g HEPES + 10 NaOH-Plätzchen auf 50ml mit Reinstwasser auffüllen, pH 7,8, sterilfiltrieren
Lysis-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 150 mM NaCl + 1 mM Na ₂ EDTA + 1% Triton-X in Reinstwasser
PBS ⁻	8 g/l NaCl + 0,2 g/l KCl + 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ + 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
PBS ⁺	PBS ⁻ + 0,1 g/l MgCl ₂ x 6 H ₂ O + 0,1 g/l CaCl ₂
PBS ⁻ /EDTA	PBS ⁻ + 0,2 g/l EDTA-Na ₂ -Salz x 2 H ₂ O
Trypsin/ PBS ⁻	10ml Trypsin (10x) auf 100ml PBS ⁻
Waschpuffer Adipozyten-Isolation	PBS ⁻ + 2% FCS
Adipozytenisolationpuffer	PBS ⁻ + 0,05% Kollagenase Serva Typ IV
Waschpuffer Monozytenisolation	PBS ⁻ /EDTA + 1% FCS

2.4 Lösungen und Chemikalien für die Histologie

Im Folgenden finden sich die Lösungen, sowie die Antikörper die in dieser Arbeit im Rahmen der histologischen Versuche verwendet wurden.

Tabelle 7 Lösungen und Chemikalien für die Histologie

Lösung	Zusammensetzung
PFA 4%	4g PFA auf 100ml mit PBS ⁻ auffüllen
10x TBS 0,5M	60,6g/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 87,66g/l NaCl in 900 ml VE-Wasser lösen → pH 7,6 einstellen, auf 1l mit VE-Wasser auffüllen, autoklavieren
1x TBS-Puffer	100ml 10x TBS mit 900ml VE-Wasser mischen
TBS-Waschpuffer	1l 1x TBS mit 1ml Tween mischen

Tabelle 8 Verwendete Antikörper

Antigen	Spezifität	Ursprungsspezies	Hersteller
Kollagen I	anti-Human	monoclonal Maus IgG2a	Acris
CD68	anti-Human	monoclonal Maus IgG1	Abcam
GLUT4	anti-Human, Maus, Ratte	polyclonal Hase IgG	Abcam
CD14-Microbeads	anti-Human	Maus	Miltenyi Biotec
CD14-FITC	anti-Human	Maus	Miltenyi Biotec
Isotyp IgG1	anti-Human	Maus	Dako
Isotyp IgG2a	anti-Human	Maus	Dako
Isotyp IgG	anti-Human	Hase	Abcam
Fluorochrom DyLight	anti-Maus, Hase	Ratte	Thermo

2.5 Materialien für die Genexpressionsanalyse

Tabelle 9 zeigt die benötigten Primersequenzen zur Expressionsanalyse (alle Thermo)

Tabelle 9 Genprodukt und Primersequenzen

Target	Primersequenz [5'-3']	Produktgröße [bp]	T _A [°C]
IL1A	sense: CTTAGTGCCGTGAGTTTCCC antisense: TGTGACTGCCCAAGATGAAG	118	53
TNF- α	sense: AGATGATCTGACTGCCTGGG antisense: CTGCTGCACTTTGGAGTGAT	93	53
CD68	sense: TGATGAGAGGCAGCAAGATG antisense: TCTTTCACCAGCTGTCCACC	128	53
IL6	sense: CATTTGTGGTTGGGTCAGG antisense: AGTGAGGAACAAGCCAGAGC	112	53
IL10	sense: CTCATGGCTTTGTAGATGCCT antisense: GCTGTCATCGATTTCTTCCC	103	53
Lysozym	sense: ATCACGGACAACCCTCTTTG antisense: TGTAATGATGGCAAAACCCC	114	53

Koll I	sense: antisense:	TTCTGTACGCAGGTGATTGG CATGTTTCAGCTTTGTGGACC	129	53
Kol III	sense: antisense:	ATATTTGGCATGGTTCTGGC AAAGGGGAGCTGGCTACTTC	140	53
TGF- β	sense: antisense:	GCAGAAGTTGGCATGGTAGC CCCTGGACACCAACTATTGC	131	53

2.6 Biologisches Material

2.6.1 Auswahl der Zellen für die In-vitro-Versuchsreihen

Bei den Versuchsreihen zu Proliferation und Genexpression waren vor allem die Zellen von besonderem Interesse, die nach Einbringen der Implantate direkt mit den Oberflächen in Kontakt treten und an der Entstehung der Kapselkontraktur beteiligt sind. Die typische Fibrosekapsel besteht aus drei Schichten. Die erste Ebene kann ein-oder zweischichtig sein und enthält eine große Anzahl an Fibroblasten. Daran schließt sich eine Lage bestehend aus lockerem Bindegewebe und Gefäßen an. Bedeckt von der äußersten Schicht aus festem Bindegewebe mit einem Pseudoepithel aus Makrophagen und Riesenzellen. (Wolfram Dolores et al. 2004) So wurden vor allem Fibroblasten, Makrophagen und da die weibliche Brust zu einem Großteil aus Fettgewebe besteht, auch Adipozyten untersucht.

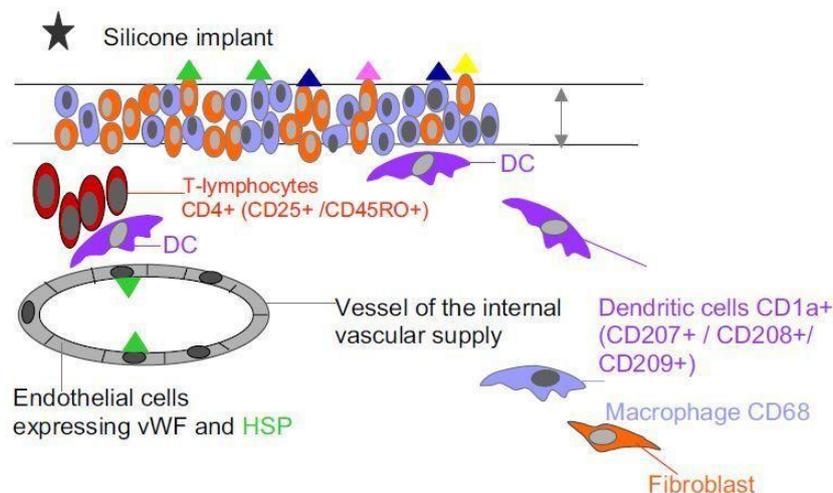


Abbildung 4 Zelluläre und molekulare Bestandteile der Kapsel. (Wolfram Dolores et al. 2004)

Die innerste Schicht besteht in erster Linie aus mehreren Schichten Matrix-bildender Fibroblasten (rot) und CD68-positiver Makrophagen (blau). Außen organisieren sich weitere Zellen des körpereigenen Immunsystems wie T-Lymphozyten und antigenpräsentierende dendritische Zellen, die aus den Blutgefäßen rekrutiert werden und an der Initiierung und Aufrechterhaltung der Fremdkörperreaktion und Fibrosierung beteiligt sind.

2.6.2 Hautgewebe

Zur Gewinnung humaner Fibroblasten wurden Präputien von juvenilen männlichen Spendern im Alter von Null bis acht Jahren, oder adulte Haut aus unterschiedlichen Lokalisationen aufgearbeitet. Diese Biopsate stammten aus den Fachabteilungen für Dermatologie, Kinderchirurgie und Urologie des Universitätsklinikums Würzburg.

Nach der operativen Entfernung des Gewebes und Transport in PBS⁻, wurde eine Sterilkontrolle des Puffers entnommen und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Eine Aufarbeitung der Probe erfolgte je nach Alter des Spenders spätestens nach 2-4 Tagen.

2.6.3 Fettgewebe

Für die Isolation von Adipozyten-Vorläuferzellen wurde Fettgewebe aus Liposuktionen verwendet, die in der Klinik für Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsklinik Würzburg durchgeführt worden waren.

Nach gründlichem Waschen in PBS⁻, konnte das Fettgewebe vor der Aufarbeitung bis zu fünf Tage bei 4°C im Kühlraum gelagert werden.

2.6.4 Leukozytenproben

Die für diese Arbeit verwendeten Blutmonozyten stammten aus Leukozytenproben, die durch das Institut für klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie Würzburg zur Verfügung gestellt wurden. Transport und Aufarbeitung erfolgten dabei am Tag der Spende.

Von allen Haut- und Fettgewebeprosparaten wurden Entnahme- und Aufarbeitungsdatum, das Alter des Spenders und die Herkunft festgehalten. Die Ausgabe der Blutproben erfolgte dagegen ohne Altersangabe. (Antrag bei der Ethikkommission Würzburg vom 04.04.2011 zur Isolierung von Primärzellen aus menschlichen Geweben/Blutproben)

3. Methoden

Allgemeines:

Um die Gefahr einer Kontamination der Zellkulturen zu vermindern, wurde für alle sterilen Arbeiten eine Sicherheitswerkbank der Stufe II verwendet, unter der durch einen laminaren Luftstrom eine keimfreie Umgebung geschaffen wird.

Die verwendeten Medien und Puffer wurden zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Kultivierung aller Zelltypen erfolgte im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO₂-Gehalt und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Vor Isolierung der jeweiligen Primärzellen wurde außerdem eine Sterilkontrolle des Transportmediums in eine Zellkulturflasche überführt und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.1 Allgemeine Zellkulturtechnik

3.1.1 Passagieren von Zellen

Sobald die Zellkultur zu 80-90% konfluent waren, wurde eine Passage durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach einmaligem Spülen mit PBS/EDTA für 3min mit Trypsin-Lösung im Brutschrank inkubiert. Hierbei werden zum einen durch den Chelatbildner EDTA zweiwertige Ionen gebunden, die die Verbindung zwischen Zellmembran und Kulturoberfläche stabilisieren. Zum anderen erfolgt eine enzymatische Spaltung der Zell-Substrat-Komplexe durch die Serinprotease Trypsin. Das Ablösen der Zellen konnte durch vorsichtiges Klopfen gegen die Flasche unterstützt werden. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von FCS abgestoppt und die Zellen nach Resuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Da Monozyten im Gegensatz dazu nur sehr leicht an den Oberflächen der Zellkulturplatte hafteten, wurden diese Zellen allein durch Abschaben der Platte mit einem Zellschaber abgelöst und die Suspension in ein 50ml Tube überführt. Nach sorgfältigem Spülen mit PBS/EDTA wurde das gesamte Volumen bei 1200rpm für 5min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert, um im Anschluss daran eine Zellzählung durchzuführen. Vor der Aussaat in Zellkulturflaschen oder auf die zu testenden Oberflächen, wurde die gewünschte Zellzahl aus der Suspension entnommen und mit Kulturmedium auf die entsprechende Konzentration eingestellt.

3.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20µl der Zellsuspension entnommen und 1:2 mit Trypanblau verdünnt und mit einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Dazu wurde der Mittelwert aus den vier Großquadraten gebildet.

Folgende Formeln wurden zur Berechnung verwendet:

Lebendzellzahl:

$$LZZ = MW_{LZZ} * 10000 * VF_{TB} * V_{susp.ges}$$

Gesamtzellzahl

$$ZZ_{ges} = (MW_{LZZ} + MW_{ZZ.tot}) * 10000 * VF_{TB} * V_{susp.ges}$$

Vitalität

$$V[\%] = LZZ * ZZ_{ges}^{-1} * 100\%$$

LZZ	Lebendzellzahl	VF _{TB}	Verdünnungsfaktor Trypanblau
MW _{LZZ}	Mittelwert der Lebendzellzahl	ZZ _{ges}	Gesamtzellzahl
MW _{ZZ.tot}	Mittelwert der toten Zellen	V	Vitalität
V _{Susp.ges}	Gesamtvolumen der Suspension [ml]		

Im Anschluss an die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in gewünschter Dichte in Zellkulturflaschen oder auf die zu testenden Oberflächen ausgesät.

3.1.3 Fixierung von Zellen auf Chamberslides und Silikonoberflächen

Um die Proben nach ausreichender Kultivierung für die immunhistochemische Färbung vorzubereiten, wurde eine Fixierung durchgeführt. Nach Absaugen des Kulturmediums und ausreichender Spülung mit PBS⁻, wurde je nach Zelltyp eiskaltes EtOH/Aceton (1:2) oder im Falle der Adipozyten 4%-iges PFA auf die besiedelte Matrix pipettiert. Da die Fettvakuolen der differenzierten Fettzellen durch Alkohol herausgelöst werden, ist diese Methode hierfür nicht geeignet. Nach zehnmütiger Inkubationszeit bei geschlossenem Deckel und unter dem Abzug, wurden die Proben in TBS-Puffer überführt.

3.2 Immunhistochemische Färbung mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern

Da die Silikonplättchen aufgrund ihrer texturierten Oberflächenstruktur für Lichtmikroskopie ungeeignet waren, wurden Zelltypen-spezifische Antigene über eine indirekte

Immunfluoreszenz nachgewiesen. Diese waren Kollagen I für Fibroblasten, GLUT4 als Adipozytenmarker und CD68 als Makrophagen-identifizierendes Oberflächen-Antigen.

Dazu wurden Zellen sowohl auf den verschiedenen Silikonoberflächen, als auch auf 8-well Chamberslides aus Glas und Permanox kultiviert und gegebenenfalls differenziert. Die ausgesäte Zellzahl betrug dabei, ausgehend von der optimalen Kulturdichte in einer Zellkulturflasche, $1,2 \times 10^4$ Zellen für Fibroblasten, 3×10^4 Adipozytenvorläuferzellen und 1×10^6 Monozyten/ml. Nach ca. 7-14 Tagen wurden die Zellen fixiert und gefärbt.

Zunächst wurde dafür von dem jeweiligen Antikörper eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Dazu wurde die gewünschte Menge an Antikörper mit dem benötigten Volumen Diluent in einem Reaktionsgefäß vermischt. Als Negativkontrolle wurde der entsprechende Isotyp auf die gleiche Konzentration wie der Primärantikörper eingestellt. Nach dreimaligem Waschen der Proben mit TBS-Puffer für je fünf Minuten, erfolgten die Übersichtung mit den jeweiligen Verdünnungen und eine Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurde der Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 vorbereitet. Im Anschluss an erneutes sorgfältiges Waschen, wurde ein ausreichendes Volumen dieser Lösung auf alle Zellen pipettiert und für eine weitere Stunde belassen. Wichtig dabei war es, die Feuchtekammer mit den Proben abzudecken, um die lichtempfindlichen fluoreszierenden Konjugate der Antikörper zu schützen und somit eine sehr gute Bildqualität zu gewährleisten.

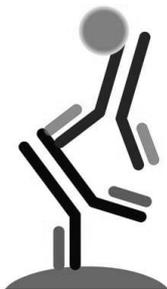


Abbildung 5 Indirekte Immunfluoreszenz. (Univ.-Prof. Dr. Irene K. Lichtscheidl)

Der Antikörper bindet in einem ersten Inkubationsschritt an das gesuchte Target. Anschließend werden die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe durch einen fluoreszenzgekoppelter Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet ist, sichtbar gemacht.

Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurden die Proben erneut gewaschen und die Chamberslides mit Fluoromount G mit DAPI luftblasenfrei eingedeckt und vor dem Mikroskopieren für fünf Minuten getrocknet. Ein Eindecken der un-/beschichteten Silikonplättchen war aufgrund ihrer Dicke nicht möglich. Deshalb wurde auf die Plättchen lediglich ein Tropfen Eindeckmittel pipettiert und diese dann sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das Prinzip der Gegenfärbung mit DAPI besteht darin, dass dieser Farbstoff sehr schnell in den Zellkern aufgenommen wird und dort äußerst selektiv an DNA bindet. Die so gebildeten spezifischen Komplexe fluoreszieren stark blau.

3.3 Bestimmung von Proliferation und Vitalität

3.3.1 CellTiter-Glo®

Die Proliferation wurde mithilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays (Promega) bestimmt. Dazu wurden Zellen auf den verschiedenen beschichteten Silikonoberflächen je nach Zelltyp zwischen sechs und acht Tagen kultiviert. Anschließend wurde dem Medium eine äquivalente Menge CellTiter-Glo®-Reagenz hinzugefügt und die Platte, in der sich die besiedelten Matrices befanden, für zwei Minuten geschüttelt. Nach einer zehnminütigen Ruhephase erfolgte die Messung des Lumineszenz-Signals mittels Photometer. Um stabile Messwerte zu erhalten, sollte der Assay bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Das Abkühlen der Kulturplatte von 37°C auf ca. 22°C beeinflusst den ATP-Gehalt vernachlässigbar gering. (Lundin et al. 1986)

Das Prinzip dieses Testverfahrens beruht darauf, dass vitale, metabolisch aktive Zellen in ihren Mitochondrien ATP produzieren, das mithilfe der zugegebenen Luciferase über die Umwandlung von Luciferin als Lumineszenzsignal gemessen werden kann. Endogene ATPasen werden während der Zellyse inhibiert. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine signifikante, lineare Korrelation zwischen der Zellzahl in einer Kultur und der photometrisch bestimmten Menge an ATP besteht. (Crouch et al. 1993)

Abhängig von den vorherrschenden Kulturbedingungen, wie Sauerstoff – und Nährstoffangebot, Konfluenz und Differenzierungsgrad, reguliert eine Zelle ihre Stoffwechselaktivität hoch oder herunter und beeinflusst somit ihren ATP-Gehalt. So kann man beispielsweise in stimulierten Zellen einen höheren Spiegel intrazellulärer Energieträger nachweisen. Dies kann folglich zu einer Diskrepanz zwischen der gemessenen ATP-Menge und der tatsächlichen Zellzahl führen.

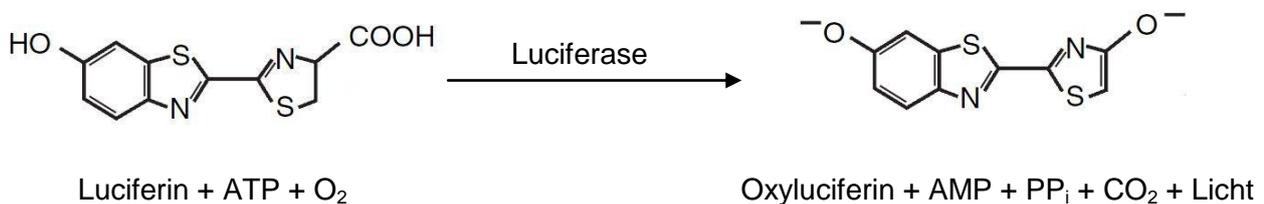


Abbildung 6 Luciferase-Reaktion. (Promega 2011)

Unter Verbrauch von ATP und Sauerstoff wird das Reagenz Luciferin in Oxyluciferin umgewandelt und dabei Energie in Form von Licht freigesetzt.

3.3.2 Quant-iT™ PicoGreen®

Als konstante Größe primärer Zellen gilt der DNA-Gehalt. Deshalb wurde zum Vergleich der Zellzahl auf den verschiedenen Materialien auch eine DNA-Messung mittels Quant-iT™

PicoGreen® (Invitrogen) durchgeführt. Dazu wurden abhängig vom jeweiligen Zelltyp 3×10^5 - 1×10^6 Zellen pro Plättchen ausgesät und diese für 6-8 Tage inkubiert. Je Oberflächenbeschichtung wurden dabei drei Ansätze vorbereitet. Zur Extraktion der DNA wurden die besiedelten Plättchen nach einmaligem Spülen mit PBS⁻ mit einem Skalpell in kleine Stückchen geschnitten und in ein Inkubationsgefäß überführt. Anschließend wurde je 1ml Lysis-Puffer mit 1% Triton-X hinzugefügt und die Proben für 1h im Kühlraum unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 14000rpm und 4°C für 10min. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C eingefroren.

Vor der Messung des DNA-Gehaltes wurden folgende Lösungen vorbereitet:

- einfach konzentrierter TE-Puffer in Reinstwasser
- 1:200 Verdünnung des Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagenz in TE-Puffer
- Lambda-DNA Stocklösung für high-range (1µg/ml - 1ng/ml) und low-range (25ng/ml - 25 pg/ml) Standardkurve in TE-Puffer

Im Anschluss daran wurden jeweils 100µl Standard, TE-Puffer als Blank-Wert und Probe in eine schwarze 96-well-Platte pipettiert, wobei jeder Wert in Triplikat gemessen wurde. Dazu wurden jeweils 100µl Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagenz hinzugefügt und nach einer fünf minütigen Inkubationszeit die Fluoreszenz gemessen. Neben der Messung des DNA-Gehaltes der Zellen, die zuvor auf den zu testenden Silikonoberflächen ausgesät worden waren, wurde für jeden Zelltyp auch eine Standardkurve nach Kultivierung in einer Zellkulturflasche erstellt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Extraktion

Zur Gewinnung der RNA aus kultivierten Zellen wurde das RNeasy MinElute® Cleanup Kit der Firma Qiagen verwendet. Wie zur Messung des DNA-Gehaltes wurden, abhängig vom jeweiligen Zelltyp, 3×10^5 - 1×10^6 Zellen pro Plättchen ausgesät und diese für sechs bis acht Tage kultiviert. Je Oberflächenbeschichtung wurden dabei ebenfalls drei Ansätze vorbereitet. Die besiedelten Plättchen wurden sodann nach einmaligem Spülen mit PBS⁻ mit einem Skalpell in kleine Stückchen geschnitten und in ein Inkubationsgefäß überführt, in das bereits eine Stahlkugel vorgelegt worden war. Anschließend wurden je 400µl QIAzol zugegeben und die Proben für drei Minuten bei 50Hz im TissueLyser geschüttelt. Nach Zugabe von weiteren 600µl QIAzol und 200µl Chloroform, wurden die Proben für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 10000g und 4°C wurde die entstandene wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 70%-iger Ethanol hinzugefügt. Danach wurden die Proben auf in Sammelröhrchen befindliche Silica-Gel-RNA-

Extraktionssäulen gegeben und bei 8000g kurz zentrifugiert, um eine Bindung der RNA an die Membran der Säule zu erreichen. Es erfolgte die Zugabe von je 500µl RPE-Puffer und 80%-igem EtOH mit jeweils einem anschließenden Zentrifugationschritt. Nach Umstecken der Säulen in neue Sammelröhrchen und einer weiteren Zentrifugation bei offenem Deckel, wurden 14-20µl RNase-freies Wasser zugegeben. Nachdem die Proben für weitere drei Minuten zentrifugiert worden waren, erfolgte die Messung von RNA-Konzentration und -qualität im erhaltenen Eluat und die Lagerung der RNA bei -80°C.

3.4.2 Messung der RNA-Konzentration und -qualität

Um die RNA-Konzentration und die Reinheit der aufgearbeiteten Proben zu bestimmen, wurde eine Messung mit Hilfe des Experion[®] RNA Analyse Kit durchgeführt. Dazu wurden 600µl RNA-Gel bei 1500g und Raumtemperatur für zehn Minuten filtriert und anschließend 65µl davon mit 1µl RNA-Farbstoff gemischt. Außerdem wurden je 2µl der zu messenden Proben und 2µl RNA-Leiter für zwei Minuten im Thermoblock erhitzt und dann sofort für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach Reinigung der Elektroden erfolgte die Vorbereitung des Mess-Chips, indem 9µl Gel-Farbstofflösung in das dafür vorgesehene well pipettiert und der Chip auf der Priming-Station geschüttelt wurde. Die Mikrokanäle sollten alle komplett und blasenfrei gefüllt, d.h. nicht mehr sichtbar sein. Anschließend wurden je 9µl Gel-Farbstoff und filtriertes Gel in die jeweiligen wells pipettiert. Außerdem wurden 5µl Loading-Puffer in jedes der von 1-12 und mit L beschrifteten Öffnungen. Dazu kamen je 1µl RNA-Leiter und 1µl der zu vermessenden Proben. Nach einminütigem Vortexen wurde die Probe im Experion-Gerät anhand einer automatisierten Elektrophorese vermessen.

3.4.3 cDNA-Synthese

Zum Umschreiben der gewonnenen RNA in komplementäre DNA, wurde das iScript[™] cDNA Synthese Kit der Firma Bio-Rad verwendet. Dazu erfolgte zunächst die Einstellung aller Proben auf eine Konzentration von 250ng in einem Gesamtvolumen von 15µl ddH₂O. Pro Probe wurden jeweils 4µl 5x iScript Reaktions-Mix mit je 1µl reverser Transkriptase gemischt und auf die Inkubationsgefäße verteilt. Die cDNA-Synthese lief sodann nach folgendem Reaktionsprotokoll im Thermocycler ab:

Tabelle 10 Ablauf der cDNA-Synthese

Dauer [min]	Temperatur [°C]	Reaktion
5	25	Primerextension
30	42	Elongation der Erststrang-cDNA
5	85	Abstoppen
	10	Halten (optional)

Anschließend wurden die Proben 1:5 mit TE-Puffer verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.4.4 real-time PCR

Zur Bestimmung der Expression verschiedener Markergene wurde eine real-time PCR durchgeführt. Dazu wurden zunächst Stocklösungen der benötigten Oligonukleotide durch Lösung in sterilem TE-Puffer in einer Konzentration von 100µM (= 100pmol/µl) hergestellt und diese 1:25 mit dH₂O verdünnt.

Anschließend wurde ein Mastermix, bestehend aus den folgenden Komponenten angesetzt und in eine 96-well-Platte vorgelegt.

Tabelle 11 Zusammensetzung des Mastermix

Komponente	Volumen pro Reaktion
SsoFast EvaGreen supermix	10µl
RNase/DNase freies Wasser	4µl
Forward Primer	2µl
Reverse Primer	2µl

Der vorgefertigte Supermix enthält bereits DNA-Polymerasen, Desoxyribonukleotide und den Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I. Durch unspezifische Bindung an Doppelstrang-DNA während der Reaktion, wird das Fluoreszenz-Signal, das in Lösung nur sehr schwach ist, 1000-fach gesteigert. Somit wächst das gemessene Signal proportional zur Menge an amplifiziertem PCR-Produkt.

Zum vorgelegten Mastermix wurden pro well je 2µl der zu messenden cDNA und pro Primer je einmal 2µl ddH₂O als Negativkontrolle hinzu pipettiert. Auf die Platte wurde eine Folie aufgeklebt und anschließend die PCR mit folgendem Temperaturprotokoll gestartet.

Tabelle 12 Die PCR-Zyklen

Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
1	95	30
40	95	5
	53	5
1	65	5
1	95	

Die optimale Anlagerungstemperatur war dabei für alle Primer in einem Vorversuch mit Hilfe einer Gradienten-PCR bestimmt worden. Ebenso wurden Standardkurven anhand von Verdünnungsreihen erstellt.

Nach jedem Zyklus erfolgte, im Gegensatz zu einer konventionellen PCR, die Messung des Fluoreszenz-Signals. Die Proben wurden jeweils in Duplikaten gemessen und bei der

Auswertung auf die Haushaltsgene GAPDH und Aktin- β normiert. (Bio-Rad Laboratories 2006)

Typisch für ein solches Gen ist, dass es nicht reguliert und unabhängig von Zelltyp, Proliferationsstadium und äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert wird. Typischerweise codieren Haushaltsgene für Strukturmoleküle oder Enzyme, die mit dem Grundstoffwechsel der Zelle zusammenhängen. So katalysiert GAPDH einen Schritt der Glykolyse und Aktin- β ist Teil des Zytoskeletts. Das humane Genom besitzt ca. 22.000 dieser Gene. (Koolman und Röhms 2009; Biele und Horton 2008; Miller und Therman 2001)

3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Beurteilung der Spezifität der eingesetzten Primer wurde im Anschluss an die Gradienten-PCR eine Gelelektrophorese mit dem amplifizierten Produkt aus jeweils einer Probe durchgeführt. Dazu wurde 1g Agarose-Pulver in 50ml Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer gelöst, erhitzt, mit 4 μ l Ethidiumbromid versetzt und in eine Form gegossen. Nach dem Erkalten wurden die Taschen des Gels je mit 10 μ l Proben beladen, die zuvor mit 2 μ l Loading-Puffer versetzt worden waren. Außerdem wurde auch ein Größenmarker mit definierten Fragmenten von 100 bis 3000 Basenpaaren als Vergleichswert aufgetragen. Durch Erhitzen der Agarose entsteht aus den zuvor linear angeordneten Molekülen ein Netz aus Poren mit einem Durchmesser von 100-300nm. Nach Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Nukleinsäure-Stränge durch die Gelmatrix von der Kathode zur Anode. Aufgrund der positiven Korrelation zwischen Nukleotidanzahl und Ladung, bewegen sich kleinere DNA-Moleküle schneller durch das elektrische Feld als längere und es erfolgt eine Auftrennung der in der Probe enthaltenen Stränge entsprechend ihrer Größe. Zur Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde Ethidiumbromid verwendet, das zwischen die Basen der DNA interkaliert. Neben einem veränderten Anregungsspektrum, wird dadurch die Konzentration des Fluoreszenz-Farbstoffs erhöht, sodass bei Anregung mit UV-Licht die Stellen im Gel, an denen sich Nukleinsäuren befinden, hell aufleuchten.

3.5 Aufarbeitung von Geweben und Kultivierung und Differenzierung der Zellen

3.5.1 Isolation und Kultivierung primärer Fibroblasten

Nach Überführung des Hautbiopsats in eine sterile, mit PBS⁺ gefüllte Petrischale, wurden Fett- und andere Gewebereste sorgfältig entfernt, dreimal mit Puffer gespült und die Probe danach mit einem Skalpell in 2-3mm breite Streifen geschnitten. Im Anschluss an eine dreimalige Spülung mit PBS⁻, wurde das Gewebe mit Dispase-Lösung (2,0 U/ml) vollständig überdeckt und für ca. 16-18h bei 4°C inkubiert. Durch die enzymatische Auflösung der Basalmembran, konnte nach Ablauf der Inkubationszeit Epidermis und Dermis mit einer

Pinzette voneinander getrennt werden. Die Dermisstreifen wurden mit einem Skalpell zerkleinert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt, in das bereits 5ml Kollagenase vorgelegt worden waren. Nachdem die Petrischale mit weiteren 5ml der Lösung gespült worden war, erfolgte eine 45 minütige Inkubation bei 37°C und eine anschließende Zentrifugation für 5min bei 1200rpm. Das erhaltene Pellet wurde einmal mit 10ml DMEMr-Kulturmedium gewaschen, erneut zentrifugiert und in 2ml Medium resuspendiert. Das gesamte Volumen wurde in eine T75-Zellkulturflasche überführt, mit 1% Penstrep versetzt und in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurden weitere 2ml Kulturmedium zugegeben. Ein erster Medienwechsel erfolgte am 3-4 Tag. Größere Gewebestücke wurden durch die verbleibende Kollagenaseaktivität verdaut und es konnte ohne Antibiotikum weiterkultiviert werden. Abbildung 7 zeigt die einzelnen Arbeitsschritte an zwei Tagen.

Tag 1



A



B



C

Tag 2



D



E



F

Abbildung 7 Isolierung humaner Fibroblasten aus Hautbiopsaten an Tag 1 (A-C) und 2 (D-F).

3.5.2 Isolation und Kultur von Adipozyten-Vorläuferzellen

Zunächst wurde das Fett mehrmals mit Waschpuffer bestehend aus PBS⁻ und 2% FCS gewaschen und mit 500ml Adipozytenisolationpuffer versetzt. Anschließend wurde die Probe für zwei Stunden im 37°C warmen Schüttelbad inkubiert und dabei alle 30 Minuten per Hand geschwenkt. Die Flüssigkeit, die sich dabei unterhalb der Fettschicht abgesetzt hatte, wurde sodann mit einer Einmalpipette aufgenommen, in 50ml-Greineröhrchen überführt und für 10min bei 1000g zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend abgesaugt, die

Pellets in wenig Waschpuffer aufgenommen, gepoolt und erneut zentrifugiert. Nachdem die Zellen resuspendiert und über ein Zellsieb in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettiert worden waren, wurden 15ml Biocoll in einem weiteren Röhrchen vorgelegt. Daran schlossen sich eine vorsichtige Überschichtung der Separationslösung mit der Zellsuspension und eine Zentrifugation bei 1000g für 30 Minuten ohne Bremse an. Dabei wurden die verschiedenen Biopsat-Bestandteile nach ihrer Dichte aufgetrennt, wobei sich ganz unten die Erythrozyten und darüber die Separationslösung ansammelten. Abbildung 8 gibt die Isolierungsschritte bis zur Dichtezentrifugation der Primärzellen wider.

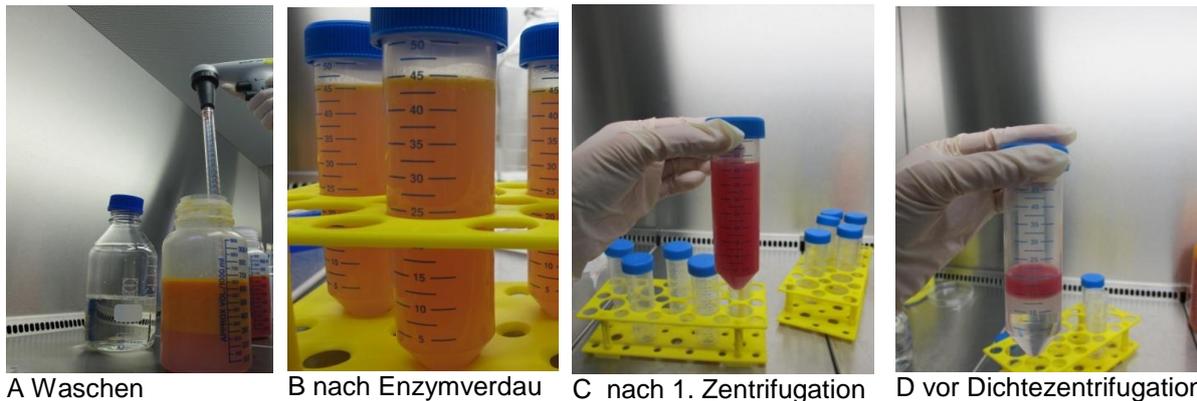


Abbildung 8 Isolierung humaner Adipozytenvorläuferzellen nach Liposuktion.

Die Adipozytenvorläuferzellen befanden sich in der gelblich-weißen Interphase, die von Plasma überdeckt wurde. Diese Interphase wurde mit einer Pipette abgesaugt, die Zellen noch einmal gewaschen, in DMEM Ham's F12 aufgenommen, gezählt und in einer Dichte von 6×10^5 in eine T75-Zellkulturflasche ausgesät.

Nach einer siebentägigen Kultivierungsdauer im Brutschrank, erfolgte der erste Medienwechsel. Sobald die Kultur konfluent war, wurde sie für die Versuche verwendet.

Differenzierung von Adipozyten-Vorläuferzellen

Nach Kultivierung der Vorläuferzellen bis zur 100%-igen Konfluenz, sollte die Differenzierung induziert werden. Dazu wurden die Zellen für 14 Tage in Medium mit folgenden Zusätzen kultiviert:

Tabelle 13 Medium zur Differenzierung der Vorläuferzellen

DMEM + 10% FCS	Endkonzentrationen:
Dexamethason	1 μ M
IBMX	500 μ M
Insulin	1 μ g/ml
Indomethacin	100 μ M

Ein Medienwechsel erfolgte dabei dreimal pro Woche. Außerdem wurde eine Negativkontrolle mit RPMI-Medium ohne Zusätze mitgeführt. Für die Differenzierung eigneten sich Zellen bis zur zweiten Passage.

3.5.3 Isolation und Kultivierung von Monozyten

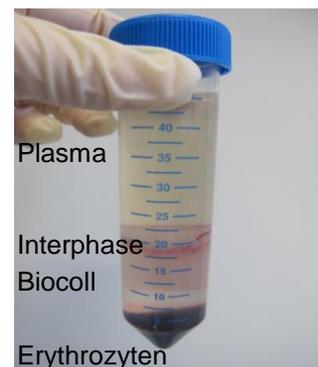
Um Monozyten aus einer Leukozytenprobe zu gewinnen, wurde das Blutkonzentrat im ersten Schritt aus dem Zapfen in ein Zentrifugenröhrchen getropft und mit dem Waschpuffer aus PBS/EDTA und 1% FCS auf 50ml aufgefüllt. Daran schloss sich die Verteilung des Volumens auf zwei weitere Röhrchen an, in die zuvor je 20ml Biocoll vorgelegt worden waren. Es erfolgte eine Dichtezentrifugation für 20min bei 1000g ohne Bremse. Anschließend wurde die entstandene Interphase abpipettiert, in einem Gesamtvolumen von 50ml resuspendiert und bei 300g und einer Temperatur von 4°C für 10min zentrifugiert. In Abbildung 9 sind die ersten Schritte der Isolierung aufgezeigt.



A Zapfen



B vor Dichtezentrifugation



C nach Dichtezentrifugation

Abbildung 9 Erste Schritte zur Isolierung von Monozyten aus Buffy-Coat.

Im nächsten Schritt wurde eine Zellzählung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dabei wurden 10 μ l der 50ml-Zellsuspension zunächst 1:10 mit Waschpuffer und danach mit 10 μ l Trypanblau verdünnt.

Das für die weitere Aufarbeitung zu entnehmende Volumen errechnete sich sodann aus folgender Formel:

$$\frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{ermittelte Zellzahl}} \times 50\text{ml}$$

Hierbei galt es zu beachten, dass pro verwendete MS-Säule maximal eine Gesamtzellzahl von 2×10^8 Zellen eingesetzt werden durfte.

Das entnommene Aliquot wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und wiederum auf ein Gesamtvolumen von 50ml mit Puffer aufgefüllt.

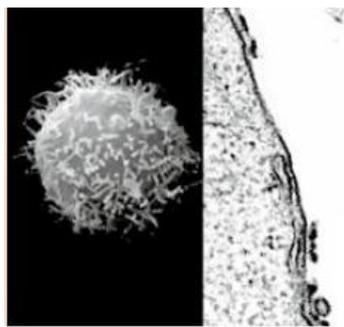
Nach wiederholter Zentrifugation erfolgte zur Durchführung einer positiven Separation der gewünschten Zellen das Labeling des erhaltenen Pellets mit CD14-Microbeads (Miltenyi). Diese magnetischen Antikörper binden an das CD14-Oberflächenantigen, das im Besonderen auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird und zum LPS-Rezeptor Komplex gehört. Da CD14 allerdings keine cytoplasmatische Domäne besitzt, findet durch diese Bindung keine Signaltransduktion statt. (siehe Miltenyi Daten Blatt DS130-050-201)

Um eine unspezifische Markierung der Zellen zu verhindern und somit eine möglichst große Reinheit der aufgetrennten Zellen zu erhalten, wurde in der Folge mit gekühlten Lösungen und auf Eis gearbeitet. Pro 10^7 Zellen mussten 80µl Puffer und 20µl Micro-Beads hinzugefügt, gut vermischt und für 15min im Kühlraum bei 4°C inkubiert werden.

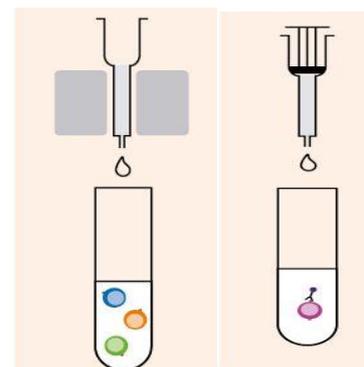
Abbildung 10 zeigt das Markierungs- und Aufreinigungsprinzip mit Hilfe des magnetischen Antikörpers.



A magnetisches Labeling



B REM-Aufnahme



C magnetische Separation/Eluieren

Abbildung 10 Markierung und Auftrennung CD-14 positiver Zellen. (Miltenyi Biotec GmbH 2011)

Nach Hinzufügen von 2ml Waschpuffer, wurden die Zellen bei 300xg und einer Temperatur von 4°C, 10min lang zentrifugiert und anschließend in einem Gesamtvolumen von 500µl resuspendiert. Die magnetische Auftrennung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Tabelle 14 Weitere Schritte zur Gewinnung der CD-14 positiver Zellen

Einsetzen der Säule in den passenden Magneten	
Spülen der Säule mit Waschpuffer	500µl
Zugabe der Zellsuspension	
Waschen der Säule mit Puffer	3x500µl
Entfernung der Säule aus dem Magneten	
Zugabe von Puffer	1ml
Durchdrücken des Volumens in frisches Zentrifugenröhrchen mithilfe des Stempels	

Daran schlossen sich eine erneute Zentrifugation und eine Zählung der Zellen an. Die Reinheit der aufgereinigten Zellprobe wurde mithilfe der Durchflusszytometrie unter Verwendung eines CD14-FITC-Antikörpers bestimmt. Die erhaltenen Monozyten wurden anschließend in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml ausgesät und kultiviert.

Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen

Um die CD14-positiven Zellen zu Makrophagen zu differenzieren, wurde dem Kultivierungsmedium zunächst 25ng/ml M-CSF zugesetzt. Nach zwei Tagen erfolgte ein partieller Medienwechsel, wobei je 1/3 des Differenzierungsmediums abgenommen und dieses bei 1200g und Raumtemperatur für 10min zentrifugiert wurde. Das erhaltene Pellet wurde sodann in einer äquivalenten Menge an frischem Medium aufgenommen und wieder auf die Kulturplatten verteilt. Am Tag sechs wurde eine über Nacht Stimulierung mit 20ng/ml IL-4 durchgeführt. (Solinas et al. 2010)

4. Ergebnisse

4.1 Handhabung der Silikonmatrices

Für die Durchführung der verschiedenen In-vitro-Untersuchungen relevanter Zelltypen auf ihr Proliferationsverhalten und die Expression unterschiedlicher Genprodukte wurden texturierte Silikonoberflächen mit rekombinanter Spinnseide und Halofuginon beschichtet, gestanzt und sterilisiert. Je Oberflächenbeschichtung standen für die unterschiedlichen Testreihen insgesamt ca. 100 Plättchen zur Verfügung. In zahlreichen Vorversuchen zur Etablierung verschiedener Verfahren, wurden dabei zunächst das Verhalten der Matrices in Medium, das Aufbringen der Zellen, die Möglichkeit der Licht- und Rasterelektronenmikroskopie, das Einbetten in Paraffin und Plastik, die Anfertigung von histologischen Schnitten auf einem Mikrotom, die Gefrierschnitttechnik, die Möglichkeit verschiedener Fluoreszenzfärbungen wie z.B. mit Dil oder DiO, eine Lebend-/Todfärbung mit Propidiumiodid oder mit Nile Red, das spezifisch Triacylglyceride in Fettvakuolen färbt, untersucht.

Hierbei stellte sich zunächst heraus, dass die Matrices aufgrund ihrer texturierten Oberfläche nicht für die klassische Lichtmikroskopie geeignet waren, da man – wie Abbildung 11 zeigt – keine Zellen in Kultur erkennen konnte. Auch die Anfertigung histologischer Schnitte war aufgrund der Materialbeschaffenheit nicht möglich, da die Plättchen beim Schneiden in feinste Silikonkugelchen, unabhängig vom verwendeten Einbettungsmaterial, zerfielen und nicht auf einen Objektträger aufgebracht werden konnten.

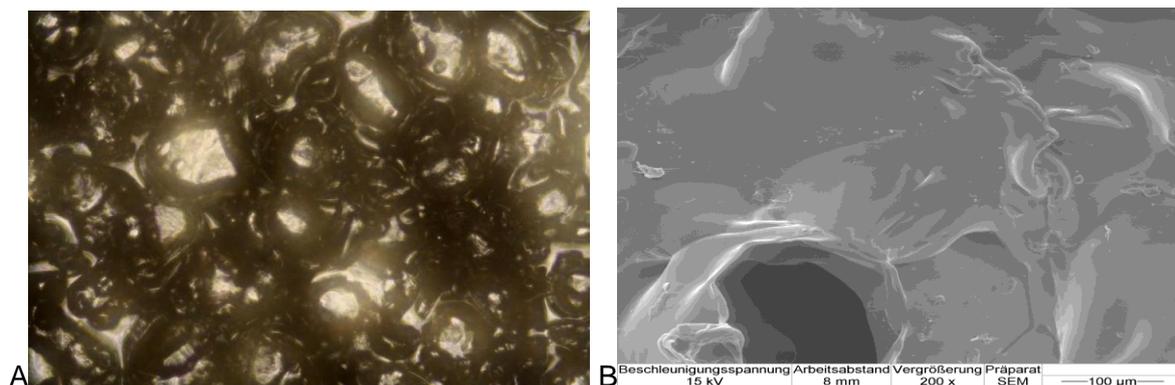


Abbildung 11 Aufnahmen der texturierten Silikonmatrices unter (A) dem Lichtmikroskop und (B) dem Rasterelektronenmikroskop. (Vergrößerung 200x)

Wurden die kultivierten Zellen vor oder nach Aufbringen auf die zu testenden Matrices mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie Dil oder Propidiumiodid gefärbt und mikroskopiert, so wurde die Bildqualität durch diffuses Leuchten der Zellen, Einlagerung von Farbstoff auch nach mehrmaligen Waschschritten und einer erschwerten Fokussierung aufgrund der Dreidimensionalität der Matrix beeinflusst. Da das Fluoreszenzsignal außerdem durch

mehrfache Mikroskopie abgeschwächt wurde und die Zellen nach einer Lebend-/tot-Färbung nicht mehr weiterkultiviert werden konnten, waren diese Methoden, für längerfristige Beobachtungen oder weiterführende Versuche wie z.B. Bestimmung der Zellzahl nicht geeignet.

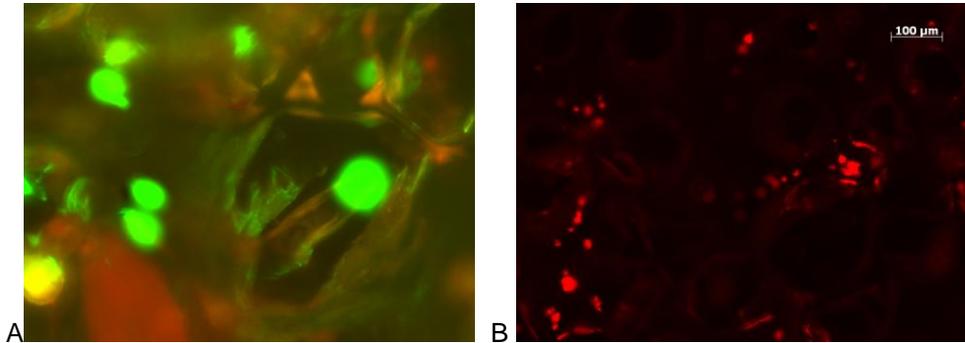


Abbildung 12 Fibroblasten auf Silikonmatrix.

(A) Lebend-/tot-Färbung mit Propidiumiodid, 20x, (B) Färbung mit Dil 20x.

Auch das Einwachsen der Zellen in die Vertiefungen des Silikonmaterials, führte dazu, dass sich Zellen bei der optischen Auswertung unter dem 2D-Mikroskop überlagerten und somit nicht vollständig ausgezählt werden konnten.

4.2 Kultivierung und Differenzierung primärer Zellen

Da die zu testenden Matrices, wie gezeigt, aufgrund ihrer texturierten Oberfläche nicht für die konventionelle Lichtmikroskopie geeignet waren, wurden als Referenz, abhängig vom jeweiligen Versuchsaufbau Zellen auf Chamberslides aus Glas und Permax, Zellkulturplatten oder -flaschen parallel mitgeführt.

Fibroblasten

Sobald die spindelförmigen Zellen nach ca. 7-8 Tagen in der Zellkulturflasche zu 80-90% konfluent waren, wurden sie wie oben beschrieben passagiert und auf die zu testenden Oberflächen ausgesät. Für die Versuche wurden Fibroblasten bis Passage 3 verwendet.

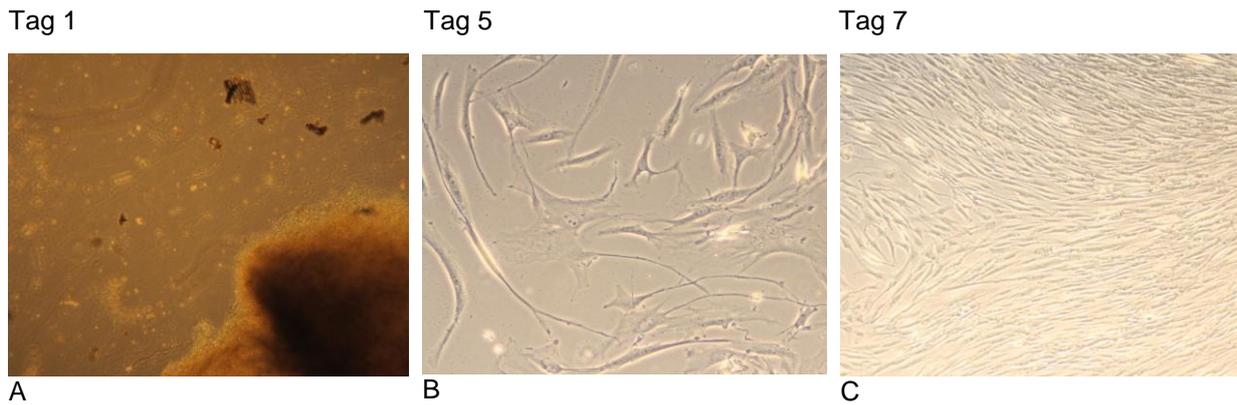


Abbildung 13 Fibroblasten in Zellkultur an Tag 2 (A), 5 (B), 7 (C).

Adipozyten

Nach der Aufarbeitung des Fettgewebes wurden Adipozytenvorläuferzellen zunächst in 50ml-Zellkulturflaschen für ca. 10-12 Tage kultiviert und Anschließend auf die zu testenden Matrices ausgesät und differenziert. Eine Negativkontrolle mit Standardmedium wurde dabei auf allen Oberflächen mitgeführt. Abbildung 14 zeigt Primärzellen der Passage 0 nach drei und zehn Tagen Kultivierung, sowie Zellen der Passage 1 auf Chamberslides nach 14-tägiger Versorgung mit Differenzierungsmedium im Vergleich zum Standardmedium. Während der Wachstumsphase war eine deutliche Zunahme der Intrazellulärmatrix mit flächemhaftem Aufspreiten der Zellen zu beobachten. Das Differenzierungsmedium mit Zusätzen wie Insulin und Steroidhormon induzierte eine vermehrte Einlagerung von Triglyceriden in Form kleiner Lipidvakuolen. Differenzierte Zellen verloren ihre Teilungsfähigkeit. Adipozytenvorläuferzellen wurden bis Passage 2 für die Versuche verwendet.

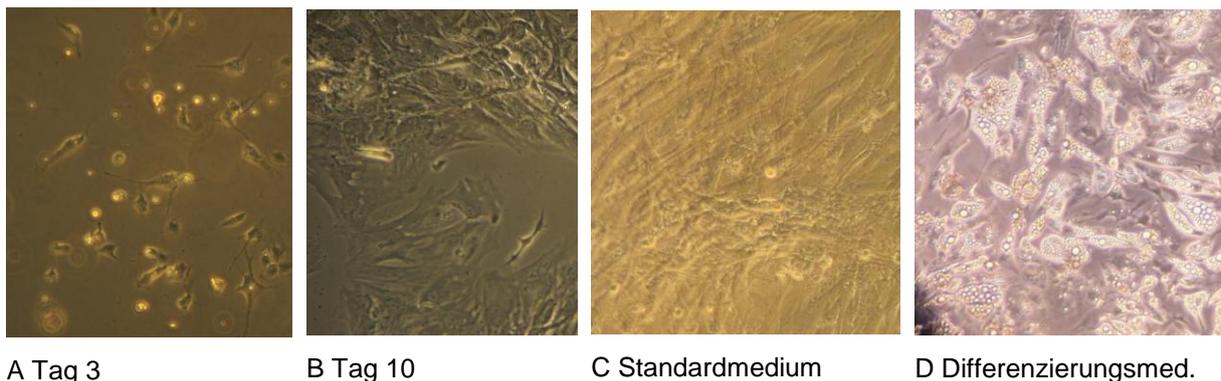


Abbildung 14 Kultur humaner Adipozytenvorläuferzellen (A, B, C) und Differenzierung (D).

Monozyten

Auch die CD-14 positiven Monozyten wurden sofort nach der Aufarbeitung sowohl auf den zu testenden Materialien, in Zellkulturflaschen als auch auf Chamberslides ausgesät. Am 6. Tag erfolgte eine über Nacht Stimulierung eines Teils der Kulturen mit IL-4.

Die Reinheit der ausgesäten Zellen betrug – wie Abbildung 15 zeigt – nach Aufarbeitung 98%.

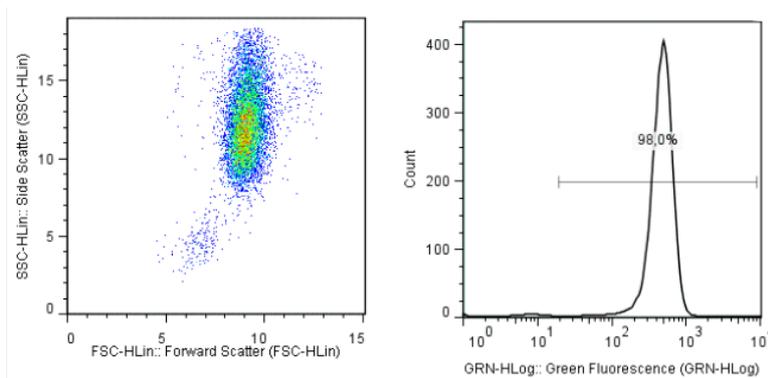


Abbildung 15 Durchflusszytometrie: CD-14-positive Fraktion nach Separation.

In der Zellkultur konnten verschiedene Morphologien beobachtet werden. Es fanden sich spiegeleiförmige Zellen mit rundem mittig gelegenen Zellkern und spindelförmige Leukozyten mit langgestrecktem Zellkörper, die am Kulturboden angehaftet waren. Außerdem gab es kleine Monozyten, die frei im Medium flottierten.



A

B Markierung zeigt verschiedene Morphologien adhärenter Zellen. Markierung zeigt verschiedene Morphologien

C

Abbildung 16 Kultivierung von Monozyten und (A) ohne und (B, C) mit M-CSF und IL-4 (A 10x; B, C 20x Vergrößerung).

4.3 Bestimmung von Proliferation und Vitalität

4.3.1 Cell-TiterGlo®-Assay

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes, als Maß für die Zellzahl in Kultur, zeigte nach 6 und 8 Tagen für Fibroblasten und Adipozytenvorläuferzellen den höchsten Wert bei Kultivierung auf normalen Kulturplattenoberflächen und die durchschnittlich niedrigste Lumineszenz für Zellen, die auf seide- und halofuginonbeschichteten Oberflächen gewachsen waren. Nach 8 Tagen Kultur stieg der Wert im Vergleich zur Vormessung jeweils an.

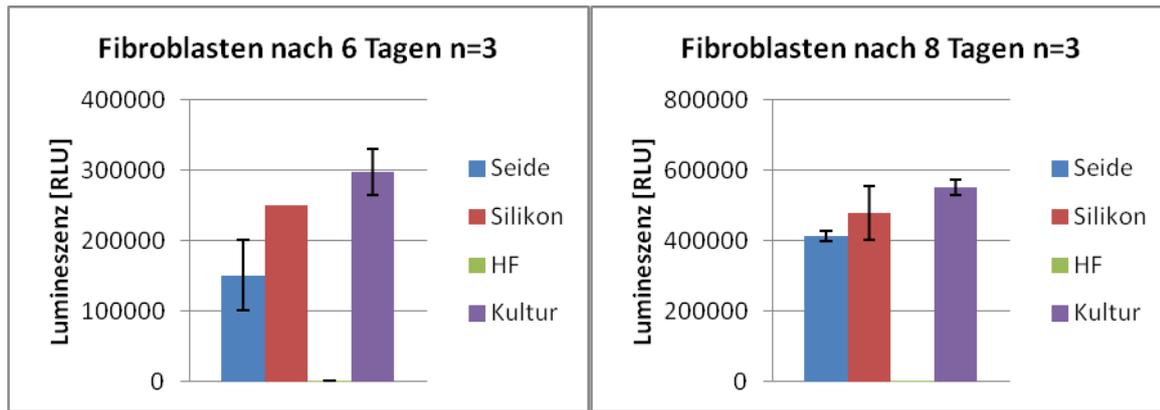


Abbildung 17 ATP-Gehalt

Quantitative Analyse des ATP-Gehalts von Fibroblasten nach 6 und 8 Tagen Kultivierung auf Seide, Silikon, Halofuginon und Zellkulturplatte.

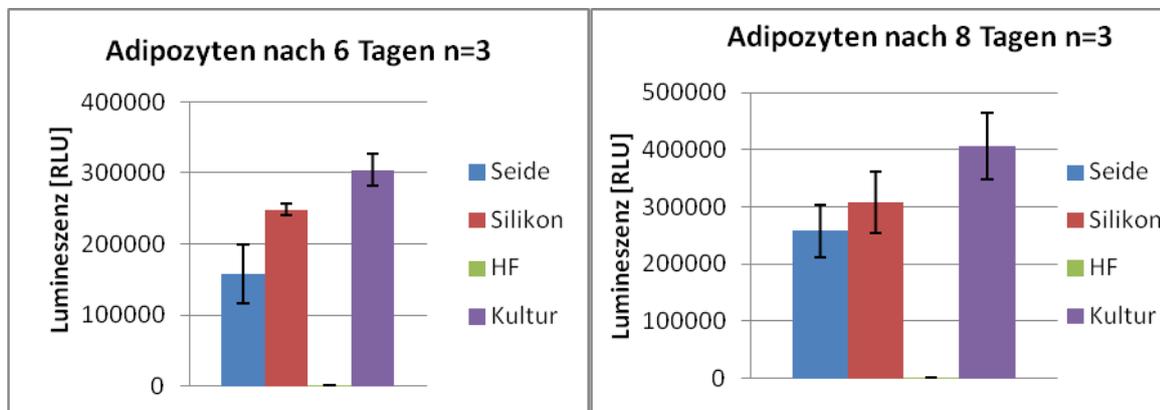


Abbildung 18 ATP-Gehalt

Quantitative Analyse des ATP-Gehalts von Adipozyten nach 6 und 8 Tagen Kultivierung auf Seide, Silikon, Halofuginon und Zellkulturplatte.

Für die Monozyten wurde der ATP-Gehalt ebenfalls nach 6 und 8 Tagen Kultivierung bestimmt. Dabei wurde jeweils die Hälfte der Zellkulturen einmal über Nacht mit IL-4 stimuliert. Für die Messung nach 6 Tagen zeigte die Lumineszenz die höchsten Werte für IL-4-behandelte Monozyten auf spinnseidebeschichteten Oberflächen. Ohne Zugabe des Zytokins erhielt man auf den Spinnseide-Matrices einen um ca. 50% reduzierten Wert. Ebendies konnte auch für Zellen in Kulturplatten beobachtet werden. Die Lumineszenz auf den Silikonplättchen war sowohl mit als auch ohne IL-4 gleich hoch und somit im Vergleich der unstimulierten Proben am höchsten.

Betrachtete man nun das Verhalten der Zellen nach 8 Tagen in Kultur, so blieben die Werte für Silikon- und Seidenplättchen in etwa gleich hoch; die Lumineszenzen, die auf Kulturplatten gemessen wurden, waren dagegen rückläufig. Den insgesamt höchsten Wert erhielt man für Zellen auf Silikonplättchen mit und ohne Stimulation durch IL-4.

Pro Oberfläche und Zelltyp wurden bei diesem Versuch jeweils drei Messwerte, sowie ein Leerwert, d.h. getestetes Plättchen in Medium, bestimmt. Für Matrices, die zuvor mit

Halofuginon behandelt wurden, lagen die Messwerte maximal 5-7fach über dem erhobenen Leerwert.

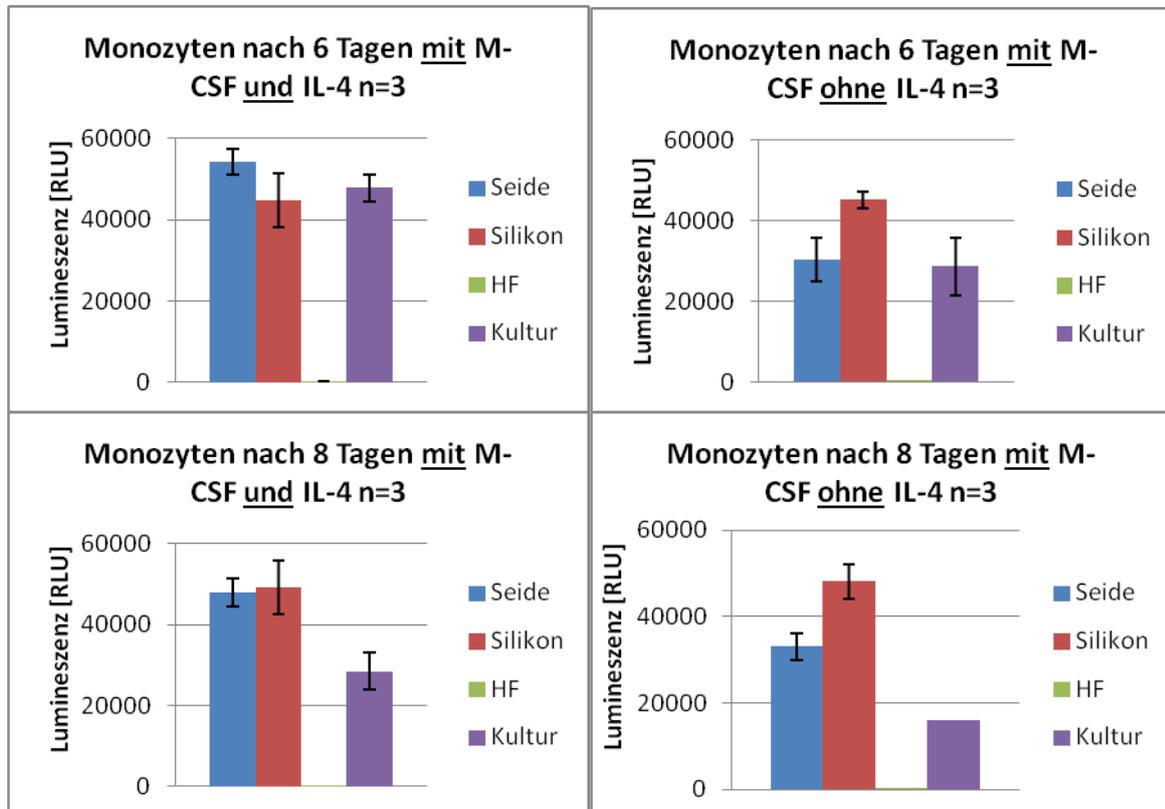


Abbildung 19 ATP-Gehalt

Relativer ATP-Gehalt von Monozyten nach 6 und 8 Tagen Kultivierung mit M-CSF und +/- über Nacht Stimulierung mit IL-4 auf Seide, Silikon, Halofuginon und Zellkulturplatte.

4.3.2 Quant-iT™ PicoGreen®

Desweiteren wurde der DNA-Gehalt der Zellen vergleichend bestimmt. Abbildung 20 zeigt die Höhe der gemessenen Fluoreszenzwerte für Fibroblasten, Adipozyten und Monozyten mit und ohne Stimulation durch IL-4 nach 7 Tagen Kultivierung auf den zu testenden Oberflächen Seide, Silikon, Halofuginon und auf Zellkulturplatten. Ordnet man die Werte in absteigender Reihenfolge vom höchsten zum niedrigsten DNA-Gehalt, so ergibt sich für Fibroblasten die Rangfolge Silikon-Kulturplatte-Seide, für Adipozyten Kulturplatte-Silikon-Seide, für Monozyten nach Zugabe des Zytokins etwa gleiche Werte auf silikon- und seidebeschichteten Oberflächen gefolgt von Kulturplatte. Ohne Stimulation der Monozyten durch IL-4 erhielt man die höchste Fluoreszenz auf Silikonoberflächen vor Seide und Kulturplatte. Der niedrigste DNA-Gehalt wurde für alle Zelltypen wieder jeweils auf Plättchen gemessen, die zuvor mit Halofuginon beschichtet worden waren. Somit ergibt sich, dass die photometrisch bestimmten Konzentrationen für DNA und ATP, die – wie in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen – als Maß für die Zellzahl herangezogen werden können, auf den

getesteten Oberflächenmaterialien übereinstimmende Ergebnisse für die verschiedenen Zelltypen aufweisen.

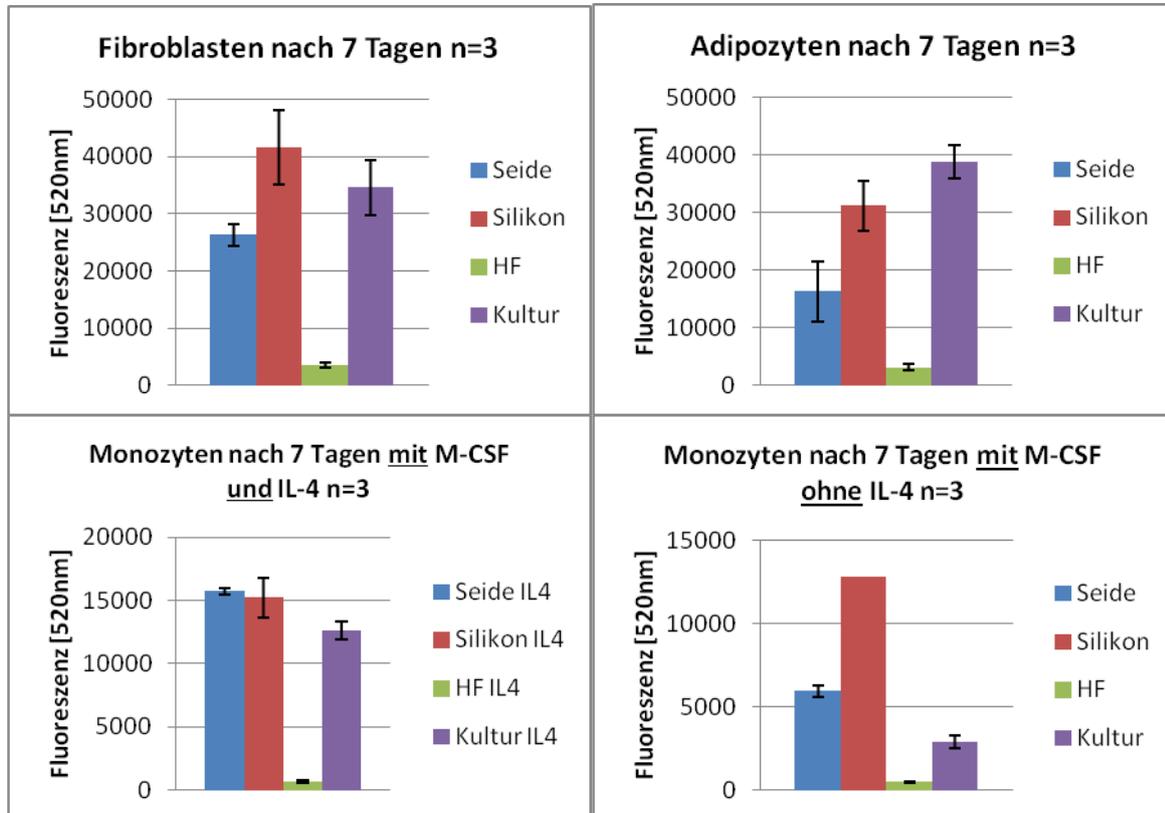


Abbildung 20 Gesamt-DNA-Gehalt

Analyse der Gesamt-DNA-Menge von Fibroblasten-, Adipozyten- und Monozytenkulturen mit und ohne Zugabe von IL-4 nach 7 Tagen Kultivierung auf Seide, Silikon, Halofuginon und Zellkulturplatte.

4.3 Immunhistochemische Färbung mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern

Durch Titration der Antikörper auf Positivgewebe war zu Beginn die jeweils optimale Verdünnung bestimmt worden. Für Kollagen I und GLUT4 1:500 und für CD68 1:1000.

Problematisch bei der immunhistochemischen Untersuchung der verschiedenen Zelltypen auf den texturierten Oberflächen war die sich daraus ergebende 3D-Struktur der Plättchen. Diese Texturierung führte zu einem Einwachsen der Zellen in die Vertiefungen und damit zu einer Überlagerung in der 2D-Mikroskopie. Außerdem wurde die Qualität der Bilder durch fehlende Möglichkeit des blasenfreien Aufbringens eines Deckgläschens aufgrund der Materialdicke und die damit verbundene Erschwerung einer scharfen Fokussierung, sowie eine diffuse Fluoreszenz nach Kernfärbung mit DAPI beeinflusst.

4.3.1 Färbung von Fibroblasten mit Kollagen I

Der Nachweis von Kollagen I nach Kultivierung von Fibroblasten für 7 Tage auf den verschiedenen Oberflächen ergab – wie in Abbildung 21 dargestellt – folgende Tendenzen: optischer Nachweis von Fibroblasten in absteigender Anzahl auf Silikon > Seide > Halofuginon. Scheinbar bevorzugtes Wachstum entlang und in den Vertiefungen der texturierten Oberfläche. Auf Halofuginon waren optisch sehr wenige Zellkerne sichtbar, jedoch kein immunhistologischer Nachweis von Kollagen I möglich.

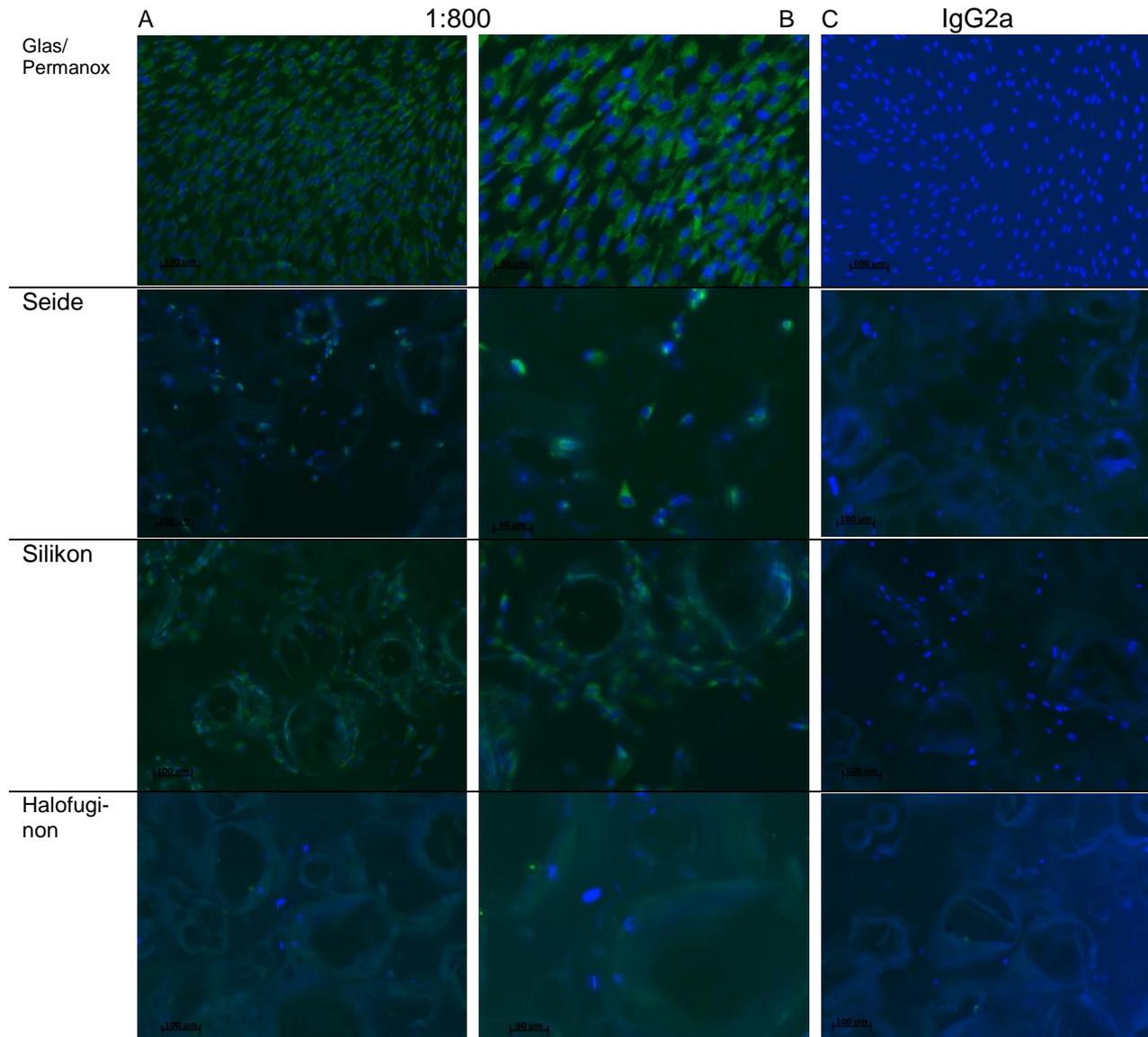


Abbildung 21 Nachweis von Kollagen I.

Immunhistochemischer Nachweis von Kol I in Fibroblastenkulturen gewachsen auf Glas/Permanox, Seide, Silikon und Halofuginon (A 10x, B 20x) und IgG2a (C 10x).

4.3.2 Färbung von Adipozyten und ihrer Vorläuferzellen mit GLUT4

Die Färbung der Oberflächen nach Besiedelung und Differenzierung von Adipozytenvorläuferzellen mit GLUT4 zeigte eine gesteigerte Einlagerung von Triglyceriden in Fettvakuolen auf allen Beschichtungen. Auf die Gegenfärbung der Kerne wurde bei einigen Präparaten zu Gunsten der Bildqualität verzichtet. Ein dichter Zellrasen zeigte sich sowohl auf Chamberslides aus Glas und Permanox, als auch auf unbehandelten Silikonplättchen. Auch hier fanden sich auf Halofuginon-beschichteten Oberflächen wenige Zellen.

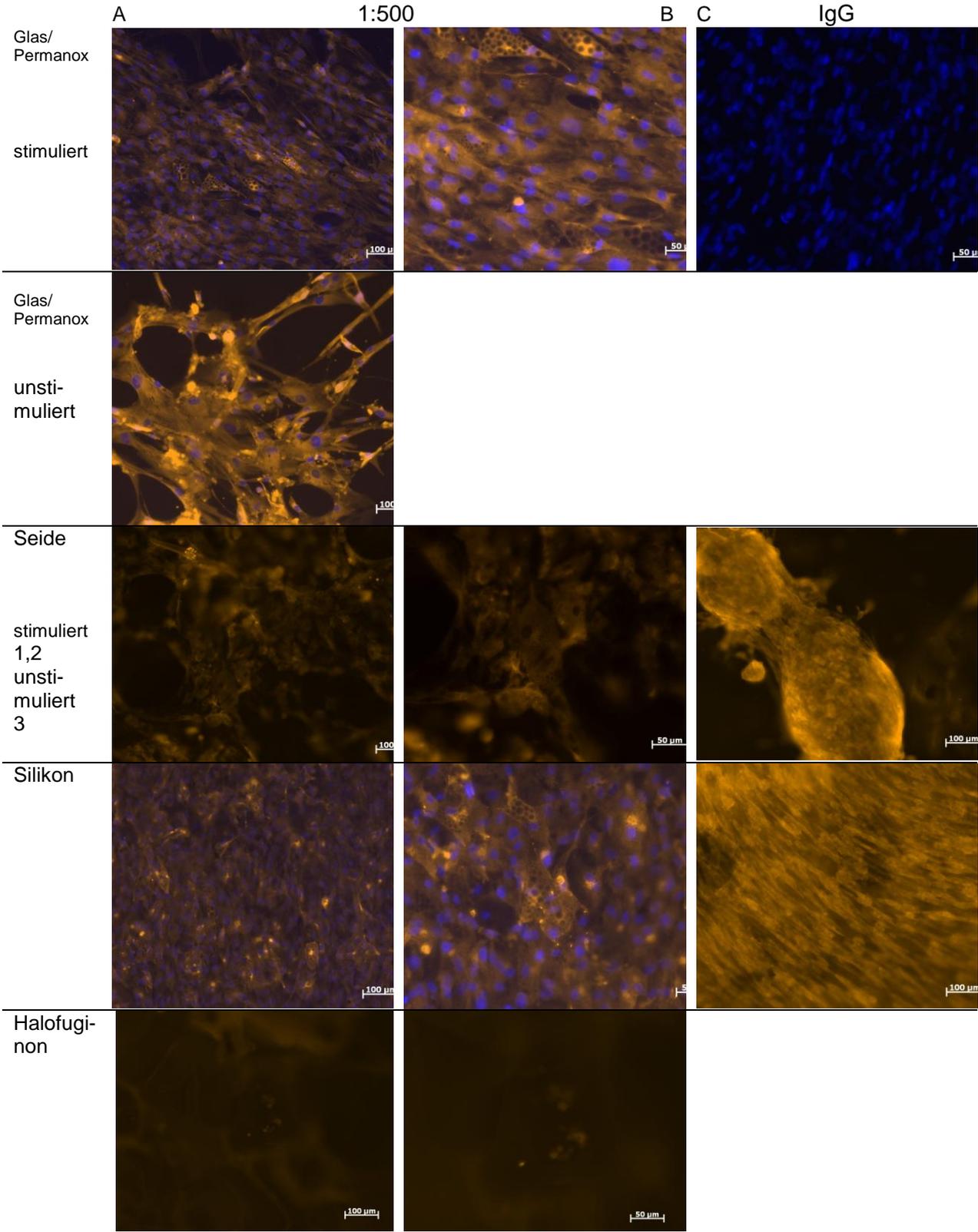


Abbildung 22 Nachweis von GLUT4.

Immunhistochemischer Nachweis von GLUT4 in Adipozytenkulturen gewachsen auf Glas/Permanox, Seide, Silikon und Halofuginon (A 10x, B 20x) und IgG (C 10x).

4.3.3 Färbung von Monozyten/Makrophagen mit CD68

Die Antikörperfärbung von Makrophagen mit CD68 zeigte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop auf den unstimulierten Proben eine geringere Zellzahl als in Zellkulturen, die zuvor mit IL-4 behandelt worden waren. Dabei gab es in der optischen Auswertung kaum einen Unterschied zwischen Silikon- und Seidenoberflächen. Unter den unstimulierten Proben zeigen Silikonoberflächen die vergleichsweise höchste Zellzahl. Auch Makrophagen waren am wenigsten auf Halofuginon-Plättchen zu finden.

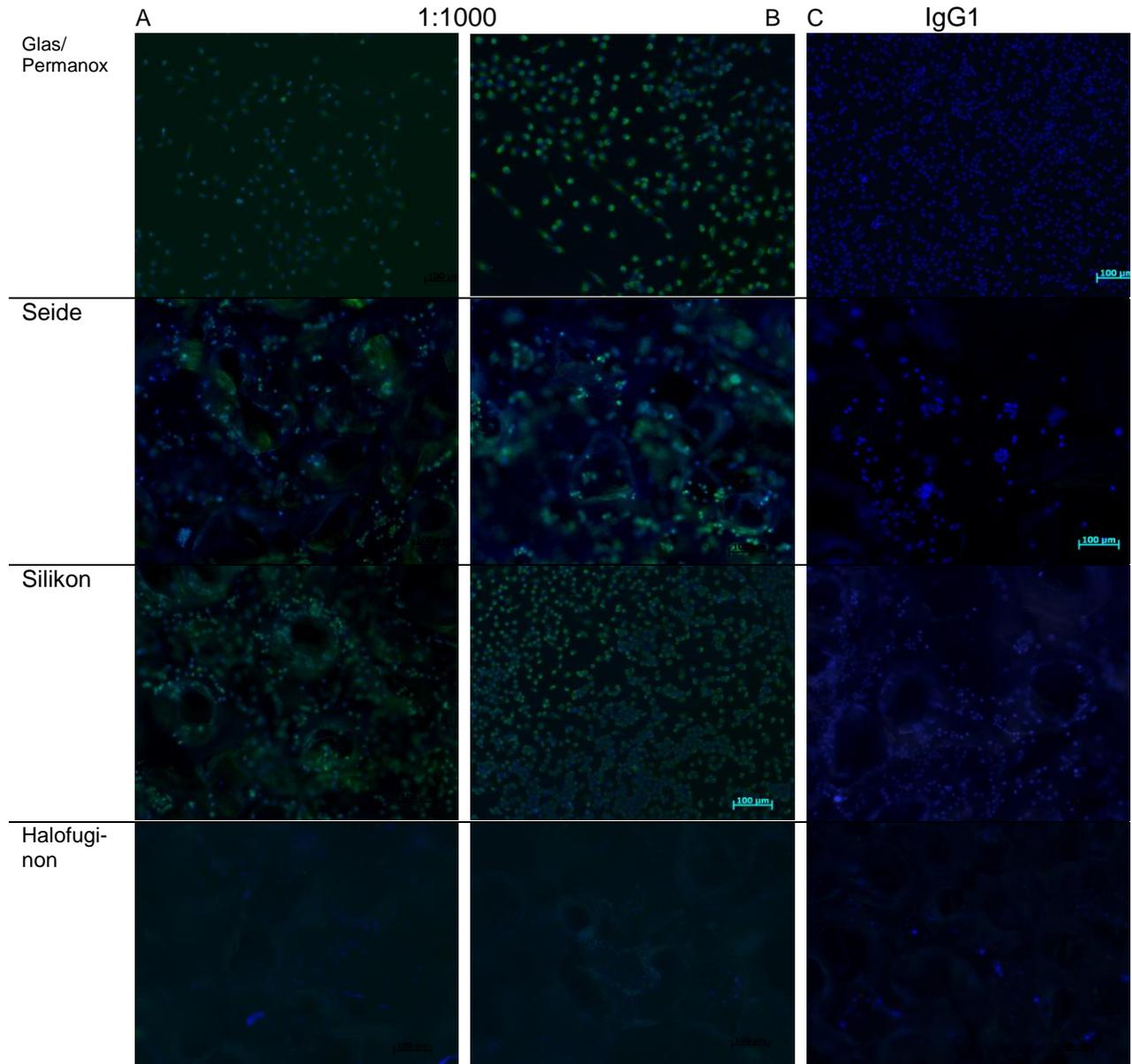


Abbildung 23 Nachweis von CD68.

Immunhistochemischer Nachweis von CD68 in Monozyten-/Makrophagenkulturen differenziert auf Glas/Permanox, Seide, Silikon und Halofuginon (A ohne Zugabe von IL-4, 10x; B mit Zugabe von IL-4, 10x) und IgG1 (C 10x).

4.4 Messung der RNA-Konzentration und -qualität

Bei der Extraktion der RNA aus den verschiedenen Zelltypen nach Kultivierung auf den zu testenden Oberflächen wurde folgende Ausbeute und Qualität erzielt:

Abbildung 24 zeigt exemplarisch das Gel je eines Aliquots der aufgearbeiteten RNA-Proben für Monozyten und Makrophagen nach Messung mit Hilfe des Experion® RNA Analyse Kit.

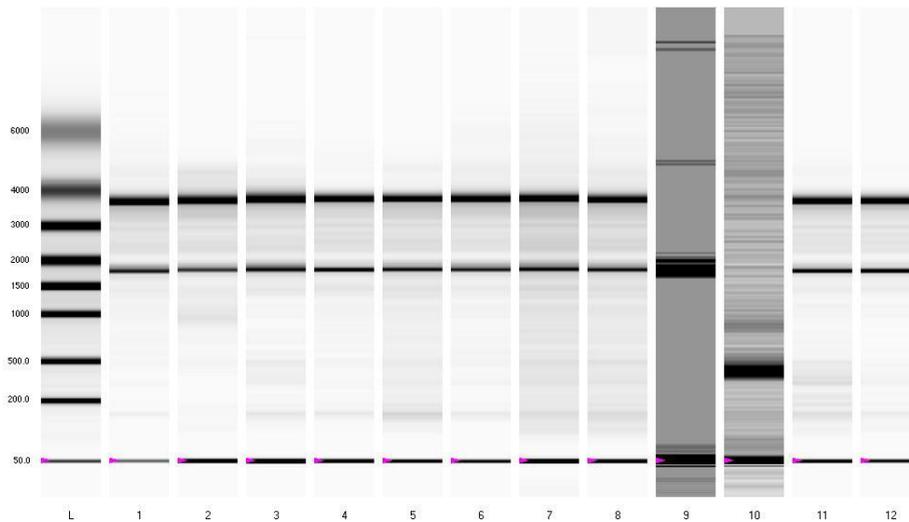


Abbildung 24 RNA-Qualität und -Quantität.

Elektrophorese der aus Zellkulturen gewonnenen RNA gemessen mit Experion® RNA Analyse Kit. Dargestellt für Monozyten/Makrophagen: L= RNA-Marker (Ladder); 1-4 = Seide +/- IL-4; 5-8 = Silikon +/- IL-4; 9,10 = HF +/- IL-4; 11,12 = Kultur +/- IL-4. Als dunkle Banden erscheinen für eukaryotische Zellen die rRNA-Untereinheiten des 80S-Ribosoms: 28S (ca. 4700nt) und 18S (ca.1800nt).

Die zugehörigen RNA-Konzentrationen sind in Abbildung 25 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass alle Proben, die aus Kulturen auf Halofuginon-beschichteten Plättchen gewonnen wurden, weder in Konzentration noch Qualität (Abb. 25 Spalte 9,10) für eine weitere Expressionsanalyse geeignet waren. Die restlichen Proben wurden zur Herstellung von komplementärer DNA verwendet.

Well ID	Probe	RNA-Konz. [µg/ml]	RNA gesamt [µl]	Ratio [28S:18S]	RQI	Klassifikation
1	Seide + IL-4	69,64	835,68	1,88	9,4	■
2	Seide + IL-4	26,14	313,68	1,89	8,6	■
3	Seide	14,62	175,44	1,55	9,6	■
4	Seide	22,14	265,68	1,53	9,3	■
5	Silikon + IL-4	45,3	543,6	1,38	8,6	■
6	Silikon + IL-4	37,3	447,6	1,57	9,3	■
7	Silikon	20,16	241,92	1,47	8,2	■
8	Silikon	27,94	335,28	1,54	8,3	■
9	HF + IL-4	0,2	2,4	0,18	N/A	■
10	HF	1,74	20,88	0,82	N/A	■
11	Kultur + IL-4	32,98	395,76	1,31	9,1	■
12	Kultur	34,58	414,96	1,53	9,6	■

Abbildung 25 Ermittelte RNA-Konzentrationen.

Auswertung der Gelelektrophorese gemessen mit Experion[®] RNA-Analyse Kit für Monozyten/Makrophagen. Berechnung der RNA-Konzentration und Klassifikation der Qualität. Grün: sehr gut. Gelb: intermediär. Rot: schlecht/nicht verwertbar.

4.5 Genexpressionsanalyse

Zunächst wurden die gemessenen Werte für die Grenzyklen der gewählten Housekeeping-Gene GAPDH und Aktin-β ausgewertet und vergleichend für die zu testenden Oberflächen aufgetragen (siehe Abbildung 26). Dabei erhielt man für Fibroblasten annähernd gleiche Expressionswerte für GAPDH auf Seide, Silikon und Kultur. Aktin-β wurde in der Kultur höher exprimiert als auf un-/beschichteten Matrices.

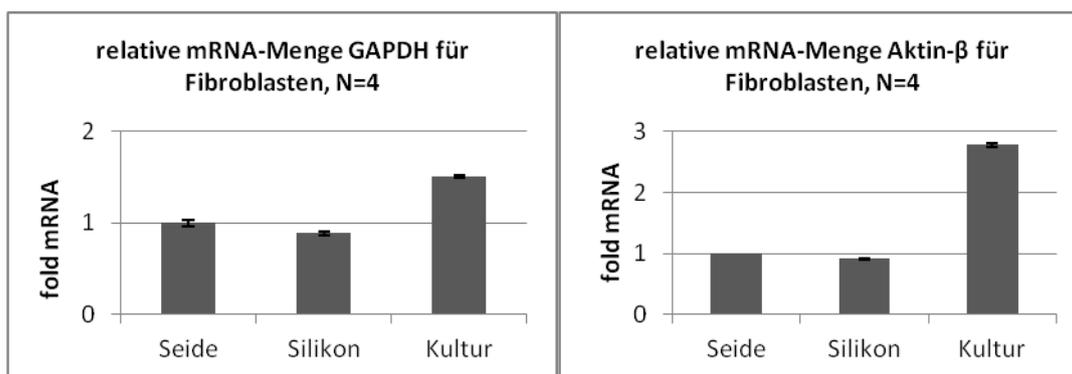


Abbildung 26 Relative mRNA-Menge der Gene GAPDH und Aktin-β für Fibroblasten.

Gezeigt ist der Mittelwert und die indizierten Standardabweichungen für die relative mRNA-Mengen der House-keeping Gene GAPDH und Aktin-β aus Fibroblasten-Proben.

Für Monozyten erhielt man für die Expression von GAPDH in etwa gleich hohe Werte für alle Proben. Aktin-β wurde dagegen auf seidebeschichteten Matrices deutlich niedriger exprimiert als in den übrigen Proben. Abbildung 27 zeigt die relative m-RNA-Menge der Housekeeping-

Gene für Monozytenproben auf Seide, Silikon und Kultur mit und ohne Stimulation durch IL-4 mit den jeweiligen Standardabweichungen.

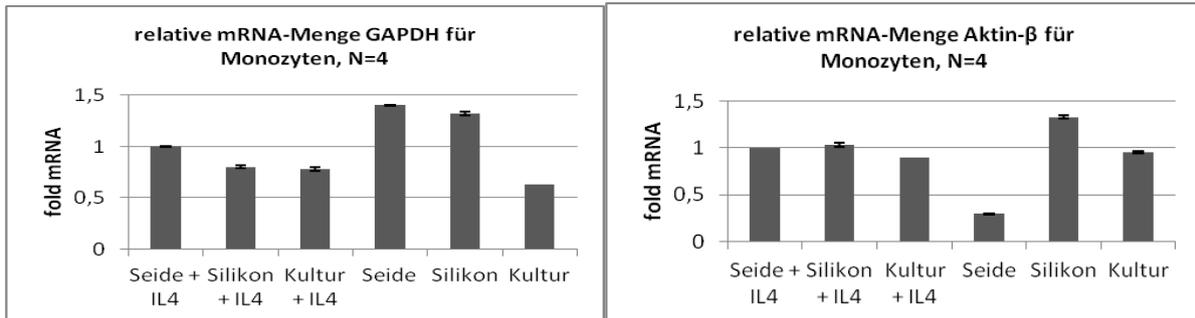


Abbildung 27 Relative mRNA-Menge der Gene GAPDH und Aktin-β für Monozyten.

Gezeigt ist der Mittelwert und die indizierten Standardabweichungen für die relative mRNA-Mengen der House-keeping Gene GAPDH und Aktin-β aus Monozyten/Makrophagen-Proben.

4.5.1 Kollagen I, III, TGF-β

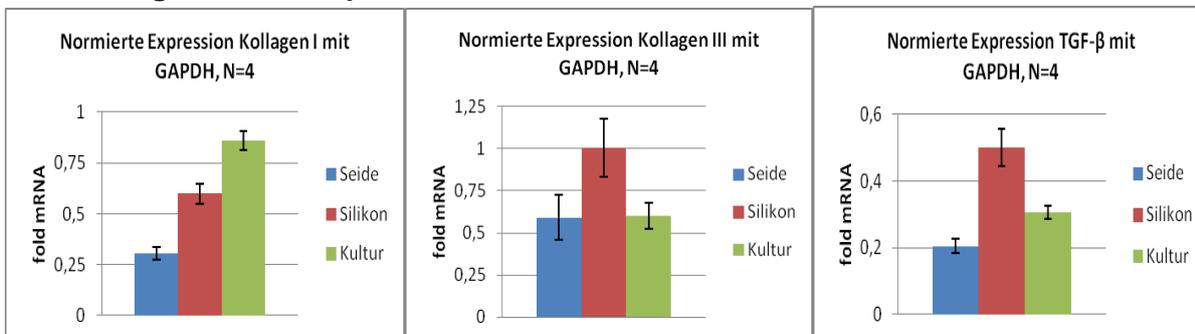


Abbildung 28 Genexpressionsanalysen

Expression der Gene Kollagen I, Kollagen III und TGF-β normiert auf GAPDH-Expression nach 7 Tagen Kultur von Fibroblasten auf Seide, Silikon und Zellkulturplatte.

Die Expression der Marker Kollagen I, III und TGF-β wurde in den auf unterschiedlichen Oberflächen kultivierten Fibroblasten analysiert. Die erhaltenen Werte wurden auf die Haushaltsgene GAPDH und Aktin-β normiert. Die niedrigste Expression konnte für alle genannten Marker nach Wachstum auf spinnseidebeschichteten Materialien beobachtet werden. Im Vergleich dazu waren m-RNA Gehalte für Kollagen I auf reinen Silikonoberflächen um das Doppelte und auf der Zellkulturplatte um fast das Dreifache erhöht. Für Kollagen III und TGF-β zeigte sich jeweils die höchste Expression auf Silikonmatrices ohne Beschichtung. Die Werte der Kulturen auf Seidenmatrices lagen dabei um ca. 50% niedriger. Nach Normierung der gemessenen Werte auf das Housekeeping-Gen Aktin-β zeigte sich die niedrigste Expression für alle drei Marker-Gene in Zellpopulationen, die auf einer Kulturplatte gewachsen waren. Im Vergleich der Gruppen auf unbeschichteten und beschichteten Matrices fand man mit den auf GAPDH normierten Ergebnissen übereinstimmende Werte. Abbildung 28 zeigt die Auswertung der mit der rtPCR gemessenen

relativen mRNA-Mengen für Kollagen I, III und TGF- β nach Normierung auf das Haushaltsgen GAPDH.

4.5.2 CD68, TNF- α , Lysozym, IL-1, IL-6, IL-10

Für Monozyten und Makrophagen mit und ohne Stimulation durch IL-4 wurde ebenfalls eine Normierung mit GAPDH und Aktin- β durchgeführt und die Expression der verschiedenen Marker in den Zellpopulationen auf den zu testenden Oberflächen gegenübergestellt. Dabei ergaben sich – wie Abbildung 29 zu entnehmen – im Vergleich zwischen stimulierten und unstimulierten Kulturen auf den verschiedenen Matrices folgende Unterschiede:

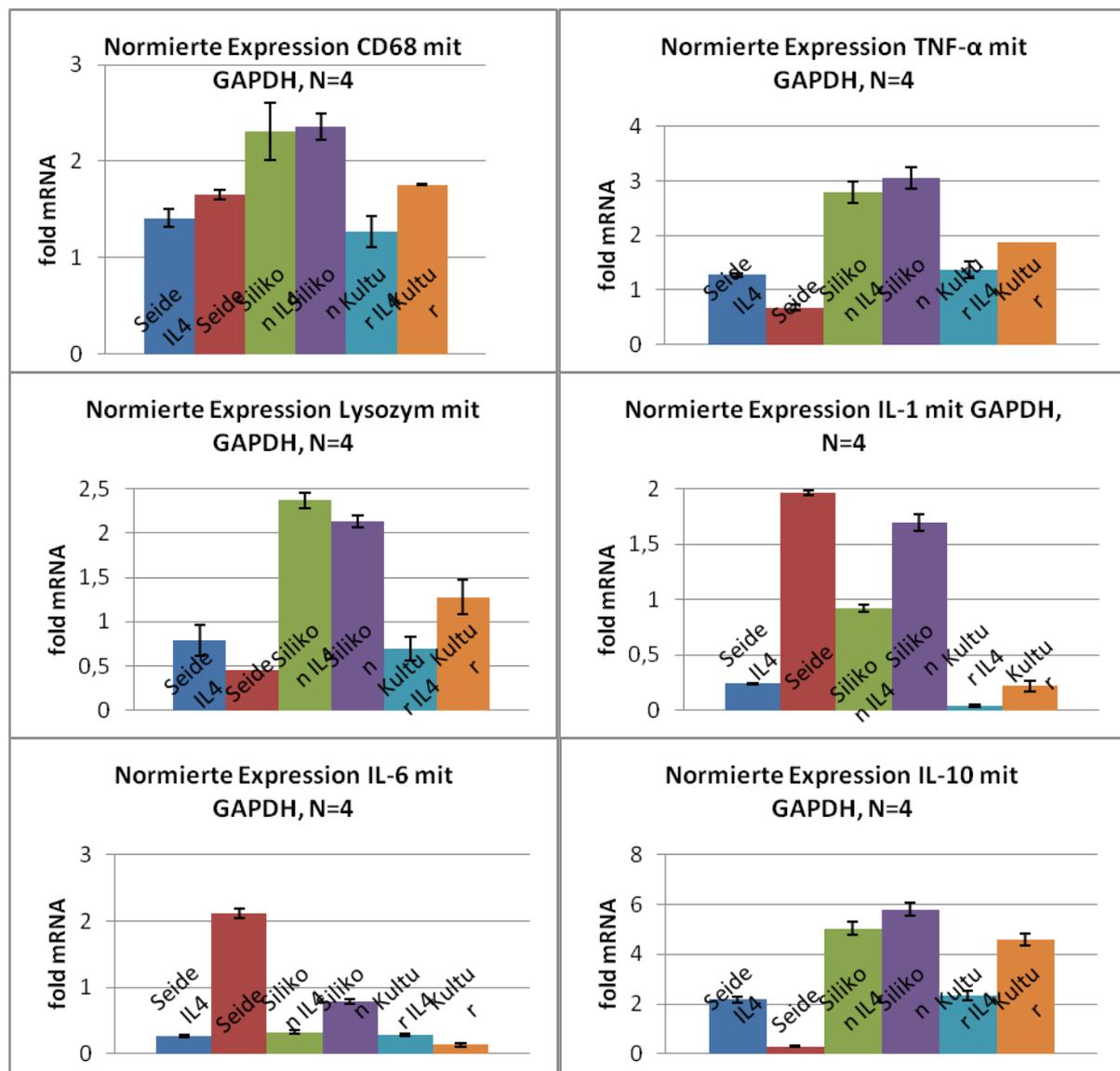


Abbildung 29 Genexpressionsanalysen

Expression der Gene CD68, TNF- α , Lysozym, IL-1, -6 und -10 normiert auf GAPDH-Expression nach 7 Tagen Kultur von Monozyten/Makrophagen auf Seide, Silikon und Zellkulturplatte.

Für CD68, TNF- α , Lysozym und Interleukin-10 zeigte sich die niedrigste Expression auf seidebeschichteten Materialien. So verringert sich die Rate von CD68 nach Stimulation mit IL-4 um über 50% im Vergleich zur Zellkultur auf Silikonoberflächen. Fehlte eine Behandlung mit IL-4, so betrug die Expression auf Spinnseide lediglich 15%. Im Gegensatz dazu waren die Interleukine-1 und -6 in unstimulierten Monozytenkulturen auf Seide am höchsten.

Betrachtet man Proben gleicher Oberflächen mit und ohne Zugabe von IL-4, so ist die Expression der Zytokine IL-1, -6 und -10 durch die Stimulation dieses Botenstoffes zu meist erniedrigt.

Nach Normalisierung mit Aktin- β erhielt man für die verschiedenen Marker in etwa gleiche Tendenzen. Unterschiede ergaben sich für die auf Seide gemessenen Werte ohne Zugabe von IL-4. Hier zeigte sich jeweils eine höhere Expression der gemessenen RNA.

5. Diskussion

5.1 Bestimmung von Proliferation und Vitalität

Eine typische Reaktion des Körpers nach Implantierung von Fremdmaterial ist die Bildung einer periprothetischen Hülle aus Extrazellulärmatrix durch das mit dem Implantat in Kontakt stehende Gewebe. Als wichtiger Indikator dieser Abwehrreaktion gilt die Anzahl der Zellen in der umgebenden Gewebekapsel. Ist das Einwachsen des Implantats einerseits in einem bestimmten Maße wichtig zur Stabilisierung (Wolfram Dolores et al. 2004), so weisen pathologische Kapselkontraktionen im Gegensatz dazu eine signifikant erhöhte Zellzahl auf. (Gayou 1979) An der Bildung von Extrazellulärmatrix sind hauptsächlich Fibroblasten und Makrophagen beteiligt. (Wolfram Dolores et al. 2004) Es gilt daher, z.B. durch eine geeignete Beschichtung der Implantatoberflächen die Anzahl angesiedelter Bindegewebszellen zu vermindern. Hierdurch sollte im Vergleich zu unbeschichteten Materialien die Biokompatibilität erhöht und das Auftreten einer Kapselbildung dadurch minimiert werden. Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese wurden in zwei verschiedenen Testreihen die Proliferation und Vitalität der angesiedelten Zellen auf den verschiedenen Implantatoberflächen miteinander verglichen. Da hierbei jede Behandlung einer Matrix zur Fixierung und weiteren optischen Darstellung zu Veränderungen des ursprünglichen Zellverbandes und Verlust von Zellen führt, wurde zunächst ein photometrischer ATP-Nachweis etabliert, der direkt auf den Plättchen durchgeführt werden konnte. Wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, ist der Gehalt an ATP in eukaryotischen Zellen unter vergleichbaren Kulturbedingungen relativ konstant, sodass dieser im Versuch als Maß für die Anzahl proliferierender Zellen auf den unterschiedlichen Oberflächen herangezogen werden kann. (Crouch et al. 1993) Die höchste Zellzahl wurde demnach für Fibroblasten, welche auf Standard-Kulturplatten kultiviert wurden bestimmt. Dies wird auch erwartet, da diese für das Wachstum adhärenter Zellen eine ideale Oberfläche bieten. Die zweithöchste Zellzahl wurde auf Silikon, gefolgt von Seide und am niedrigsten auf Halofuginon gemessen. Das Angleichen der Werte für die verschiedenen Oberflächen nach 8 Tagen Kultur kann durch ein vermindertes Wachstum aufgrund von Kontaktinhibition nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz erklärt werden. Ein sehr ähnliches Verhalten zeigte sich für die untersuchten Adipozyten, die einen Hauptbestandteil der weiblichen Brust darstellen und ebenfalls für die Bildung von Entzündungsfaktoren und die Aktivierung von Makrophagen (Itoh et al. 2011) verantwortlich sein können. Im Vergleich dazu zeigten alternativ aktivierte Makrophagen auf Silikon und Spinnseide in etwa gleiches Proliferationsverhalten. Während die Werte für die Zellzahl ohne Stimulus durch IL-4 auf

Seide etwas niedriger waren als auf unbeschichteten Matrices. Halofuginon scheint auch hier einen deutlich hemmenden Einfluss auf die Teilungsaktivität der Zellen zu nehmen. Abhängig von den vorherrschenden Kulturbedingungen kann eine Zelle ihre Stoffwechselaktivität geringfügig hoch oder herunter regulieren. Dies kann zu einer Diskrepanz zwischen der gemessenen Menge an ATP und der tatsächlichen Zellzahl führen. Um diesem Unterschied zwischen Vitalität in Form des gemessenen ATP-Gehalts und dem Proliferationsverhalten der Zellen gerecht zu werden, wurde desweiteren der DNA-Gehalt der Proben ermittelt, der bei Primärzellen als konstantes Maß gilt. Die Ergebnisse dieser Messungen bestätigten die photometrisch bestimmten Werte für den Gesamt-ATP-Gehalt der Zellpopulationen auf den verschiedenen Oberflächen. Sowohl durch eine Beschichtung mit Spinnseide, als auch mit Halofuginon, wird das Wachstum der Zellen im Vergleich gehemmt und man erhält durch die Beschichtung der Silikonmatrices somit eine niedrigere Zellzahl. Weniger Zellen bilden in der Folge auch weniger Extrazellulärmatrix, was entscheidend für die Ausbildung einer soliden periprothetischen Kapsel ist. Folglich wird durch die veränderte Oberfläche die Biokompatibilität der Implantate gesteigert.

5.2 Immunhistochemische Färbung

In histologischen Untersuchungen von explantiertem periprothetischen Kapselgewebe konnten verschiedene zelltypspezifische Antigene nachgewiesen werden. Neben einer erhöhten Synthese von Kollagen I, als Hauptbestandteil der Extrazellulärsubstanz, zeigte sich eine gesteigerte Expression des makrophagen-spezifischen Oberflächenantigens CD68. Ebenso fand man eine vermehrte Phagozytoserate von Matrix-Partikeln durch Makrophagen, die ebenfalls positiv mit der Dicke der gebildeten Kapsel korreliert. (Kamel et al. 2001) Deshalb wurden diese Parameter für die immunhistochemische Färbung ausgewählt. Daneben sollten die Adipozyten durch den an ihrer Oberfläche exprimierten Glukosetransporter GLUT4 dargestellt werden.

Dafür sollten die Plättchen zunächst in Paraffin oder Plastik eingebettet, auf einem Mikrotom geschnitten und anschließend durch spezifische Antikörpern immunhistochemisch nachgewiesen werden. Auch eine eventuelle Oberflächendegradation und eine Phagozytose von Matrix-Partikeln durch aktivierte Makrophagen sollte so bestimmt werden. Allerdings zerfielen die eingebetteten Plättchen beim Anfertigen der histologischen Schnitte in feine runde Silikonteilchen und führten nicht zu einem verwertbaren Ergebnis. Auch die Herstellung von Gefrierschnitten war mit dem zu testenden Material nicht möglich. Aus diesem Grund wurden immunhistochemische Färbungen mittels fluoreszierender Antikörpern durchgeführt. Für eine absolute Quantifizierung der Zellzahl durch Auszählen mehrerer

Areale war diese Analyse aufgrund der dreidimensionalen Struktur der verwendeten Matrices aber nicht geeignet, da Zellen auch in die Tiefen der Plättchen einwuchsen und sich so die Fluoreszenzen der Einzelzellen so gegenseitig überlagerten. Es zeigte sich, dass in Zellenpopulationen, die auf spinnseide-, oder halofuginonbeschichteten Oberflächen kultiviert wurden, weniger Kollagen I, CD68 und GLUT4 immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte. Insgesamt scheint eine Modifizierung des reinen Silikonmaterials durch diese beiden Beschichtungen zu einer verminderten Fremdkörperreaktion beizutragen, da zum einen weniger Extrazellulärsubstanz in Form von Kollagen I gebildet wird und zum anderen weniger Zellen, v.a. antigenpräsentierende Makrophagen, nachgewiesen werden konnten, die miteinander interagieren und zum Fortschreiten der Immunantwort beitragen.

Nachweise, zur Darstellung subzellulärer Strukturen, die eine höhere Auflösung erfordern, lassen sich mit dieser Methode nicht darstellen. Es ist geplant diese Untersuchung mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop nachzuholen.

5.3 Molekularbiologischer Nachweis spezifischer Marker

Eine weitere Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung von Genprodukten ist die indirekte Bestimmung der spezifischen mRNA-Menge in einer Probe mittels qRT-PCR. Ein Vorteil dabei ist die parallele Erfassung mehrerer Marker, die für bestimmte Aktivierungs- und Differenzierungszustände der Zellen einer Population typisch sind.

5.3.1 Haushaltsgene GAPDH und Aktin- β

Möchte man die Expression spezifischer Marker-Gene in unterschiedlichen Proben miteinander vergleichen, ist eine akkurate Quantifizierung des Startmaterials nötig, um zu gewährleisten, dass in allen Ansätzen die gleiche Menge an cDNA vorhanden ist. Da dies in einem Versuch, z.B. durch Ungenauigkeiten in der Isolation von mRNA oder bei der reversen Transkription, nicht gewährleistet ist, werden näherungsweise nicht regulierte Gene, die für bestimmte zelluläre Prozesse verantwortlich sind zur Normierung herangezogen. Als konstant exprimierte Referenzen gelten GAPDH, ein Enzym der Glykolyse und Aktin- β , als Protein des Zytoskeletts. Die konstante Expression konnte insbesondere für GAPDH in vielen Studien zur Untersuchung der Kapselkontraktur, ebenso wie in oben dargestellter Auswertung, gezeigt werden. (Barber et al. 2005; Tan et al. 2010) Allerdings können auch Haushaltsgene durch unterschiedliche Testbedingungen, wie z.B. die Verwendung verschiedener Ausgangsgewebe oder eine Behandlung durch Medikamente oder Chemikalien beeinflusst werden. (Romanowski et al. 2007)

So zeigen die durchgeführten Messungen eine Abweichung der Expression von Aktin- β , das als Protein des Zytoskeletts an Zellmotilität, -struktur und -integrität beteiligt ist. Die Ergebnisse könnten durch unterschiedlichen mechanischen Stress der Zellen auf den verschiedenen Oberflächen, wie z.B. durch gesteigerte Migration, Kontraktion oder vermehrtes Einwachsen in die 3D-Matrix erklärt werden. (Hanukoglu et al. 1983) Auch der Einfluss von TGF- β bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten kann zu einer veränderten Expression dieses Gens führen.

Aus diesem Grunde wurden alle Proben vergleichend auf die beiden Haushaltsgene normalisiert.

5.3.2 Wundheilung und Gewebeumbau in der Genexpression

Wird ein Implantat zur Brustrekonstruktion eingebracht, so beginnt nach Abschluss der Operation der Wundheilungsprozess. Diesen kann man in drei Phasen einteilen: Entzündung, Bildung von Granulationsgewebe und Remodelling mit Umbau der Extrazellulärmatrix. (Broughton et al. 2006) Das Entzündungsstadium wird durch Sekretion von Chemokinen z.B. durch Blutplättchen des Thrombus und neutrophile Granulozyten dominiert. Daraus entsteht das Granulationsgewebe vor allem durch Rekrutierung von Makrophagen und Fibroblasten, die sich wiederum gegenseitig durch Mediatoren aktivieren und die Synthese von EZM beeinflussen. Die anschließende Remodelling-Phase ist das längste Stadium der Wundheilung und ist gekennzeichnet durch Verlangsamung der Zellproliferation, Verminderung der Proteinsynthese und Ersatz von Kollagen III durch Kollagen I. Dabei sollte ein Gleichgewicht zwischen EZM-Produktion, Abbau und Umbau bestehen. Ist dieser Prozess beispielsweise durch eine gesteigerte Fremdkörperreaktion oder eine begleitende Wundinfektion gestört, kann es in der Folge zu Nekrose, Granulombildung oder Fibrosierung kommen. Um die überschießende Bildung von EZM und die damit verbundene Ausbildung einer Kapselkontraktur zu verhindern, sollte eine modifizierte Implantatoberfläche, neben einer geringen Synthese von Kollagen I und III, auch die Kommunikation der interagierenden Zellen hemmen. Aus diesem Grund wurden Makrophagen und Fibroblasten und einige ihrer relevanten Marker für die Genexpressionsuntersuchungen ausgewählt. Abbildung 30 zeigt die zelluläre Interaktion bei der Wundheilung.

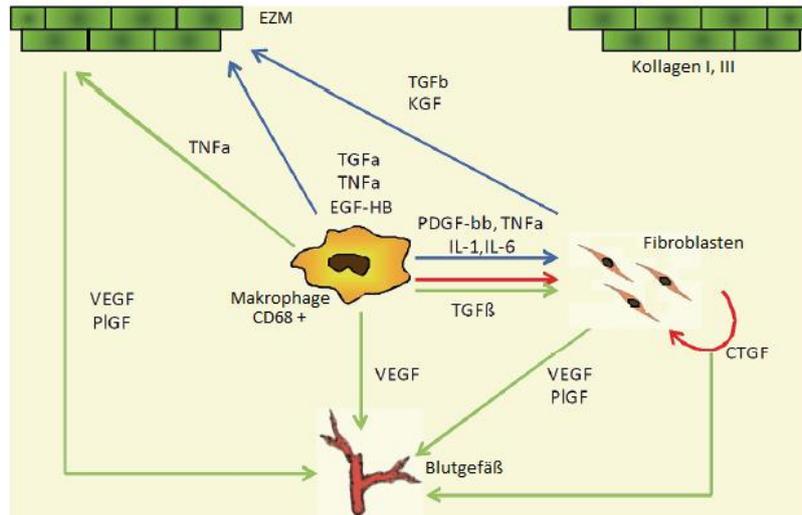


Abbildung 30 Wundheilung adaptiert nach (Rodero und Khosrotehrani 2010).

Dargestellt ist die Interaktion zwischen CD-68-positiven Makrophagen und Fibroblasten und die Auswirkung auf die Extrazellulärmatrix. Makrophagen stimulieren Fibroblasten mit Hilfe verschiedener Mediatoren wie IL-1, IL-6, TNF- α u.a. Die Bindegewebszellen synthetisieren ihrerseits verschiedene Kollagene und auch Mediatoren, z.B. TGF- β .

5.3.3 Fibroblasten und ihre Markergene

Fibroblasten infiltrieren die Wunde vor allem während in der Granulationsphase und sind in verschiedene Prozesse der Wundheilung involviert. So beeinflussen sie, stimuliert durch TNF- α , IL-1 und -6, Zytokine wie beispielsweise TGF- β , die Proliferation und Migration und differenzieren schließlich zu Myofibroblasten, die durch Erhöhte Bildung von Kollagen, neben dem Wundverschluss, maßgeblich an der Entstehung einer Kapselfibrose beteiligt sind. (Rodero und Khosrotehrani 2010; Mahdavian Delavary et al. 2011) So wirkt eine Verminderung des Fibroblastenwachstums, ebenso wie ein reduzierter Stoffwechsel, wie für Seidenbeschichtung und Halofuginon in beiden Proliferationstests gezeigt, einer Fibrosierung entgegen. Als typische zelluläre Marker für Fibroblasten, die im Folgenden näher beschrieben werden, gelten Kollagen I, III und TGF- β ,

Kollagen I und III

Im Rahmen der Wundheilung synthetisieren Fibroblasten, die am 3.-5. Tag die Wunde infiltrieren – aktiviert durch die verschiedenen Chemokine der Makrophagen – im ersten Schritt eine provisorische Matrix aus Kollagen III. An Tag 7-14 erfolgt, u.a. getriggert durch einen TGF- β -1-Peak ein Umbau der EZM durch Matrixmetalloproteasen und eine verstärkte Bildung von Kollagen I. War die Matrix zunächst noch dünn und erlaubte eine leichte Durchwanderung für Makrophagen und andere Zellen, steigt dadurch die Dicke und die Compliance wird vermindert. (Broughton et al. 2006) Das Verhältnis von Kollagen III zu Kollagen I wird somit im Verlauf des Wundheilungsprozesses kleiner. So zeigen Studien,

dass auch die Veränderung des Verhältnisses der verschiedenen Kollagenfasern für die Verhärtung und Kontraktur der periprothetischen Kapsel verantwortlich ist. (Tan et al. 2010) Da die Genexpression bereits nach 7 Tagen Kultivierung gemessen wurde, besteht die EZM noch überwiegend aus Kollagen Typ III. Im Vergleich zwischen seidebeschichteten Plättchen und Silikonmaterial, ist die Expression beider Fasertypen auf den unbeschichteten Materialien um ca. 50% erhöht.

TGF- β

TGF- β ist eines der wichtigsten Zytokine zur Steuerung von Makrophagen- und Fibroblastenfunktion, Differenzierung der Myofibroblasten, Chemotaxis und Zusammensetzung der EZM und wirkt somit als direkter Promotor für Fibrose. (Martin und Leibovich 2005) Es vermindert außerdem den Abbau der Wundmatrix durch Kollagenasen und inhibiert Matrixmetalloproteasen über eine Aktivierung der Inhibitoren, sog. TIMPs. (Rodero und Khosrotehrani 2010) Mit einem Peak zwischen Tag 7 und 14 scheint TGF- β eine Schlüsselrolle in der Regulation der Entzündungsreaktion und der damit verbundenen Fibrosierung einzunehmen. So konnten in mehreren Studien wie beispielsweise bei Kuhn et al. (Kuhn et al. 2000) und Kamel et al. (Kamel et al. 2001) hohe Spiegel im Kapselgewebe gefunden werden. Auch begleitende Infektionen und mechanische Einwirkungen führen zu einer Erhöhung der TGF- β -Sekretion. Vor allem hohe Spiegel des hier getesteten TGF- β -1-Isotyps stehen mit hypertropher Narbenbildung in Verbindung. (Mahdavian Delavary et al. 2011)

Da der Wachstumsfaktor nicht nur von Fibroblasten synthetisiert und diese autokrin stimuliert, sondern auch Produkt und Stimulator von Makrophagen ist, wäre die Untersuchung einer Co-Kultur auf verschiedene Marker für weiterführende Testungen interessant.

Die durchgeführten Versuche zeigten für Fibroblasten auf Spinnseide eine Verminderung der Syntheseleistung von Kollagen I, III und TGF- β . Berücksichtigt man außerdem die Hemmung der Zellproliferation durch die Oberflächenbeschichtung, spricht dies für eine geringere Induktion der Fremdkörperreaktion und somit einer Steigerung der Biokompatibilität des beschichteten Materials. Auf eine langfristige Beurteilung der Umwandlungsprozesse sind Modellversuche in Zellkulturen nicht ausgelegt und müssen durch in-vivo Untersuchungen erweitert werden.

5.3.4 Makrophagen und spezifisch exprimierte Gene

Die Infiltration der Implantattasche durch Makrophagen entlang eines chemotaktischen Gradienten, findet nach ca. 48h statt. (Broughton et al. 2006). Abhängig vom jeweiligen physiologischen Milieu und den stimulierenden Zytokinen, weisen die Zellen eine breite

Palette an unterschiedlichen Phänotypen auf. Man unterscheidet klassisch aktivierte M1- und alternativ aktivierte M2-Makrophagen. Sie sind für Phagozytose und Antigenpräsentation, Aktivierung von Fibroblasten und den Umbau von EZM verantwortlich und sezernieren eine große Bandbreite unterschiedlicher Mediatoren. M1-Makrophagen spielen vor allem in der ersten Phase der akuten Entzündung eine Rolle und haben vor allem die Aufgabe die Wunde zu reinigen. Durch Produktion von IL-1, -6, TNF- α u.a. treten sie in Interaktion zu Fibroblasten. Sie werden z.B. durch bakterielle Lipopolysaccharide oder INF- γ aktiviert. Eine Stimulierung mit IL-4 – wie im vorliegenden Versuchsaufbau – oder IL-13, führt zur Differenzierung von anti-inflammatorischen M2-Makrophagen, die in-vivo vor allem ab Tag 7 z.B. durch Sekretion von TGF- β , Bedeutung für den Gewebeumbau besitzen. (Rodero und Khosrotehrani 2010) Abbildung 5.y zeigt die Interaktion alternativ aktivierter Makrophagen mit Fibroblasten in der Umbauphase der Wundheilung. (Mahdavian Delavary et al. 2011) Wahrscheinlich spielt auch ein Ungleichgewicht zwischen den beiden Phänotypen eine wichtige Rolle für die Entstehung einer übermäßigen Synthese von EZM.

Außerdem sind M2-Makrophagen trotz der positiven Auswirkung auf die Entzündungsreaktion, für die Entstehung verschiedener Erkrankungen wie Allergien, Asthma oder Fibrose verantwortlich. (Duffield 2003) Da diese Reaktionen vor allem durch T-Helferzellen über eine Stimulation mit IL-4, -10 und 13 getriggert werden (sog. Th-2-Antwort), erfolgte eine Aktivierung der Monozyten für die In-vitro-Testungen ebenfalls über diesen Weg. (Mosser und Edwards 2008)

Zur erweiterten Darstellung der komplexen Immunreaktion könnte eine Mischkultur mit T-Helfer-Zellen hilfreich sein. Diese beeinflussen die Aktivität der Monozyten vor allem bei größeren Wunden und Infektion. (Tredget et al. 2006)

Im Weiteren soll auf die untersuchten Gene CD68, TNF- α , Lysozym, IL-1, -6 und -10 und ihre Rolle in der Wundheilung Näher eingegangen werden.

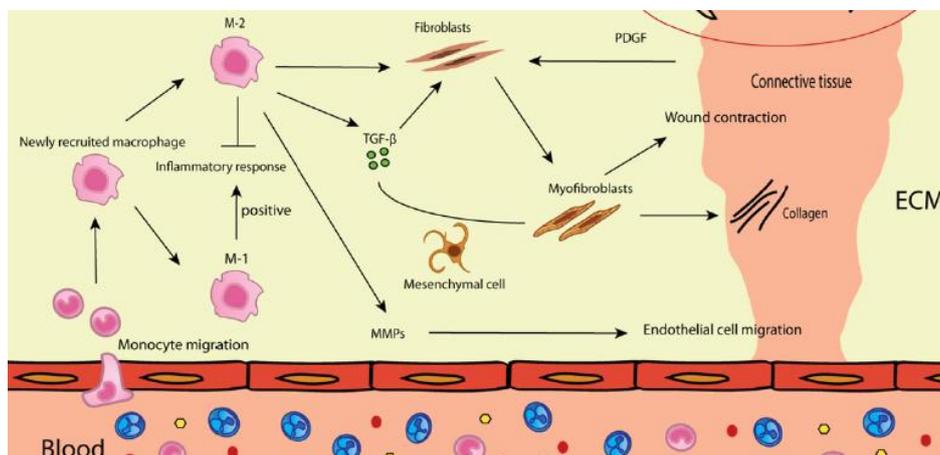


Abbildung 31 Remodelling-Phase der Wundheilung nach (Mahdavian Delavary et al. 2011).

In der Umbauphase werden Monozyten aus dem Blut rekrutiert und differenzieren zu M1- und M2-Makrophagen. Durch Aktivierung von Fibroblasten über TGF- β und deren Umwandlung zu Myofibroblasten entsteht ein stabiles, traktiles Kollagengeflecht.

CD68

Das Oberflächenantigen CD68, ein transmembranäres Glykoprotein, wird von Gewebsmakrophagen exprimiert und dient als allgemeiner Makrophagen-Marker zum Nachweis einer Infiltration des periprothetischen Gewebes. Darüber hinaus haben Kamel et al. gezeigt, dass eine statistische Korrelation zwischen CD68 positiven Zellen und dem Baker-Grad der Kapselkontraktur besteht. (Holness und Simmons 1993; Prantl et al. 2006; Kamel et al. 2001) Eine erhöhte Biokompatibilität bedingt folglich eine verminderte CD68-Expression.

Lysozym

Torsteinsdottir et al. haben gezeigt, dass erhöhte Lysozym- und Myeloperoxidasewerte ein Indikator für die phagozytierende Aktivität mononukleärer Zellen ist. (Torsteinsdottir 1999) In histologischen Schnitten, die aus periprothetischen Kapseln von Brustimplantaten angefertigt wurden, zeigte sich außerdem ein positiver Zusammenhang zwischen Silikonbeladung von Makrophagen und der Ausprägung der Kapselfibrose. (Prantl et al. 2006)

TNF- α

Zahlreiche Untersuchungen zeigen einen Zusammenhang zwischen Entzündungsgrad und Ausbildung einer periprothetischen Fibrose nach Implantation. Auch TNF- α nimmt dabei eine Schlüsselrolle in der Entzündungsreaktion und der Ausbildung einer Kapselkontraktur ein. So produzieren M1-Makrophagen in der Akutphase mehr TNF- α , als M2-Makrophagen nach Eintritt in das Remodelling-Stadium ab Tag 7. Diese Veränderung korrespondiert auch mit der Abnahme von Kollagen Typ III im Verlauf des Wundheilungsprozesses und trägt so zu den typischen Eigenschaften der Kapsel bei. Außerdem konnte in Studien gezeigt werden, dass eine starke Entzündungsreaktion verantwortlich für eine dickere Kapsel und damit einen höheren Baker-Grad ist. (Tan et al. 2010) Bei einer verminderten Immunantwort im Rahmen einer Fremdkörperreaktion erwartet man eine niedrigere Expression von TNF- α .

IL-1 und -6

Die Interleukine-1 und -6 sind pro-inflammatorische Zytokine der akuten Phase, die eine wichtige Rolle in der Proliferation, Proteinsynthese und Fibroblastenreifung spielen und somit ebenfalls zu Entstehung der Kapselfibrose beitragen. Durch Aktivierung der Freisetzung von Kollagenasen und Matrixmetalloproteasen, führt IL-1 außerdem zu einer langsameren Wundheilung. (Niessen et al. 2001) Aktuelle Studien von Tavazzani et al. (Tavazzani et al. 2005) zeigen, dass Makrophagen in Kultur durch Silikone zur erhöhten IL-1 Produktion stimuliert werden können.

IL-10

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das – wie in Abbildung 5.y dargestellt – von Wundheilungs-Makrophagen und in noch größerer Menge durch regulatorische Makrophagen synthetisiert wird. (Mosser und Edwards 2008) Die Sekretion wird vor allem durch IL-4 stimuliert, das in vivo beispielsweise von Th-2-Zellen gebildet wird.

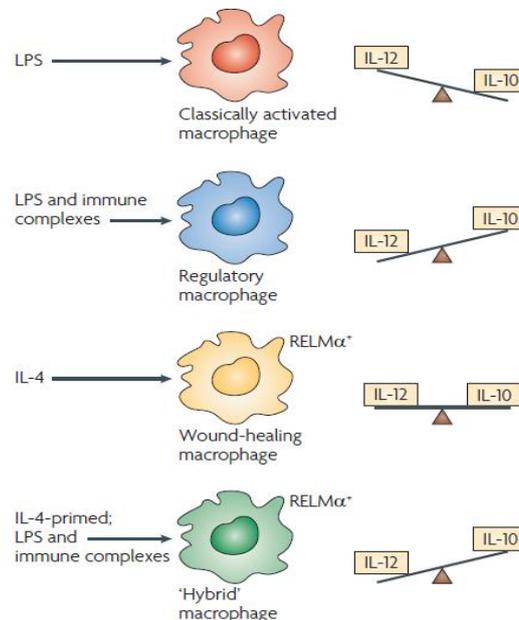


Abbildung 32 Aktivierungswege und Zytokinsynthese verschiedener Phänotypen. (Mosser und Edwards 2008)

Durch verschiedene Zytokine wie IL-4 oder andere Signale wie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), differenzieren Monozyten in unterschiedliche Typen von Makrophagen, die ihrerseits ein spezifisches Zytokinprofil sezernieren. Durch IL-4 aktivierte Wundheilungsmakrophagen synthetisieren sowohl IL-12, als auch IL-10.

Um die Verträglichkeit der Implantatoberfläche zu steigern, sollte die Beschichtung insgesamt einen hemmenden Einfluss auf die Immunantwort des Körpers ausüben, im Vergleich zur reinen Silikonmatrix also eine geringere Expressionsrate von CD68 und der pro-inflammatorischen Zytokine aufweisen. Sowohl für das makrophagentypische Oberflächenantigen, als auch für TNF- α und Lysozym zeigten sich niedrigere Werte auf seidebeschichteten Plättchen. Dies spricht folglich für eine niedrigere inflammatorische Aktivität der phagozytierenden Zellen. Vergleicht man nun IL-4 positive und negative Proben, so liegen die Expression für diese drei Marker in etwa gleich hoch. Setzt man das in Korrelation zu den durchgeführten Proliferations- und Vitalitätstests, zeigen also Proben nach Stimulation mit IL-4 auf Seiden- und Silikonmatrices zunächst gleiche Zellzahlen, aber auf beschichteten Materialien eine geringere Differenzierung zu Makrophagen (CD68) und eine verminderte inflammatorische Reaktion. Ohne Aktivierung durch IL-4 zeigen die Zellpopulationen auf seidebeschichteten Matrices niedrigere Zellzahlen und eine niedrigere Fremdkörperreaktion und somit eine verminderte Neigung zur Ausbildung einer

Kapselfibrose. Mehr Zellen in einer Kultur können demnach in eine bessere Interaktion treten, was zu einem höheren Aktivierungslevel führt.

Etwas anders stellen sich die Expressionsraten für IL-1 und -6 dar, die mit Abstand am höchsten auf Seidenmatrices lag. Dies steht allerdings nicht im Gegensatz zu den anderen Markern, sondern könnte entweder dafür sprechen, dass der Anstieg der Entzündungsreaktion auf der seidebeschichteten Oberfläche verspätet abläuft, d.h. die akute Phase ist zum Testzeitpunkt (Tag 6) in den anderen Proben bereits abgelaufen und somit nicht in voller Höhe erfasst. Auch denkbar wäre, dass der Anstieg der akuten Entzündung auf Seide zunächst stärker ausfällt, sich aber im Verlauf der Betrachtung z.B. über einen Zeitraum von mehreren Wochen oder Monaten auch schneller zurückbildet oder sich auf einem langfristig niedrigen Niveau einpendelt.

IL-10, das sich weder ganz der anti- noch der pro-inflammatorischen Seite zuordnen lässt, wird ebenfalls höher von Zellen exprimiert, die auf Silikonoberflächen kultiviert wurden. Dies ist ein Hinweis auf den Übergang in die proliferative Phase der Wundheilung, die vor allem durch M2-Makrophagen dominiert wird und in der die Produktion von extrazellulärer Matrix im Vordergrund steht. IL-10 sezernierende Wundheilungsmakrophagen interagieren vor allem über das Zytokin TGF- β mit Bindegewebszellen und tragen durch die Aktivierung von Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen (sog. TIMPs) zur gesteigerten Kollagensynthese bei. Trotz des hemmenden Einflusses auf die ablaufende Immunreaktion, ist dieser Phänotyp auch maßgeblich an pathologisch ablaufenden Wundheilungsprozessen wie z.B. der Ausbildung einer Fibrose beteiligt.

Insgesamt zeigen die durchgeführten Genexpressionsanalysen einen hemmenden Einfluss der Seidebeschichtung auf die Aktivierung von Makrophagen und Bindegewebszellen, die Interaktion über zelluläre Signalstoffe und schließlich die Bildung und Umwandlung der extrazellulären Matrix. So wurde neben einer Verminderung der relativen Zellzahl auch eine geringere Expression von Markern, die im Zusammenhang mit einer pathologischen Wundheilung stehen, nachgewiesen. Für die Gesamthöhe synthetisierter Mediatoren und ihren tatsächlichen Einfluss auf die EZM, ist neben der Differenzierung vor allem die Anzahl der infiltrierenden Zellen, in Form aktivierter CD68-positiver Makrophagen und Fibroblasten entscheidend. (Gayou 1979) Eine starke Immunantwort auf ein eingebrachtes Implantat ist schließlich die Grundlage zur Ausbildung einer periprothetischen Bindegewebskapsel.

Um die komplexe Interaktion der verschiedenen zellulären und humoralen Bestandteile des Immunsystems in-vitro nachzustellen, wären weitere Testungen in Mischkulturen, die zum Beispiel aus Fibroblasten, Monozyten und T-Helfer-Zellen bestehen und die Messung weiterführender Marker von Bedeutung.

Seit vielen Jahren vermutet man außerdem einen Zusammenhang zwischen Silikonimplantaten und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Malignomen.

(Puskas und Luebbers 2011) In ihrem alljährlichen Report wies die amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) 2011 beispielsweise auf ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines anaplastischen Lymphoms (ALCL) in Kapselkontrakturen hin, das in Studien gezeigt werden konnte. (de Jong et al. 2008) So könnte man den Fokus auf die veränderte Immunantwort bei Autoimmunität und die Proliferation in malignen Zellen, sowie die Expression bestimmter Tumormarker im Unterschied zwischen beschichteten und unbeschichteten Oberflächen legen.

5.4 Veränderung der Biokompatibilität von Implantaten

Jede Veränderung in einer Komponente eines medizinischen Hilfsmittels muss sich nach sorgfältiger technischer Herstellung einer aufwändigen klinischen Testung unterziehen. Dies gilt im speziellen für Brustimplantate in Bezug auf das Füllmaterial, die Außenhülle und eine zusätzliche Oberflächenbeschichtung. Zuletzt wurde das auch durch den aktuellen Vorfall im Dezember 2011 deutlich. Zur Herstellung von Implantaten wurde durch die französische Firma *Poly Implant Prothèse* minderwertiges Industriesilikon verwendet. Dies führte in der Folge zu einer gesteigerten Rupturgefahr und einem vermehrten Austreten von Füllmaterial trotz Intaktheit der Oberfläche, dem sog. *gel-bleed*. Betroffen davon sind weltweit ca. 400000-500000 Frauen, denen eine Explantation angeraten wurde. Ein erneuter operativer Eingriff ist, neben den Risiken und psychischen Belastungen für die Patientinnen, auch mit hohen Kosten verbunden. Dabei darf nicht vergessen werden, dass ein großer Anteil an Mamma-Augmentationen nicht aus ästhetischen Gründen, sondern zur Rekonstruktion nach Ablatio durchgeführt wird. So bleibt durch die bereits begonnen in-vivo-Experimente mit Ratten und einer anschließenden klinischen Testphase zu bestätigen, ob die Spinnseidenbeschichtung tatsächlich signifikant die Biokompatibilität von Brustimplantaten erhöhen kann. Besonders wichtig ist dabei eine Betrachtung der Langzeitergebnisse. In der Folge könnte eine Beschichtung auf für andere medizinisch eingesetzte Implantate und Katheter in Erwägung gezogen werden.

Ein anderer wichtiger Aspekt neben der verbesserten Verträglichkeit der Implantate, ist die wirtschaftliche Produktion und Verwendung der Prothesen, die einen kosteneffizienten Einsatz im Operationsalltag möglich macht.

6. Zusammenfassung

Hintergrund

Jede Implantation alloplastischer Materialien führt durch Aktivierung der körpereigenen Immunabwehr zu einer Fremdkörperreaktion. An der Synthese der Extrazellulärmatrix und der entstehenden Kollagenkapsel sind insbesondere Makrophagen und Fibroblasten beteiligt. Diese Reaktionen können die Material-Funktionsfähigkeit abschwächen, aufheben oder zu deren operativer Entfernung zwingen.

Fragestellung und Ziele

Spinnenseide ist ein Material mit hoher Biokompatibilität. Nachdem es gelungen ist, Spinnenseide rekombinant herzustellen, soll untersucht werden, wie sich die Verträglichkeit alloplastischer Materialien durch eine Beschichtung mit biotechnologisch hergestellter Spinnenseide beeinflussen lässt.

Eine weitere Möglichkeit ist der TGF- β -Synthese-Inhibitor Halofuginon, der ebenfalls hinsichtlich seiner Potenz, die Ausbildung einer Fibrosekapsel zu vermindern, untersucht werden soll.

Methodik

Anhand von in-vitro-Untersuchungen wurden die bei der Fremdkörperreaktion beteiligten Zelltypen auf ihr Proliferationsverhalten und die Expression unterschiedlicher Genprodukte hinsichtlich bestehender Unterschiede zwischen den jeweiligen Oberflächenbeschichtungen untersucht. Es wurden immunhistochemische Färbungen zum Nachweis spezifischer Oberflächenantigene, Bestimmungen von ATP- und DNA-Gehalt als Maß für die Zellzahl, sowie molekulargenetische Untersuchungen hinsichtlich der Expression relevanter Markergene (rtPCR) durchgeführt.

Ergebnisse

Eine Beschichtung mit rekombinanter Spinnenseide führt - im Vergleich zu reinen Silikonimplantaten - zu einer verzögerten und reduzierten Immunreaktion. Die EZM-Synthese und die damit verbundene fremdkörperassoziierte Fibrose werden vermindert und so die Biokompatibilität alloplastischer Materialien gesteigert.

7. Literaturverzeichnis

- Abdallah A.; Papadoupulos S.; Sakaloui Y.; Teubner S. (2003): Korrektur kosmetischer Defekte bei der brusterhaltenden Therapie des Mammakarzinoms - Beispiele aus dem eigenen Patientenkollektiv: Verlag Krause und Pachernegg GmbH; <http://www.kup.at>.
- Alderman, A. K.; Wilkins, E. G.; Lowery, J. C.; Kim, M.; Davis, J. A. (2000): Determinants of patient satisfaction in postmastectomy breast reconstruction. In: *Plast. Reconstr. Surg* 106 (4), S. 769–776.
- American Society for Aesthetic Plastic Surgery: Cosmetic Surgery National Data Bank Statistics, 2010. Online verfügbar unter <http://www.surgery.org/media/statistics>, zuletzt geprüft am 19.10.2011.
- AmSilk: Silk coating of Silicone Implants.
- Araco, Antonino; Caruso, Riccardo; Araco, Francesco; Overton, John; Gravante, Gianpiero (2009): Capsular contractures: a systematic review. In: *Plast. Reconstr. Surg* 124 (6), S. 1808–1819.
- Barber, Robert D.; Harmer, Dan W.; Coleman, Robert A.; Clark, Brian J. (2005): GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. In: *Physiol. Genomics* 21 (3), S. 389–395.
- Biele, Carsten; Horton, H. Robert (2008): Biochemie. 4. Aufl. München [u.a.]: Pearson Studium.
- Bio-Rad Laboratories (2006): Real-Time PCR Application Guide. Online verfügbar unter <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>.
- Bondurant, Stuart; Ernster, Virginia L.; Herdman, Roger (2000): Safety of silicone breast implants. Washington, D.C: Institute of Medicine.
- Broer, Karl-Heinz; Beyer, Dieter; Schmitz, Stephan (2001): Die weibliche Brust. Vorsorge, Schutz, Gesundheit und Schönheit. Köln: Neuer Honos-Verl.
- Broughton, George; Janis, Jeffrey E.; Attinger, Christopher E. (2006): The basic science of wound healing. In: *Plast. Reconstr. Surg.* 117 (7 Suppl), S. 12S-34S.
- Crouch, S. P.; Kozlowski, R.; Slater, K. J.; Fletcher, J. (1993): The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. In: *J. Immunol. Methods* 160 (1), S. 81–88.
- Cunningham, Bruce; McCue, Jonathan (2009): Safety and effectiveness of Mentor's MemoryGel implants at 6 years. In: *Aesthetic Plast Surg* 33 (3), S. 440–444.
- Dancey, Anne; Nassimzadeh, Abdul; Levick, Paul (2011): Capsular contracture - What are the risk factors? - A 14 year series of 1400 consecutive augmentations. In: *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*.
- Deutsche Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgie (Hg.) (2009): Wiederherstellung der Brust nach Brustkrebs. Online verfügbar unter <http://www.dgpraec.de/patienten/brustkrebs/brustwiederaufbau/implantat/>, zuletzt aktualisiert am 2009, zuletzt geprüft am 03.01.2012.
- Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (Hg.) (2011): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Online verfügbar unter http://www.krebsgesellschaft.de/pat_ka_brustkrebs_therapie_operation,114375.html, zuletzt aktualisiert am 11.11.2011, zuletzt geprüft am 16.11.2011.
- Duffield, Jeremy S. (2003): The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. In: *Clin. Sci.* 104 (1), S. 27–38.
- Gayou, R. M. (1979): A histological comparison of contracted and non-contracted capsules around silicone breast implants. In: *Plast. Reconstr. Surg* 63 (5), S. 700–707.

- Gylbert, L.; Asplund, O.; Jurell, G. (1990): Capsular contracture after breast reconstruction with silicone-gel and saline-filled implants: a 6-year follow-up. In: *Plast. Reconstr. Surg* 85 (3), S. 373–377.
- Hanukoglu, I.; Tanese, N.; Fuchs, E. (1983): Complementary DNA sequence of a human cytoplasmic actin. Interspecies divergence of 3' non-coding regions. In: *J. Mol. Biol.* 163 (4), S. 673–678.
- Hardy, John G.; Scheibel, Thomas R. (2009): Silk-inspired polymers and proteins. In: *Biochem. Soc. Trans* 37 (4), S. 677.
- Holness, C. L.; Simmons, D. L. (1993): Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. In: *Blood* 81 (6), S. 1607–1613.
- Itoh, Michiko; Suganami, Takayoshi; Hachiya, Rumi; Ogawa, Yoshihiro (2011): Adipose Tissue Remodeling as Homeostatic Inflammation. In: *International Journal of Inflammation* 2011, S. 1–8.
- Jong, Daphne de; Vasmel, Wies L. E.; Boer, Jan Paul de; Verhave, Gideon; Barbé, Ellis; Casparie, Mariel K.; van Leeuwen, Flora E. (2008): Anaplastic large-cell lymphoma in women with breast implants. In: *JAMA* 300 (17), S. 2030–2035.
- Kamel, M.; Protzner, K.; Fornasier, V.; Peters, W.; Smith, D.; Ibanez, D. (2001): The peri-implant breast capsule: an immunophenotypic study of capsules taken at explantation surgery. In: *J. Biomed. Mater. Res* 58 (1), S. 88–96.
- Koolman, Jan; Röhm, Klaus-Heinrich (2009): Taschenatlas Biochemie des Menschen. 4. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.
- Kuhn, A.; Singh, S.; Smith, P. D.; Ko, F.; Falcone, R.; Lyle, W. G. et al. (2000): Periprosthetic breast capsules contain the fibrogenic cytokines TGF-beta1 and TGF-beta2, suggesting possible new treatment approaches. In: *Ann Plast Surg* 44 (4), S. 387–391.
- Lundin, A.; Hasenson, M.; Persson, J.; Pousette, A. (1986): Estimation of biomass in growing cell lines by adenosine triphosphate assay. In: *Meth. Enzymol* 133, S. 27–42.
- Mahdavian Delavary, Babak; van der Veer, Willem M.; van Egmond, Marjolein; Niessen, Frank B.; Beelen, Robert H. J. (2011): Macrophages in skin injury and repair. In: *Immunobiology* 216 (7), S. 753–762.
- Deutsche Gesellschaft für Ästhetisch-Plastische Chirurgie (02.2012): DGÄPC ermittelt Zahlen zur Brustvergrößerung in Deutschland. Martin Spiering. Online verfügbar unter <http://www.dgaepc.de/news-presse/presseinfos-2012.php>, zuletzt geprüft am 09.2012.
- Martin, Paul; Leibovich, S. Joseph (2005): Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. In: *Trends Cell Biol.* 15 (11), S. 599–607.
- Medizinischer Dienst des Spitzenverbandes Bund Deutscher Krankenkassen e.V. (Hg.) (2003): Implantate Katalog - Brustimplantate. Online verfügbar unter <http://www.mds-ev.de/Implantatekatalog.htm>, zuletzt aktualisiert am 10.2003, zuletzt geprüft am 03.01.2011.
- Miller, Orlando J.; Therman, Eeva (2001): Human chromosomes. 4. Aufl. New York: Springer.
- Miltenyi Biotec GmbH (2011): MACS® Technology - Gold standard in cell separation. Online verfügbar unter http://www.miltenyibiotec.com/download/flyer_en/680/MACS_Technology_Flyer.pdf, zuletzt geprüft am 07/2012.
- Moreira, Marcio; Fagundes, Djalma José; Jesus Simões, Manuel de; Oliveira, Mônica Cristina Baiardi Mizoguti de; Dos Santos Previdelli, Isolde Terezinha; Moreira, Amanda Castilho (2009): Zafirlukast pocket delivery impairs the capsule healing around textured implants in rats. In: *Aesthetic Plast Surg* 33 (1), S. 90–97.
- Mosser, David M.; Edwards, Justin P. (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. In: *Nat Rev Immunol* 8 (12), S. 958–969.

- Niessen, F. B.; Andriessen, M. P.; Schalkwijk, J.; Visser, L.; Timens, W. (2001): Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. In: *J. Pathol.* 194 (2), S. 207–216.
- Pittet, Brigitte; Montandon, Denys; Pittet, Didier (2005): Infection in breast implants. In: *The Lancet Infectious Diseases* 5 (2), S. 94–106.
- Prantl, L.; Schreml, S.; Fichtner-Feigl, S.; Pöppl, N.; Roll, C.; Eisenmann-Klein, M.; Hofstädter, F. (2006): Histologische und immunhistochemische Untersuchungen bei Kapselkontraktur nach glatten Brustimplantaten. In: *Handchir Mikrochir Plast Chir* 38 (4), S. 224–232.
- Promega (2011): CellTiter-Glo® Luminescent - Cell Viability Assay. Madison. Online verfügbar unter <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%20glo%20luminescent%20cell%20viability%20assay%20protocol.pdf?la=en>, zuletzt geprüft am 07/2012.
- Puskas, Judit E.; Luebbers, Matthew T. (2011): Breast implants: the good, the bad and the ugly. Can nanotechnology improve implants? In: *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*.
- Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V (Hg.) (2010): Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends. Online verfügbar unter <http://www.gekid.de/>, zuletzt aktualisiert am 27.09.2011, zuletzt geprüft am 16.11.2011.
- Rodero, Mathieu P.; Khosrotehrani, Kiarash (2010): Skin wound healing modulation by macrophages. In: *Int J Clin Exp Pathol* 3 (7), S. 643–653.
- Romanowski, Tomasz; Markiewicz, Aleksandra; Bednarz, Natalia; Bielawski, Krzysztof Piotr (2007): Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metoda real-time PCR. In: *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61, S. 500–510.
- Siggelkow, W.; Klosterhalfen, B.; Klinge, U.; Rath, W.; Faridi, A. (2004): Analysis of local complications following explantation of silicone breast implants. In: *Breast* 13 (2), S. 122–128.
- Solinas, Graziella; Schiarea, Silvia; Liguori, Manuela; Fabbri, Marco; Pesce, Samantha; Zammataro, Luca et al. (2010): Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. In: *J. Immunol* 185 (1), S. 642–652.
- Spear, S. L.; Baker, J. L. (1995): Classification of capsular contracture after prosthetic breast reconstruction. In: *Plast. Reconstr. Surg* 96 (5), S. 1119-23; discussion 1124.
- Spear, Scott L.; Murphy, Diane K.; Slicton, Araceli; Walker, Patricia S. (2007): Inamed silicone breast implant core study results at 6 years. In: *Plast. Reconstr. Surg* 120 (7 Suppl 1), S. 8S-16S; discussion 17S-18S.
- Tan, K.T; Wijeratne, D.; Shih, B.; Baildam, A.D; Bayat, A. (2010): Tumour Necrosis Factor- α Expression Is Associated with Increased Severity of Periprosthetic Breast Capsular Contracture. In: *Eur Surg Res* 45 (3-4), S. 327–332.
- Tavazzani, F.; Xing, S.; Waddell, J. E.; Smith, D.; Boynton, E. L. (2005): In vitro interaction between silicone gel and human monocyte-macrophages. In: *J Biomed Mater Res A* 72 (2), S. 161–167.
- Torsteinsdottir, I. (1999): Serum lysozyme: a potential marker of monocyte/macrophage activity in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology* 38 (12), S. 1249–1254.
- Tredget, Edward E.; Yang, Liju; Delehanty, Megan; Shankowsky, Heather; Scott, Paul G. (2006): Polarized Th2 cytokine production in patients with hypertrophic scar following thermal injury. In: *J. Interferon Cytokine Res.* 26 (3), S. 179–189.
- Univ.-Prof. Dr. Irene K. Lichtscheidl: Lichtmikroskopie online - Theorie und Anwendung. indirekte Immunfluoreszenz. Unter Mitarbeit von Mag. Michael Volgger. Hg. v. Core Facility Cell Imaging und Ultrastrukturforschung - Universität Wien. Wien. Online verfügbar unter http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/fluorochrome/4c_indirekteIF.htm, zuletzt geprüft am 07/2012.

Voogd, A. C.; Nielsen, M.; Peterse, J. L.; Blichert-Toft, M.; Bartelink, H.; Overgaard, M. et al. (2001): Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast-conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials. In: *J. Clin. Oncol* 19 (6), S. 1688–1697.

Wolfram Dolores; Rainer, Christian; Niederegger, Harald; Piza, Hildegunde; Wick, Georg (2004): Cellular and molecular composition of fibrous capsules formed around silicone breast implants with special focus on local immune reactions. In: *J. Autoimmun* 23 (1), S. 81–91.

Wong, Chin-Ho; Samuel, Miny; Tan, Bien-Keem; Song, Colin (2006): Capsular Contracture in Subglandular Breast Augmentation with Textured versus Smooth Breast Implants: A Systematic Review. In: *Plastic and Reconstructive Surgery* 118 (5), S. 1224–1236.

Young, V. L.; Watson, M. E. (2001): Breast implant research: where we have been, where we are, where we need to go. In: *Clin Plast Surg* 28 (3), S. 451-83, vi.

Zeplin, Philip H.; Larena-Avellaneda, Axel; Schmidt, Karsten (2010): Surface modification of silicone breast implants by binding the antifibrotic drug halofuginone reduces capsular fibrosis. In: *Plast. Reconstr. Surg* 126 (1), S. 266–274.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Mamma-Rekonstruktion mit Silikonimplantat.....	3
Abbildung 2 Auswirkungen der Kapselfibrose.....	4
Abbildung 3 Modifizierung der Silikonoberfläche durch Spinnseide und Halofuginon.....	6
Abbildung 4 Zelluläre und molekulare Bestandteile der Kapsel.....	16
Abbildung 5 Indirekte Immunfluoreszenz.....	20
Abbildung 6 Luciferase-Reaktion	21
Abbildung 7 Isolierung humaner Fibroblasten.....	26
Abbildung 8 Isolierung humaner Adipozytenvorläuferzellen.....	27
Abbildung 9 Isolierung von Monozyten	28
Abbildung 10 Markierung und Auftrennung CD-14 positiver Zellen	29
Abbildung 11 Aufnahmen der texturierten Silikonmatrices	31
Abbildung 12 Fibroblasten auf Silikonmatrix.	32
Abbildung 13 Fibroblasten in Zellkultur	33
Abbildung 14 Kultur humaner Adipozytenvorläuferzellen	33
Abbildung 15 Durchflusszytometrie	34
Abbildung 16 Kultivierung von Monozyten.....	34
Abbildung 17 ATP-Gehalt.....	35
Abbildung 18 ATP-Gehalt.....	35
Abbildung 19 ATP-Gehalt.....	36
Abbildung 20 Gesamt-DNA-Gehalt.....	37
Abbildung 21 Nachweis von Kollagen I.....	38
Abbildung 22 Nachweis von GLUT4.....	40
Abbildung 23 Nachweis von CD68	41
Abbildung 24 RNA-Qualität und -Quantität.....	42
Abbildung 25 Ermittelte RNA-Konzentrationen.....	43
Abbildung 26 Relative mRNA-Menge der Gene GAPDH und Aktin- β für Fibroblasten.	43

Abbildung 27 Relative mRNA-Menge der Gene GAPDH und Aktin- β für Monozyten	44
Abbildung 28 Genexpressionsanalysen.....	44
Abbildung 29 Genexpressionsanalysen.....	45
Abbildung 30 Wundheilung	51
Abbildung 31 Remodelling-Phase der Wundheilung	53
Abbildung 32 Aktivierungswege und Zytokinsynthese verschiedener Phänotypen.....	55

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Baker-Klassifikation nach Mamma-Rekonstruktion (Spear und Baker 1995).....	5
Tabelle 2 Verbrauchsmaterial.....	8
Tabelle 3 Labormaterial und Geräte.....	9
Tabelle 4 Chemikalien	11
Tabelle 5 Medien für die Zellkultur.....	13
Tabelle 6 Lösungen für die Zellisolation.....	14
Tabelle 7 Lösungen und Chemikalien für die Histologie	14
Tabelle 8 Verwendete Antikörper.....	15
Tabelle 9 Genprodukt und Primersequenzen	15
Tabelle 10 Ablauf der cDNA-Synthese.....	23
Tabelle 11 Zusammensetzung des Mastermix	24
Tabelle 12 Die PCR-Zyklen.....	24
Tabelle 13 Medium zur Differenzierung der Vorläuferzellen.....	28
Tabelle 14 Weitere Schritte zur Gewinnung der CD-14 positiver Zellen	30

Danksagung

Frau Professor Dr. Heike Walles danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Dissertation am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin. Dieser Rahmen war ein idealer Ausgangspunkt für meine ersten Schritte in die humanmedizinisch orientierte Forschung.

Ein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Joachim Nickel für die stets hervorragende, medizinstudentengerechte Betreuung und die kritische Korrektur meiner Arbeit. Nicht zuletzt aufgrund meines straffen Zeitmanagements, gestaltete sich die Zusammenarbeit mit mir nicht immer einfach.

An das tolle Team des Lehrstuhls insbesondere Sarah Nietzer, Sylvia Murawicki, Antje Appelt, Jenny Reboredo, Sabine Wilhelm, Sabine Graiff, Christoph Rücker, Simon Kurdyn, Corinna Moll, Christa Amrehn, Caro Tripp, Holger Kirch, Heide Häfner und Kristina Wagner ein liebes Dankeschön dafür, dass ihr mich jeder Zeit mit eurer Fachexpertise, praktischer Anleitung und viel Geduld unterstützt habt!

Vielen Dank an meine Freundinnen und Studienkolleginnen Nadine Müller, Melanie Henle, Michelle Malik, Natalie Vogel, Jule Konrad, Stephanie Müller und Carmen Schütrumpf, die dieser arbeitsreichen Zeit die Leichtigkeit verliehen haben.

Schlussendlich möchte ich meinen Eltern Wolfgang und Ingrid und meinem Bruder Markus danken, dass sie mir in jeder Lebensphase – insbesondere auch während der Studienzeit – wertvolle Ratgeber waren. Vielen Dank für die uneingeschränkte Unterstützung und Motivation.