

# **Analyse von Beta-Defensinen im infizierten porkinen Wundheilungsmodell**

der Fakultät für Medizin und Gesundheitswissenschaften  
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
Doctor medicinae (Dr. med.)

angenommene

**Dissertation**

von

Frau Ursula Marie Kraneburg  
geboren am 08.11.1985 in Münster

Betreuer:

Prof. Dr. med. Lars Steinsträsser

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2016

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Wundinfektionen mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und Wundheilungsstörungen stellen eine große Herausforderung im klinischen Alltag dar. Die zunehmende Morbidität der Patienten, eine steigende Zahl antibiotikaresistenter Keime und die begrenzten Erkenntnisse in Bezug auf die Pathophysiologie chronischer Wunden unterstreichen die Dringlichkeit weitere Einblicke zu gewinnen und neue Therapieoptionen zu entwickeln. Beta-Defensine, eine Untergruppe der Host Defense Peptide (HDPs), könnten in der Zukunft eine Ergänzung zu herkömmlichen Therapieoptionen darstellen. Sie besitzen eine hohe antimikrobielle und immunmodulatorische Aktivität und wirken unter anderem auf die Geweberegeneration.

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung von Beta-Defensinen im *S. aureus* infizierten porkinen Wundheilungsmodell und deren Korrelation mit regulatorischen Faktoren.

**Material und Methodik:** Um dieses Ziel zu erreichen wurden die Expressionsprofile von porkinen Beta-Defensinen pBD-1, pBD-2, pBD-3, pBD-4 und pBD-129, der Interleukine (1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -8, -17, -22 und IFN- $\gamma$ ) sowie von CD14, Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) mittels quantitativer PCR in *Staphylococcus aureus* infizierten und nicht-infizierten Wunden über den Verlauf von 12 Tagen dargestellt. Die Wundheilung wurde mikro- und makroskopisch beurteilt. Des Weiteren wurden histologische und immunhistochemische Analysen zum Expressionsprofil von Immunzellen in spezifischen Gewebeschichten durchgeführt.

**Ergebnisse:** pBD-2 und pBD-3 wurden in den *S. aureus* infizierten im Vergleich zu nicht-infizierten Wunden vermehrt exprimiert. pBD-1, pBD-4 und pBD-129 wurden hingegen erniedrigt exprimiert. Die Expressionsprofile von IL-22, CD14 und TLR4 korrelierten mit denen der pBD-1, -2 und -3. Die histologische Analyse zeigte eine signifikante Verminderung der Reepithelialisierung (im Sinne einer Wundheilungsstörung) und einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in den infizierten Wunden.

**Schlussfolgerung:** Die Erkenntnisse dieser Studie zur vermehrten bzw. verminderten Expression von Beta-Defensinen könnten Grundlage einer zielgerichteten Therapie

mit synthetischen Beta-Defensinen gegen eine bakterielle Infektion und für die Behandlung von Wundheilungsstörungen darstellen.

## Summary

**Introduction:** *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) infections and delayed wound healing are a daily clinical concern in patient care. Increased patient morbidity, antibiotic resistance and the lack of understanding the pathophysiology of chronic wounds underline the necessity of new therapeutic options. Beta-Defensins (BDs), which belong to a subgroup of Host Defense Peptides (HDPs), may become in future an alternative new therapeutic approach. They show antimicrobial, immunomodulatory actions and tissue-regenerative capacity.

The aim of the study is to analyse Beta-Defensins in a *S. aureus* infected porcine wound model in correlation to their regulatory factors.

**Methods and Materials:** The gene expression profile of porcine beta-Defensins pBD-1, pBD-2, pBD-3, pBD-4 and pBD-129, interleukins (-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -8, -17, -22 and IFN- $\gamma$ ) as well as CD14, Toll-like receptors 2 (TLR2) and Toll-like receptors 4 (TLR4) were analysed by real time-PCR in *S. aureus* infected and non-infected wounds during a time period of 12 days. The wound healing was evaluated macro- and microscopic. Moreover histological and immunohistochemical analysis were performed to assess the gene expression profile of innate cells in specific tissue layers.

**Results:** In the infected wounds pBD-2 and pBD-3 were higher expressed than in non-infected wounds. pBD-1, pBD-4 and pBD-129 were decreased expressed. The gene expression profile of IL-22, CD14 and TLR4 correlated with the expression profile of pBD-1, -2 and -3. Tissue analysis showed a significantly slowed skin reepithelialisation (defined as delayed wound healing) and an increased presence of neutrophil granulocytes and macrophages in the infected wounds.

**Conclusions:** The results of this study of the increased and decreased gene expression profile of BDs may be a basic concept for target-oriented therapy with synthetic BDs against bacterial infection and delay wound healing.

*Für Roman  
und meine Nichte Johanna*

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seiten</b>
Zusammenfassung.....	2
Summary.....	4
Verzeichnis der Abkürzungen .....	10
<b>1. Einführung .....</b>	<b>13</b>
1.1. Wundheilung und Wundheilungsstörung.....	13
1.2. Wundheilungsstörungen durch <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
1.3. Verbreitung antibiotikaresistenter <i>S. aureus</i> Stämme.....	15
1.4. Beta-Defensine.....	16
1.4.1. Beta-Defensine sind eine Untergruppe der Host Defense Peptide ...	16
1.4.2. Beta-Defensine-1 bis -4 werden in der Haut exprimiert .....	17
1.4.3. Sechs porcine Beta-Defensine .....	18
1.4.4. Beta-Defensine werden über Toll-like Rezeptoren reguliert.....	19
1.5. Porcine Haut hat viele Übereinstimmung mit dem Menschen .....	21
1.6. Zielsetzung .....	22
<b>2. Materialien und Methodik.....</b>	<b>25</b>
2.1. Materialien .....	25
2.1.1. Antikörper und Seren .....	25
2.1.2. Chemikalien, Lösungen und Puffer .....	25
2.1.3. Geräte und Software.....	26
2.1.4. Medikamente .....	27
2.1.5. qPCR Primer.....	27
2.1.6. Versuchstiere .....	28
2.1.7. Verbands- und Wundmaterialien.....	28

2.2.	Methodik.....	29
2.2.1.	Versuchstiere und deren Unterbringung .....	30
2.2.2.	Anästhesie der Versuchstiere .....	31
2.2.3.	Ablauf des Tierversuchs .....	31
2.2.4.	Bakterielle Infektion mit <i>S. aureus</i> .....	34
2.2.4.1.	Bakterielle Inokulation .....	34
2.2.4.2.	Quantitative Bakterienbestimmung .....	34
2.2.5.	Herstellung von Paraffin-Schnittpräparate und HE-Färbung.....	35
2.2.6.	Mikroskopische Begutachtung der Schnittpräparate.....	35
2.2.7.	Immunhistochemie für Paraffinschnitte .....	35
2.2.7.1.	Immunhistochemische Färbung mittels Fluoreszenz .....	35
2.2.7.2.	Immunhistochemische Färbung mittels DAB .....	37
2.2.8.	Genexpressionsanalyse.....	37
2.2.8.1.	RNA Isolation .....	38
2.2.8.2.	c-DNA Synthese .....	38
2.2.8.3.	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.....	39
2.2.9.	Statistische Auswertung.....	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1.	Verzögerte Wundheilung in ( <i>S. aureus</i> ) infizierten Wunden.....	40
3.1.1.	Erfolgreiche Wundinfektion (makroskopische Beurteilung).....	40
3.1.2.	Erhöhte postoperative Infektparameter (Blutanalyse).....	40
3.1.3.	Nachweis der <i>S. aureus</i> Infektion (mikrobiologische Auswertung) .....	40
3.1.4.	Verzögerte Wundheilung im Studientier (makroskopisch) .....	42
3.1.5.	Verzögerte Wundheilung im Studientier (mikroskopisch).....	43
3.2.	Erhöhte Anzahl von Immunzellen im Studientier.....	44
3.3.	Genexpression der Beta-Defensine in Korrelation zu TLRs und ILs .....	45

3.3.1. Erhöhte Expression von Toll-like Rezeptoren in infizierten Wunden.....	45
3.3.2. Expression der Beta-Defensine in ( <i>S. aureus</i> ) infizierten Wunden .....	47
3.3.3. Expression von regulatorischen Faktoren der Beta-Defensine .....	50
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>53</b>
4.1. Erfolgreiche Etablierung des infizierten Wundheilungsmodells .....	53
4.2. Identifizierung der porcinen Beta-Defensine in der Haut.....	53
4.3. Genexpressionsprofil der Beta-Defensine in infizierten Wunden .....	54
4.4. Lokalisation pBD-1 und pBD-3 in der porcinen Haut.....	54
4.5. Aktivierung von Beta-Defensinen durch Toll-like Rezeptoren .....	55
4.6. Erhöhte Beta-Defensin Expression in Gegenwart von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten .....	56
4.7. IL-8, IL-22, TLR4 und CD14 korrelieren zu pBD-1, pBD-2 und pBD-3 .....	57
<b>5. Ausblick und Zusammenfassung .....</b>	<b>60</b>
<b>6. Anhänge .....</b>	<b>62</b>
Literaturverzeichnis .....	62
Verzeichnis der Abbildungen.....	70
Verzeichnis der Tabellen.....	74
Liste der Veröffentlichungen und Vorträge .....	75
Veröffentlichungen .....	75
Kongressvorträge .....	76
Danksagung.....	77
Lebenslauf.....	78

## Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMP	Antimikrobielle Peptide
CFU	Colony Forming Unit
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FGF	Fibroblast Growth Factor
hBD	Humane $\beta$ -Defensine
HDP	Host Defense Peptide
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukine
i.v	Intravenös
LPS	Lipopolysaccharide
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
n	Anzahl
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor KappaB
NO	Stickstoffmonoxid
NTED	Neonatal Toxic shock syndrome-like Exanthematous Disease

---

§	Paragraph
pBD	Porkine $\beta$ -Defensine
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung 0.01 M, pH 7.2
PBST	PBS mit Tween 20
PGN	Peptidoglycan
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SSSS	Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TIR	Terminal Inverted Repeat
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSP	Thrombospondin
TSS	Toxisches Schock Syndrom
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>S. aureus</i>
WHO	World Health Organisation

**Maßeinheit**

%	Prozent
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Mittlere Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
KbE	Koloniebildende Einheit
kg	Kilogramm
log <sub>10</sub>	Logarithmus zur Basis 10
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
s	Sekunde
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

# 1. Einführung

## 1.1. Wundheilung und Wundheilungsstörung

Die Wundheilung ist ein komplexer biologischer Prozess und bis heute unzureichend verstanden. Ausgelöst durch eine Verletzung werden verschiedene intra- und interzelluläre Signalwege aktiviert und koordiniert, die die Integrität und Homöostase des Gewebes wiederherstellen. Die Wundheilung erfolgt in drei Phasen: 1. Exsudations- oder Resorptionsphase, 2. Granulationsphase und 3. Differenzierungsphase<sup>1</sup>. Die Exsudationsphase dauert bis zu 48 Stunden nach der Verletzung an<sup>1</sup>. In den ersten Minuten der Exsudationsphase kommt es zur Vasokonstriktion, Blutstillung und Blutgerinnung. Durch die Adhäsion, Aggregation und Degranulation zirkulierender Thrombozyten innerhalb des Fibringerinnsels werden eine Vielzahl von Mediatoren und Zytokinen freigesetzt, die eine Entzündung initiieren und die Vasodilatation sowie die Kapillarpermeabilität steigern. Als Folge tritt verstärkt Exsudat aus dem Blutplasma in das Interstitium über und es kommt zum Ödem. Zu den freigesetzten Mediatoren gehören: Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)<sup>2</sup>. Neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen wandern stimuliert durch TGF- $\beta$  in das Wundgebiet ein und beginnen nekrotisches, ischämisches Gewebe zu phagozytieren. TGF- $\beta$  wirkt autokrin auf Leukozyten und Fibroblasten und induziert die Expression von zusätzlichen Zytokinen, unter anderem Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 und PDGF<sup>2</sup>. Charakteristisch für die Granulationsphase ist die vermehrte Zellproliferation, Angiogenese und Reepithelialisierung. Die Granulationsphase dauert in der Regel 2-10 Tage<sup>1</sup>. In dieser Phase beginnen sich Keratinozyten zu vermehren, zu migrieren und schließlich die betroffene Stelle zu decken, um die funktionelle Integrität des Gewebes wiederherzustellen. Fibroblasten aus dem umliegenden Gewebe beginnen in den Defekt einzuwandern und differenzieren sich zu Myofibroblasten. Diese bilden subepitheliales Granulationsgewebe, indem sie extrazelluläre Matrix hauptsächlich in Form von Kollagen produzieren. Diese erste Umstrukturierung des geschädigten Gewebes dient als temporäre Barriere gegen die äußere Umgebung. Durch eine Reihe von Induktoren, unter anderem Hypoxie, Stickstoffmonoxid (NO), VEGF, Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2), Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) und

Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) bilden sich bald neue kapillare Blutgefäße innerhalb des Granulationsgewebes<sup>1</sup>. Notwendigerweise ist diese Angiogenese ein eng kontrollierter Prozess. Inhibitoren dieses Prozesses, die für den weiteren Narbenaufbau verantwortlich sind, sind Thrombospondin-1 (TSP-1), IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 und Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP)<sup>1</sup>. Die anschließende Differenzierungsphase kann bis über ein Jahr andauern und dient der molekularen Vernetzung und Stabilisierung der Narbe<sup>1</sup>. Das Narbengewebe erreicht dabei selten die ursprüngliche Stärke und Belastbarkeit.

Kann die Integrität der Haut innerhalb von 3 Monaten nicht wiederhergestellt werden, spricht man von einer chronischen Wunde. Chronische Wunden werden am häufigsten durch thermische Schäden, Trauma und chronische Ulzerationen bei Diabetes mellitus, pAVK, Druck oder venöse Stase verursacht<sup>1</sup>.

## 1.2. Wundheilungsstörungen durch *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) gehört zu den Gram-positiven Kokken und ist ein Mitglied der Micrococcaceae Familie. Die durch das Bakterium ausgeschütteten Exotoxine und Enzyme sind für diverse kutane und systemische Infektionen, einschließlich Impetigo, Furunkel, subkutane Abszesse, Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS, sogenanntes Dermatitis ex-foliativa neonatorum oder Staphylogenes Lyell-Syndrom), Toxic Shock Syndrome (TSS) und beim Neugeborenen für die Neonatal Toxic Shock Syndrome-like Exanthematous Disease (NTED) verantwortlich<sup>3</sup>.

*S. aureus* wird als fakultativ, pathogener Organismus angesehen. In etwa 30 bis 50% der Fälle sind Haut und/oder Schleimhaut gesunder Erwachsener mit *S. aureus* besiedelt<sup>4,5</sup>. Patienten mit Diabetes mellitus, intravenöse Drogenkonsumenten, Hämodialyse-Patienten, chirurgische Patienten und Patienten mit einer erworbenen Immundefizienz sind vermehrt von einer Keimbesiedlung betroffen<sup>6-9</sup>. Jede Verletzung der epithelialen Integrität, sei es ein Trauma oder ein chirurgischer Eingriff kann zur Gewebeinvasion und als Folge zur Infektion mit *S. aureus* führen<sup>10,11</sup>. Eine verzögerte Wundheilung durch *S. aureus* ist ein typischer Befund einer chronischen Wunde und ist auf die Biofilm bildende Eigenschaft des Bakteriums zurückzuführen. Dieser Biofilm besteht aus einer extrazellulären polymeren Matrix und wird von Mikroorganismen sezerniert<sup>12</sup>. Der Biofilm wirkt als

Schutz gegen das Eindringen von biologischen und pharmazeutischen Antibiotika und erleichtert die Anhaftung des Bakteriums an Oberflächen, insbesondere an Fremdkörpern<sup>12,13</sup>. Die Bildung von Biofilm in chronischen Wunden schafft eine physikalische Barriere gegen die Reepithelialisierung und unterhält dadurch die chronische Entzündung<sup>14,15</sup>.

Obwohl *S. aureus* Infektionen in der Regel die Haut betreffen, kann sich die Infektion weiter ausbreiten und zu invasiven und häufig lebensbedrohlichen Infektionen mit Komplikationen wie Lymphangitis, septische Arthritis, Abszesse verschiedener Organe, Osteomyelitis, Bakteriämie, Pneumonie, Meningitis, Endokarditis und Sepsis münden<sup>16</sup>. Die gesundheitsökonomische Bedeutung von *S. aureus* Infektionen ist groß. 11,6 Millionen Aufnahmen sowie 464.000 Krankenhauseinweisungen sind in den Vereinigten Staaten pro Jahr auf Wundinfektionen mit *S. aureus* zurückzuführen<sup>17</sup>.

### 1.3. Verbreitung antibiotikaresistenter *S. aureus* Stämme

Die Entdeckung der Antibiotika war einer der größten medizinischen Fortschritte des 20. Jahrhunderts. Die anfänglichen Erwartungen und Hoffnungen wurden leider teilweise durch das vermehrte Aufkommen von Resistenzen als Folge von Übernutzung enttäuscht<sup>18</sup>. Haut- und Weichteilinfektionen (darunter auch die Infektion chronischer Wunden) machen 7-10% der Krankenhausaufenthalte aus und stellen die häufigsten Indikationen für die Verwendung von antimikrobiellen Therapien in den USA dar<sup>19</sup>. *S. aureus* gehört zu den häufigsten isolierten Erregern infizierter Wunden<sup>20</sup>. Durch kontinuierliche Änderungen im Genom sind die Resistenzmechanismen des *S. aureus* besonders effektiv. Bereits ein Jahr nach der Einführung von Penicillin, berichteten Krankenhäuser in Europa und Nordamerika 1949 über Penicillin-resistente *S. aureus* Stämme<sup>21</sup>. Der erste Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) Stamm wurde 1960 identifiziert<sup>22</sup>. Von 1980 bis 1986 kam es zu einer vermehrten Häufung von Erkrankungen, die durch resistente *S. aureus* ausgelöst wurden<sup>23</sup>. Die Patientensterblichkeit stieg in den USA auf 64%, was den höchsten Stand seit der 40er Jahre entsprach<sup>23</sup>. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) haben sich MRSA-Infektionen weltweit endemisch verbreitet<sup>24</sup>. 2002 wurde der erste Vancomycin-resistente *S. aureus* (VRSA) Stamm isoliert<sup>25</sup>.

Die Behandlung infizierter Wunden stellt somit ein großes medizinisches und gesundheitsökonomisches Problem dar. Die zunehmende Einschränkung der therapeutischen Möglichkeiten durch vermehrte Resistenzen unterstreicht die Dringlichkeit neuer Strategien und Optionen für die Behandlung von infizierten Wunden.

## 1.4. Beta-Defensine

### 1.4.1. Beta-Defensine sind eine Untergruppe der Host Defense Peptide

Derzeitige Forschungsentwicklungen streben nach neuen Therapien, um den Gebrauch von Antibiotika zu reduzieren. Die gezielte Aktivierung des Immunsystems hat sich hierbei als eine vielversprechende Option erwiesen. Die sogenannten Host Defense Peptide (HDPs), auch antimikrobielle Peptide (AMPs) genannt, werden dem angeborenen Immunsystem zugerechnet und haben sich koevolutionär zu mikrobiellen Organismen entwickelt. HDPs können aus Menschen, Tieren sowie aus der Mehrzahl von Pflanzen-, Pilz- und Bakterienarten isoliert werden<sup>26</sup>. Seit Millionen von Jahren wirken HDPs bereits erfolgreich als natürliche Antibiotika mit einem außergewöhnlich breiten Spektrum gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien, Pilze und Viren<sup>27-30</sup>.

Derzeit sind mehr als 3.700 HDPs bekannt, die von vier internationalen Datenbanken erfasst werden, darunter mehr als 940 aus eukaryotischen Organismen<sup>31-34</sup>. Nach ihrer molekularen Zusammensetzung, Größe und Konformation lassen sich diese in zwei Hauptklassen einteilen: 1.) HDPs mit einer linearen  $\alpha$ -Helix Struktur ohne Disulfidbrücken (z. B. Cathelicidine, Magainin und Cecropine) und 2.) HDPs mit einer  $\beta$ -Faltblatt Struktur mit charakteristischen Disulfidbrücken (z. B. Defensine)<sup>27,35-37</sup>.

Defensine sind kationische HDPs. Sie umfassen 29 bis 45 Aminosäuren und sind besonders reich an Cystein und Arginin<sup>27,29</sup>. Defensine selbst werden in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine unterteilt. Die molekulare Konfiguration der Defensine ermöglicht ihnen mit der Zellmembran bestimmter Zielzellen, beispielsweise von Bakterien, zu interagieren<sup>38</sup>. Durch Porenbildung in der Zellwand initiieren sie die Zellyse und letztendlich die Zerstörung der Zielzelle, ohne dass der genaue Mechanismus bisher bekannt ist<sup>39,40</sup>.

#### **1.4.2. Beta-Defensin-1 bis -4 werden in der Haut exprimiert**

Im Menschen wurden bislang 30  $\beta$ -Defensine (hBDs) identifiziert, wovon die  $\beta$ -Defensine 1 bis 4 in der Haut exprimiert werden <sup>41</sup>.

Das erste menschliche  $\beta$ -Defensin (hBD-1) wurde 1995 im Blutplasma von Patienten mit Nierenerkrankungen identifiziert und wird von verschiedenen Geweben (primär von epithelalem Gewebe des Respirations- und Urogenitaltrakts) exprimiert <sup>42</sup>. Zudem wird es kontinuierlich von Keratinozyten ausgeschüttet <sup>43</sup>. hBD-1 zeigt antibakterielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien Stämme wie *S. aureus* und *E. coli* (Tabelle 1) <sup>44</sup>.

Das humane  $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2) wurde in Hautgewebeproben von Psoriasis Patienten nachgewiesen <sup>45</sup>. hBD-2 wird vor allem in Keratinozyten und Epithelzellen des Gastrointestinal- und Respirationstrakts exprimiert. hBD-2 kann in Keratinozyten gespeichert werden und dessen Expression wird direkt durch den Kontakt mit bakteriellen Erregern oder durch Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten hochreguliert <sup>43,46,47</sup>. Weitere Studien haben gezeigt, dass die Expression von hBD-2 auch durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und IL-22, die unter anderem in der Wundheilung ausgeschüttet werden, induziert wird <sup>48,49</sup>. Eine erhöhte Expression von hBD-2 schützt die Haut vor Infektionen. Eine verringerte hBD-2 Aktivität führt hingegen in Brandwunden zu einem erhöhtem Risiko für Wundinfektionen und Sepsis <sup>50,51</sup>. Eine direkte antibakterielle Wirkung konnte zum Beispiel gegen *S. aureus* und *E. coli* nachgewiesen werden (Tabelle 1) <sup>52</sup>. Die Hochregulation von hBD-2 hat eine immunstimulierende Wirkung. So wirkt hBD-2 chemotaktisch auf unreife dendritische Zellen und T-Zellen <sup>53</sup>.

Das menschliche  $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3) wurde nahezu gleichzeitig im Jahre 2001 von zwei Arbeitsgruppen in Psoriasis Patienten entdeckt <sup>54,55</sup>. hBD-3 kann aus einer Vielzahl an Geweben isoliert werden. In der Haut wird hBD-3 (wie auch hBD-2) von Keratinozyten gespeichert <sup>56</sup>. TNF- $\alpha$ , Transforming Growth (TGF)- $\alpha$ , Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1), TLR5, IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  sowie verschiedene Bakterien spielen eine wichtige Rolle in der Syntheseaktivierung von hBD-3 <sup>54,57</sup>. hBD-3 zeigt eine breite bakterizide Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien,

einschließlich multiresistenter *S. aureus* Stämme und *Pseudomonas aeruginosa* (Tabelle 1) <sup>58</sup>.

Das menschliche  $\beta$ -Defensin-4 (hDB-4) wurde durch ein Screening-Verfahren des menschlichen Genoms entdeckt <sup>59</sup>. Synthetisches hBD-4 zeigt eine antimikrobielle Aktivität in mikromolaren Konzentrationen gegen *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus carnosus* (Tabelle 1) <sup>60</sup>. Es wird in erster Linie im Hoden und Nebenhoden synthetisiert und ist auch in Keratinozyten nachweisbar <sup>55</sup>. hDB-4 verhält sich vermutlich ähnlich wie hBD-2 und hBD-3 <sup>59,60</sup>.

**Tabelle 1: Antibakterielles, antifungales und antivirales Spektrum der humanen  $\beta$ -Defensine 1-4** <sup>60-63</sup>. hBD-1 wirkt antibakteriell. hBD-2 und hBD-3 agieren zusätzlich gegen Pilze und Viren. hBD-4 hat ein antibakterielles wie antifungales Wirkspektrum. hBD-1 bis -4 wirken chemotaktisch auf das angeborene und adaptive Immunsystem. (+ = aktiv gegen, ? = unbekannte Wirkung)

humane- $\beta$ - Defensine	Aktivität gegen Pathogen				Chemotaxis
	Gram +	Gram -	Pilze	Viren	
hBD-1	+	+	?	?	T- Zellen, DC
hBD-2	+	+	+	+	T- Zellen, DC, Mastzellen
hBD-3	+	+	+	+	T- Zellen, DC, Monozyten
hBD-4	+	+	+	?	T- Zellen, DC, Monozyten, Makrophagen,

### 1.4.3. Sechs porcine Beta-Defensine

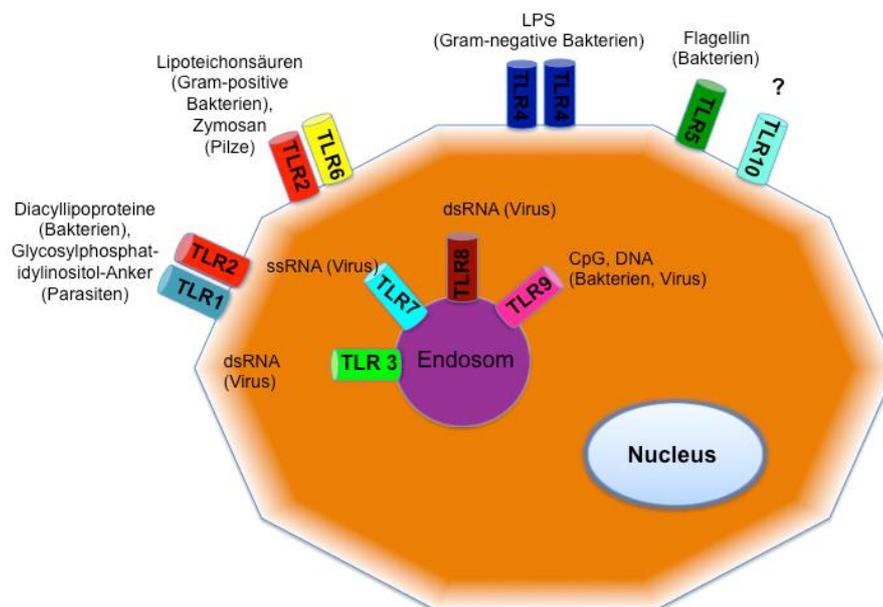
Im Schwein sind insgesamt 11  $\beta$ -Defensine (pBDs) bekannt. Davon werden sechs  $\beta$ -Defensine in der porcinen Haut exprimiert: pBD-1, pBD-2, pBD-3, pBD-4, pBD-123 und pBD-129 <sup>41</sup>. Die Bedeutung von pBD-123 und pBD-129 sind unbekannt. Die porcinen  $\beta$ -Defensine haben eine andere Nomenklatur als die hBDs (Tabelle 2). hBD-1 entspricht dem pBD-2 sowie hBD-2 dem pBD-1 entspricht.

**Tabelle 2: Nomenklatur der  $\beta$ -Defensine im Mensch und im Schwein.** hBD-1 entspricht dem pBD-2 sowie hBD-2 dem pBD-1 entspricht.

Humane $\beta$ -Defensine	Homologe porkine $\beta$ -Defensine
hBD-1	pBD-2
hBD-2	pBD-1
hBD-3	pBD-3
hBD-4	pBD-4
hBD-129	pBD-129
hBD-123	pBD-123

#### 1.4.4. Beta-Defensine werden über Toll-like Rezeptoren reguliert

Mehrere Mechanismen und Signalwege regulieren die Expression von  $\beta$ -Defensinen, unter anderem Nuclear Factor KappaB (NF- $\kappa$ B) und Mitogen-Activated Protein (MAP) kinases (einschließlich Src-abhängige Raf-MEK1/2-ERK) <sup>64-66</sup>. In der Wundheilung spielt der NF- $\kappa$ B Signalweg eine wichtige Rolle. Die Aktivierung erfolgt über Toll-like Rezeptoren (TLRs) <sup>67,68</sup>. TLRs sind gut untersuchte Sensoren des Immunsystems, die jeweils auf bestimmte Liganden reagieren (Abbildung 1).

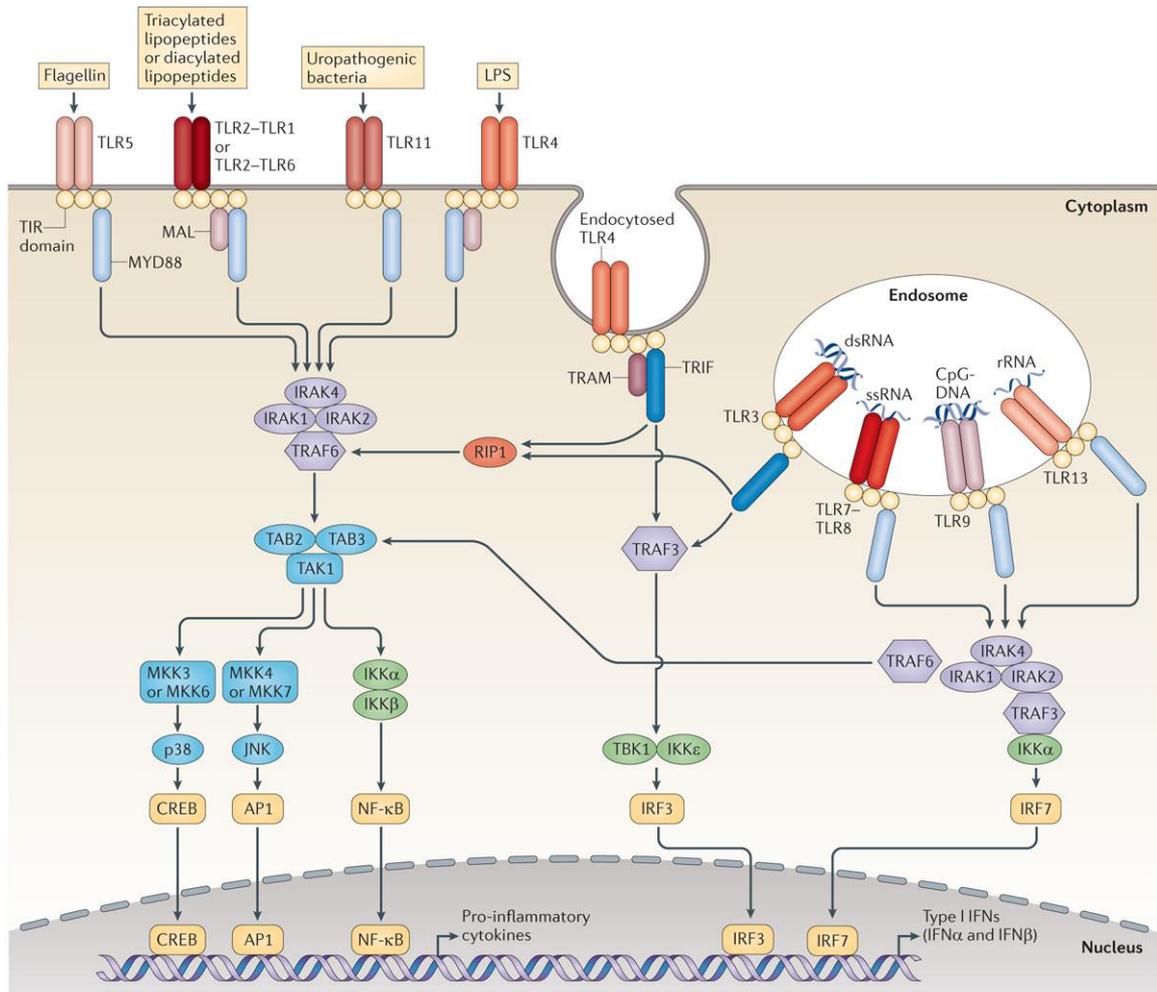


**Abbildung 1: TLRs und entsprechende Liganden.** Extrazelluläre TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10) werden vor allem von Bakterien, Parasiten und Pilzen aktiviert. Intrazellulär gelegene TLRs (TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9) erkennen hingegen Viren.

Im Menschen wurden zehn TLRs identifiziert (Abbildung 1). TLRs liegen entweder extra- oder intrazellulär <sup>69,70</sup>. Zu den extrazellulären TLRs gehören TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10 <sup>69,70</sup>. Intrazellulär gelegen sind TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 <sup>69,70</sup>. TLR2, der mit TLR1 oder TLR6 einen Heterodimer bildet, erkennt

Peptidoglycan (PGN), LPS, Nukleinsäuren, Mykoplasmen, Lipoproteine, Hefe, Kohlenhydrate und auch körpereigene Moleküle wie Hitzeschockproteine <sup>69,70</sup>. TLR3 reagiert auf doppelsträngige RNA <sup>71</sup>. TLR4 wird durch LPS als wesentlicher Bestandteil der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien und durch verschiedene körpereigene Moleküle aktiviert <sup>72</sup>. TLR5 erkennt das bakterielle Flagellin <sup>73</sup>. TLR7 und TLR8 erkennen einzelsträngige RNA <sup>72</sup>. TLR9 reagiert auf bakterielle und virale DNA methylierter CpG-Motive <sup>73,74</sup>.

Im Allgemeinen initiieren TLRs die Aktivierung des angeborenen Immunsystems und rekrutieren Zellen des adaptiven Immunsystems <sup>75</sup>. Als Mitglieder der Interleukin-1-Rezeptor (IL-1Rs) Familie sind TLRs typische Typ I Transmembranglykoproteine. Die extrazelluläre Region besteht aus Leucin-reichen Wiederholungen <sup>76</sup>. Die intrazelluläre Region enthält eine sogenannte Terminal Inverted Repeat (TIR)-homologe Domäne und bindet an entsprechende Adapterproteine wie Myeloid Differentiation Primary-Response Protein 88 (MYD88), MYD88-Adaptor-Like Protein (MAL), TIR Domain-Containing Adaptor Protein Inducing IFN- $\beta$  (TRIF) und TRIF-Related Adaptor Molecule (TRAM) <sup>77</sup>. TLRs werden durch liganden-induzierte Dimerisierung des Rezeptors aktiviert. Dann bindet sich die intrazelluläre TIR-homolog Region mit den entsprechenden Adapterproteinen <sup>77</sup>. Die Adapterproteine initiieren ihrerseits die Interaktion zwischen IL-1R-Associated Kinases (IRAKs) und Adaptor Molecules TNF Receptor-Associated Factors (TRAFs). Es kommt zur Aktivierung der Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), JUN N-terminal Kinase (JNK), p38 und anderen Transkriptionsfaktoren. Zu den wichtigen Transkriptionsfaktoren gehören Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Interferon-Regulatory Factors (IRFs), Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein (CREB), Activator Protein 1 (AP1) und die Interferon-Regulatory Factors (IRF) <sup>77</sup>. Die Transkriptionsfaktoren lösen sich und induziert im Zellkern die Genexpression von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren sowie antimikrobiellen Peptiden wie zum Beispiel  $\beta$ -Defensinen <sup>77</sup>.



Nature Reviews | Immunology

**Abbildung 2: Toll-like Rezeptoren erkennen unter anderem mikrobielle Produkte und lösen eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Genen aus.** Der wichtigste Signalweg führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Nuclear Factor- $\kappa$ B und der Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinasen p38 und JNK. Diese Signalkaskaden erhöhen die Expression von proinflammatorischen Genen. Der zweite Weg führt über die Stimulation von TLR3 und TLR4 zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und anderen Transkriptionsfaktor wie Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3). Dieser Signalweg induziert die Expression von antiviralen Genen wie Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ )<sup>78</sup>.

### 1.5. Porkine Haut hat viele Übereinstimmung mit dem Menschen

Die porkine Haut ähnelt der humanen Haut anatomisch und physiologisch. Die porkine Epidermis ist vergleichbar zur humanen Epidermis in Durchmesser, Schichtaufbau und Zellphysiologie<sup>79</sup>. Die porkine Epidermis besteht aus vier Schichten von basal nach apikal: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum<sup>79</sup>. Das Stratum lucidum, welches nicht im Schwein zu finden ist, ist nur in wenigen Bereichen der humanen Epidermis vorhanden<sup>79</sup>. Die humane Epidermis ist etwa 50 bis 120 $\mu$ m und die porkine zwischen 30 bis 140 $\mu$ m dick<sup>80</sup>. Die epidermale Proliferation, die bei der

Wundheilung eine wichtige Rolle spielt, läuft im Schwein innerhalb von 14 und im Menschen innerhalb von 13 Tagen ab <sup>81</sup>.

Die porkine Dermis wird in zwei Schichten unterteilt, die nicht deutlich voneinander abzugrenzen sind: Stratum papillare und Stratum retikulare <sup>79</sup>. Der einzige Unterschied in der vaskulären Versorgung der porkinen Haut ist ein reduziert ausgeprägter subepidermaler Plexus <sup>82</sup>. Vergleichbar zwischen den beiden Spezies ist die Subkutis mit etwa 12mm <sup>83</sup>. Das Schwein besitzt ähnlich wie der Mensch nur wenige Haare oder Gruppen von 2-3 Follikeln <sup>79,83</sup>.

Mäuse und Ratten zeigen hingegen deutliche anatomische und physiologische Unterschiede im Aufbau der Haut, wie zum Beispiel eine dichte Körperbehaarung sowie eine dünne Epidermis und Dermis. Die Wundheilung findet im Unterschied zum Menschen in erster Linie durch Wundkontraktion an Stelle von Re-epithelialisierung statt. Eine Metaanalyse von 180 Artikeln zeigte eine Übereinstimmung der menschlichen Haut im Vergleich zu porkiner Haut von über 78%. In anderen Kleintier-Wundheilungsmodellen konnte nur eine Übereinstimmung von 53% gefunden werden <sup>84</sup>.

## 1.6. Zielsetzung

Die Behandlung von Wundheilungsstörungen und chronisch infizierten Wunden ist eine herausfordernde Aufgabe verschiedener medizinischer Fachrichtungen. Die langwierigen Behandlungen sind oftmals mit viel Leid des Patienten verbunden und enden zuweilen in chronischen Schmerzen, Amputationen oder anderen kritischen Komplikationen <sup>17</sup>. Die damit verbundenen Therapiekosten stellen eine starke Belastung für das Gesundheitssystem dar <sup>17</sup>. Oftmals sind ältere Patienten betroffen, was gerade auch unter dem Gesichtspunkt des demographischen Wandels eine besondere Herausforderung für die Zukunft mit sich bringt <sup>17</sup>. Des Weiteren entstehen neue Gefahren durch die zunehmende Häufung von Antibiotika-Resistenzen. Die Entwicklung von neuen Therapieoptionen ist deshalb eine wichtige Aufgabe in der allgemeinen Wundbehandlung und besonders auch in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie.

$\beta$ -Defensine besitzen eine hohe antimikrobielle, antiinflammatorische sowie immunmodulatorische Aktivität <sup>85</sup>. Eine Anwendung synthetischer  $\beta$ -Defensine als

Therapeutikum bei infizierten chronischen Wunden scheint grundsätzlich möglich, jedoch müssen zunächst genauere Kenntnisse über deren Aktivierung, Wirkweise, Immunmodulation und Beeinflussung der Geweberegeneration in vivo gewonnen werden.

Ziel dieser Studie ist die Analyse der Expressionsprofile der  $\beta$ -Defensine in Korrelation mit deren regulatorischen Faktoren und der Wirkung von  $\beta$ -Defensinen auf die Chemotaxis von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im *S. aureus* infizierten und nicht-infizierten Großtierwundmodell.

Um dieses Ziel zu erreichen werden die folgenden Experimente durchgeführt:

1.) Etablierung einer Wundheilungsstörung im *S. aureus* infizierten porkinen Wundheilungsmodell

Beim porkinen Wundheilungsmodell handelt es sich um ein bereits etabliertes Tiermodell. Die Infektion mit *S. aureus* wurde von unserer Arbeitsgruppe mehrfach durchgeführt und publiziert. Die erfolgreiche Etablierung eines Wundheilungsstörungsmodells in infizierten Wunden wird makro- und mikroskopisch verifiziert und dient als Grundlage für die folgenden Expressionsanalysen.

2.) Analyse der Genexpressionsprofile der porkinen Beta-Defensine

Die Genexpressionsprofile der in der porkinen Haut vorkommenden  $\beta$ -Defensine (pBD-1, pBD-2, pBD-3, pBD-4, und pBD-129) sollen im Verlauf der Wundheilung (im Zeitraum von 12 Tagen) in infizierten und nicht-infizierten Wunden mittels quantitativer PCR (qPCR) analysiert werden.

3.) Immunhistologische Analyse der Lokalisation der porkinen Beta-Defensine

Ferner stellt sich die Frage ob die pBDs von einem bestimmten Zelltyp in einer bestimmten Schicht der Haut exprimiert werden. Die Lokalisation der porkinen  $\beta$ -Defensine-1 und -3 in der Haut sollen immunhistochemisch dargestellt werden. Für die porkine Haut existierten zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine suffizienten Antikörper für die immunhistologische Analyse von pBD-2, pBD-3 und pBD-129.

4.) Korrelation der Genexpressionsprofile der Beta-Defensine und deren regulatorischen Faktoren

Es ist aus der Literatur bekannt, dass die Expression von  $\beta$ -Defensinen unter anderem durch TLRs gesteuert wird. Das bakterielle LPS, Lipoproteine und PGN aktivieren über CD14 und TLR2 die NF- $\kappa$ B Kaskade und führen schließlich zur Expression von  $\beta$ -Defensinen <sup>64,86-88</sup>. Gram-positive und Gram-negative Bakterien fördern die TLR2 Expression <sup>89</sup>.

Eine erhöhte  $\beta$ -Defensin Expression wurde in Reaktion auf IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-8, IL-17 und IL-22 diskutiert <sup>49,54,55,90</sup>. Die Ergebnisse sind jedoch teils kontrovers und in in vivo Studien der Haut nicht bestätigt.

Die Korrelation der  $\beta$ -Defensin Genexpression zu deren regulatorischen Faktoren (CD14, TLR2, TLR4 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-8, IL-17 und IL-22) wird im Verlauf der Wundheilung mittels qPCR analysiert.

##### 5.) Chemotaktischer Effekt der $\beta$ BD-Expression

$\beta$ -Defensine spielen eine bedeutende Rolle in der Modulation der angeborenen und adaptiven Immunität. Sie induzieren die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen <sup>91</sup>. Die Chemotaxis ist notwendig zur Initiierung der adaptiven Immunantwort. In der immunhistologischen Untersuchung sollen neutrophile Granulozyten und Makrophagen dargestellt werden. Dies soll beantworten ob Korrelationen zwischen der Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und der Genexpression der  $\beta$ -Defensine bestehen.

## 2. Materialien und Methodik

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Antikörper und Seren

Polyklonaler Antikörper Anti-human Cathepsin K	(Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg Deutschland)
Polyklonaler Antikörper Anti-pBD-1	(Herstellung Labor Prof. T. Ganz UCLA, Los Angeles, USA)
Polyklonaler Antikörper Kaninchen Anti-human Myeloperoxidase	(DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
Polyklonaler Anti-human hBD-3	(Novus Biologicals , Littleton , CO, USA)
Schweineserum	(Aus eigenen Versuchen)
Sekundärantikörper Pferd Anti-Kaninchen IgG Vektor	(Vector Laboratories, Burlingame, USA)
Sekundärantikörper Anti-Ziege IgG Vektor	(Vector Laboratories, Burlingame, USA)
Ziegenserum	(Vector Laboratories, Burlingame, USA)

#### 2.1.2. Chemikalien, Lösungen und Puffer

ABC Elite Reagenz	(Vector Laboratories, Burlingame, USA)
Alkohol (70% Isopropanol)	(RUB, Bochum, Deutschland)
Brain Heart Infusion culture media	(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA)
DAB-Substratlösung	(Vector Laboratories, Burlingame, USA)
DAPI	(Vector Laboratories, Burlingame, USA)
Ethanol	(Roth, Karlsruhe Deutschland)
First strand cDNA Synthese Kit:	(Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
- DNTP-Mix	
- Random Hexamers	
- DEPC-Wasser	
- TR-Puffer	
- Magnesiumchlorid	

- DTT
- Rekombinanter RNase Inhibitor („RNASE OUT“)
- Primer-Mischung
- SuperScript II
- Florescent Mountin Medium (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark)
- Glacialalkohollösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Hämatoxylinlösung (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Jodlösung (10% providone iodine paint) (RUB, Bochum, Deutschland)
- Mannitol-Salz-Agar Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande)
- RNeasy Mini Spin Columns (pink)
- Collection Tubes (1,5ml)
- Collection Tubes (2ml)
- Buffer RLT
- Buffer RW1
- Buffer RPE
- RNase-Free Water
- Handbook
- Streptavidin AlexaFluor 488 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
- Tryptikase-Soja-Agar mit 5% (RUB, Bochum, Deutschland)
- Waschjodlösung (RUB, Bochum, Deutschland)
- Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

### **2.1.3. Geräte und Software**

- |                              |                                     |
|------------------------------|-------------------------------------|
| Eppendorf Biophotometer      | (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)   |
| Haarschneideapparat Favorite | (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) |
| Homogenisator                | (Kinematica, Luzern, Schweiz)       |
| Software Adobe Photoshop     | (CS incorporated, Los Angeles, USA) |

**2.1.4. Medikamente**

Fentanyl Matrixpflaster 25µg/h	(Sandoz, Holzkirchen, Deutschland)
Propofol 2mg/kgKG	(Braun, Melsungen, Deutschland)
Paracetamol 37 mg/kgKG (1g) i.v.	(Sandoz, Holzkirchen, Deutschland)
Midazolam 1 mg/kg	(Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
Ketamin 10 mg/kg	(Hameln Pharma, Hameln, Deutschland)
Atropin 0,05 mg/kg	(Braun, Melsungen, Deutschland)

**2.1.5. qPCR Primer**

qPCR Primer (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)

<u>Primer</u>	<u>Primer Frequenz Forward</u>	<u>Primer Frequenz Reverse</u>
pBD-1	5'-ACCGCCTCCTCCTTGTATTC-3'	5'-TTTTGCAGCATTTGACTTGG-3'
pBD-2	5'-GCTGACTGTCTGCCTCCTCT-3'	5'-ACTTGGCCTTGCCACTGTAA-3'
pBD-3	5'CTTCCTATCCAGTCTCAGTGTCTGC-3'	5'GGCTTCTGTAGACTTCAAGGAGACAT-3'
pBD-4	5'-CCGTGAGGGTGAAATTAGGA-3'	5'-GAAAAGATGGGAAGGAAGGC-3'
pBD-129	5'-ATGTGTAATGGGTTTGGGGA-3'	5'-AGGACGATATTTTGTATGGCG-3'
pTLR-2	5'-TCTGTCTTGTGACCCTGCTG-3'	5'-AGCTCTGAGGTTACGCATT-3'
pTLR-4	5'-TCCCTAGGCTTCAGGTGCTA-3'	5'-AAAAAGCTAGGCTCCTTGGC-3'
pCD14	5'-TGGACCTCAGTCACAACCTCG-3'	5'-CCTTTAGGCACTTGCTCCAG-3'
pIL-1 $\alpha$	5'-ATGCCAGCTATGAGCCACTT-3'	5'-CCATCACCACACTGTCCTTG-3'
pIL-1 $\beta$	5'-CCAAAGAGGGACATGGAGAA-3'	5'-GGGCTTTTGTCTGCTTGAG-3'
pIL-8	5'-TGTGAGGCTGCAGTTCTGGCAA-3'	5'-TCCTTGGGGTCCAGGCAGACC-3'
pIL-17	5'-AGAGATCTTGGTCCTGCGAA-3'	5'-AAGAAATATGGCGGACGATG-3'
pIL-22	5'-GCAAAAAGCTAAGCCAATGC-3'	5'-TCTTCAGGGCCATAAACAGC-3'
pIFN- $\gamma$	5'-TGCAGATCCAGCGCAAAGCCA-3'	5'-TTGATGCTCTCTGGCCTTGGAAC-3'
18SrRNA	5'-GAAACTGCGAATGGCTCATTAAA-3'	5'-CACAGTTATCCAAGTAGGAGAGG-3'

**2.1.6. Versuchstiere**

Göttingen Minischweine (Ellegaard A/S, Dalmose, Dänemark)

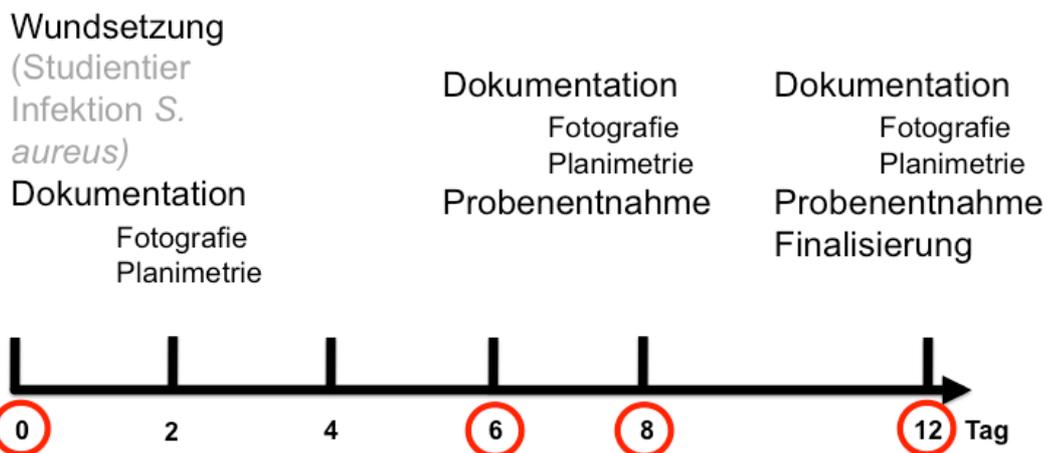
**2.1.7. Verbands- und Wundmaterialien**

23 Op-cutlery Punch (steril)	(Aesculap, Melsungen, Deutschland)
Fettstift	(Vector Laboratories, Burlingame, USA)
Leukoplast®	(BSN Medica, Hamburg, Deutschland)
Stomabeutel	(Coloplast, Hamburg, Deutschland)
Tegaderm®	(3M, Neus, Deutschland)
Fixomull®	(BSN Medica, Hamburg, Deutschland)
Rolta-Soft®	(Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland)
Peha-Haft®	(Peha, Sulzbach, Deutschland)
Warmwachs	(Veet, Reckitt-Beckinser, Deutschland)

## 2.2. Methodik

Alle Tierversuche wurden gemäß den Tierschutzrichtlinien der Bundesrepublik Deutschland sowie der Genehmigung von Versuchsvorhaben gemäß §8 Abschnitt 1 Tierschutzgesetz 9.93.2.10.32.07.027 ausgestellt und durch das LANUV NRW durchgeführt.

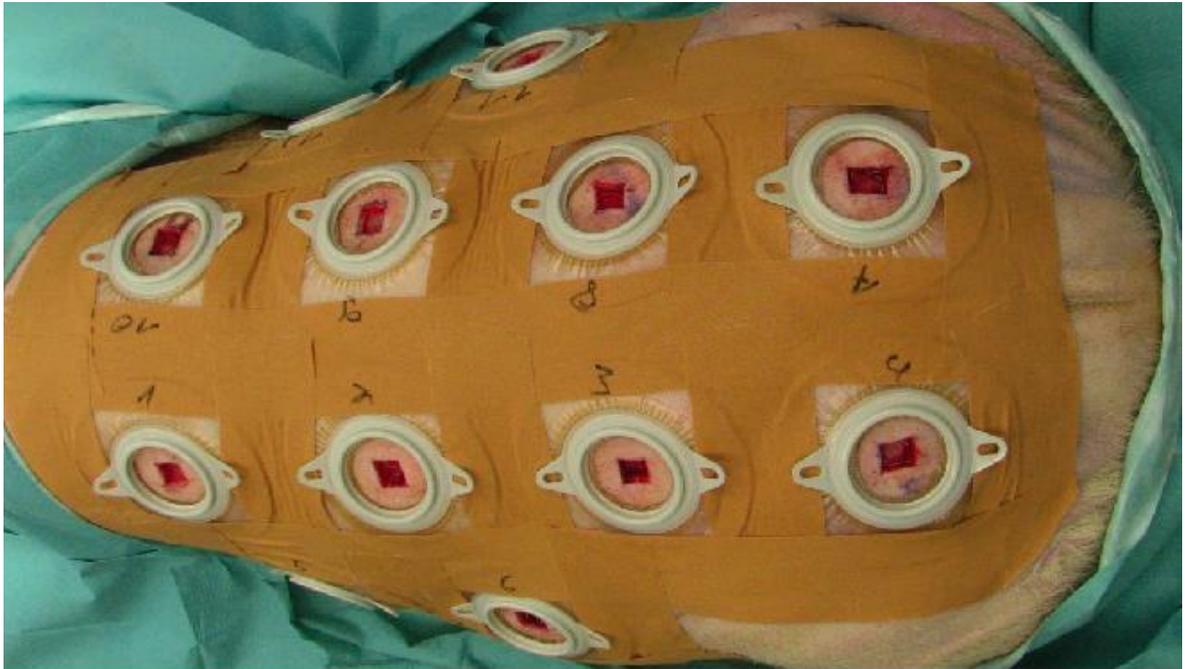
Das porcine Tiermodell ist ein etabliertes Wundheilungsmodell. In dieser Arbeitsgruppe wurde das Modell viele Male zuvor durchgeführt und publiziert. Es wurden zwei Schweine (n=2) untersucht. Das Tier, deren Wunden mit *S. aureus* infiziert wurden, wird im Folgenden als Studientier bezeichnet. Zu dem Studientier diente ein Tier desselben Wurfs als Kontrolle (im Folgenden Kontrolltier genannt).



**Abbildung 3: Übersicht des Tierexperiments.** Der Versuchszeitraum betrug 12 Tage. An Tag 0 wurde die Wundsetzung durchgeführt und die Wunden des Studientiers mit *S. aureus* infiziert. An jedem zweiten Tag erfolgte die Blutprobenentnahme. An Tag 0, 6, 8 und 12, hier rot markiert, erfolgte eine Tieroperation in Vollnarkose, in der Flüssigkeits- und Gewebeprobe zur weiteren Untersuchung unter sterilen Bedingungen entnommen wurden. Der Tierversuch wurde an Tag 12 beendet.

Nach einer Eingewöhnungszeit fand an Tag 0 die Wundsetzung statt (Abbildung 3). Es wurden zwölf Untersuchungsareale exzidiert (Abbildung 4). Die Areale wurden drei Gruppen zugeordnet, aus denen zu unterschiedlichen Zeiten Gewebebiopsien entnommen wurden, um ein zusätzliches Trauma durch die Probenentnahme möglichst gering zu halten (Tabelle 3). Der Versuchszeitraum betrug 12 Tage. An Tag 6 der Studie wurden die Proben aus den Wunden der Gruppe 1 entnommen, an Tag 8 aus den Wunden der Gruppe 2 und an Tag 12 aus den Wunden der Gruppe 3. Jeden zweiten Tag wurden Blutproben entnommen. An Tag 0, 6, 8 und 12 erfolgten in Vollnarkose die Entnahme der Gewebe- und Flüssigkeitsproben

sowie die Wunddokumentation. An Tag 12 wurde der Tierversuch beendet und das Tier finalisiert.



**Abbildung 4: Weibliches Göttinger Minischwein mit zwölf Untersuchungsarealen an Tag 0.** Insgesamt wurden zwei Tiere untersucht (n=2). Die Wunden des Studientiers wurden mit *S. aureus* infiziert. Zu dem Studientier diente ein Tier desselben Wurfs als Kontrolle (Kontrolltier).

**Tabelle 3: Gruppierung für Probenentnahme der jeweiligen Untersuchungsareale.** Die Wunden wurden in Gruppen eingeteilt, um das durch die Gewebeprobe entstandene Trauma gering zu halten. Zusätzlich wurden Blut- und Wundflüssigkeitsproben entnommen sowie die Wunden makroskopisch beurteilt und die Größe der Wundareale dokumentiert.

Gruppe	Probenentnahme an	Untersuchungsareal
1	Tag 6	Wunde 1, Wunde 4, Wunde 7 und Wunde 10
2	Tag 8	Wunde 2, Wunde 5, Wunde 8 und Wunde 11
3	Tag 12	Wunde 3, Wunde 6, Wunde 9 und Wunde 12

### **2.2.1. Versuchstiere und deren Unterbringung**

Bei den Versuchstieren handelte es sich um zwei weibliche Göttinger Mini-schweine mit einem Anfangsgewicht von 23 Kilogramm. Die Tiere wurden bei einem kontinuierlichen zwölf Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Raumtemperatur betrug  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  bei einer Luftfeuchtigkeit von 65%. Während der Eingewöhnungszeit von 24 Tagen wurden die Tiere in Einzelställen gehalten und täglich auf ihr Sozialverhalten sowie auf ihre Gesundheit hin untersucht.

### **2.2.2. Anästhesie der Versuchstiere**

Nach der Eingewöhnungszeit begann der Versuch an Tag 0 des Experiments. Die Sedierung der Tiere erfolgte mit Midazolam 0.5mg/kg KG und Ketamin 10mg/kg KG i.m. Bei Erreichen einer ausreichenden Sedierung wurde das Tier auf dem Operationstisch auf einer Wärmeplatte zum Schutz vor Auskühlung gelagert. Die Vitalparameter wie Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung und Körpertemperatur wurden kontinuierlich überwacht. Über einen intravenösen Zugang an einer Ohrvene konnte das Hypnotikum Propofol 2mg/kg KG und das nicht-opioide Analgetikum Paracetamol 37mg/kg KG (1g) gegeben werden. Als Erhaltungsanästhesie diente das Narkosegas Isofluran 1-3%, das mit einem 30%igen Sauerstoff-Luftgemisch per Schnauzenmaske verabreicht wurde. Das Rückenfell der Tiere wurde mit Warmwachs bei einer Einwirkzeit von 10min depiliert. Resthaare wurden mit einem Haarschneideapparat auf 0,1mm gekürzt.

### **2.2.3. Ablauf des Tierversuchs**

#### **1.) Initiale Operation (Tag 0)**

Nach vorheriger Haarentfernung wurden die 12 Wundareale mit einem sterilen chirurgischen Filzmarker angezeichnet. Die Wundareale waren 1,5 x 1,5cm groß. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden wurde zwischen den Flächen ein Abstand von mindestens 4,5cm belassen. Paravertebral wurde zwischen den Wunden und Medianlinie beidseits ein 6cm breiter Abstand eingehalten.

Es erfolgte die großflächige Hautdesinfektion mit einer Waschjodlösung (7,5%) und eine wiederholte Desinfektion des Operationsfeldes mit einer weiteren stärker konzentrierten Jodlösung (10%). Die zweite Lösung wurde 20 Minuten auf der Haut belassen, um die lokale Keimflora im Operationsgebiet zu reduzieren. Anschließend wurde das Areal steril abgedeckt und es erfolgte ein erneutes steriles Abwaschen mit Alkohol (70% Isopropanol).

Es wurde eine Wundfläche von 1,5 x 1,5cm mit Pinzette und Skalpell exzidiert (Abbildung 5). Die Präparation der Wunde reichte bis zur Faszientiefe unter Einbeziehung des subkutanen Fettgewebes. Die exzidierte Haut wurde für spätere Genexpressionsanalysen asserviert und entspricht den im Ergebnisteil dieser Arbeit aufgeführten Proben von Tag 0. Eine Blutstillung wurde mit sterilen Kompressen und bei größeren Blutungen mit Elektrokauterisation erreicht.



**Abbildung 5: Untersuchungsareal 1,5 x 1,5cm große Wunde an Tag 0.**

Die Wunden des Kontrolltiers wurden mit 1ml steriler 0,9% NaCl Lösung beträufelt, während die Wunden des Studientiers mit 1ml der *Staphylococcus aureus*-Suspension (*S. aureus*, ATCC25923,  $2 \times 10^8$  CFU/ml) infiziert wurden. Nach vorheriger Fotodokumentation wurden die Wunden mit selbstklebenden sterilen Stomabeuteln, die als Wundkammern dienten, abgedeckt und mit Leukoplast® 5cm fixiert. Die Wundflächen wurden vor Druck und anderen äußeren Einwirkungen geschützt, in dem die Wundkammern zusätzlich mit sterilen Kompressen, Tegaderm®, Fixomull®, Rolta-Soft®, Peha-Haft® und Leukoplast® verbunden wurden. Zur adäquaten postoperativen Schmerzmedikation wurde kurz vor Narkoseende ein Fentanyl Matrixpflaster 25µg/h retroaurikulär appliziert.

## **2.) Postoperatives Vorgehen**

Nach der Narkose wurden die Tiere in Einzelställen mit kantenlosen Wänden gehalten. Die Unterbringung sollte die Beschädigung der Wundauflagen vermeiden sowie sozialen Stress reduzieren.

## **3.) Verbandswechsel (Tag 2, 4, 6, 8, 10)**

An den postoperativen Tagen 2, 4, 6, 8 und 10 fand ein Verbandswechsel statt.

## **4.) Fotodokumentation und Planimetrie (Tag 0, 6, 8, 12)**

Alle Wunden wurden fotografisch dokumentiert. Zur Planimetrie wurden die im Verlauf fotografierten Wundflächen mittels der Software Adobe Photoshop vermessen. Dabei wurde die Wundfläche der Wunde an Tag 0 als 100% festgelegt. An den darauf folgenden Messtagen wurde die Wundfläche in ein Verhältnis zur Wundfläche an Tag 0 gesetzt. Hieraus ergab sich die prozentual zu Tag 0 verbliebene Wundfläche.

## **5.) Probenentnahme**

### **Blutentnahme (Tag 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12)**

Für die sofortige Glukosebestimmung, spätere Blutbilduntersuchung und Serumgewinnung wurde mit einer kleinen Kanüle (Größe 1) aus einer der Ohrvenen Blut entnommen und auf Eis gelagert.

### **Wundflüssigkeitsentnahme (Tag 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12)**

Unter sterilen Bedingungen wurde Wundflüssigkeit aus den Stromabeuteln mit Einsatz einer sterilen Kanüle entnommen. Aus der Probe wurde die Bakterienbesiedlung ermittelt.

### **Gewinnung der Biopsie (Tag 0, 6, 8, 12)**

Während des Verbandswechsels wurden bei beiden Tieren pro Wunde jeweils zwei Stanzbiopsien (23 Op-cutlery Punch) à 6mm Durchmesser und 0,5cm Tiefe entnommen. Eine Biopsie wurde umgehend für die spätere Expressionsanalyse zunächst in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C eingelagert. Die zweite Biopsie wurde auf Eis gekühlt und für die Bestimmung der Keimzahldichte im Gewebe an demselben Tag aufgearbeitet.

### **Probenentnahme für feingewebliche Untersuchungen (Tag 6, 8, 12)**

Eine weitere Gewebeprobe wurde für die Herstellung von Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte feingewebliche Schnitte entnommen. Die Gewebeproben wurden in 5%-iges gepuffertes Formalin gebettet und im Kühlraum bei -4°C gelagert.

## **6.) Finalisierung**

Der Versuch wurde am 12. Tag beendet. Die Tiere wurden wie oben beschrieben sediert. Nach oben beschriebener Probenentnahme und Dokumentation wurde zusätzlich ein 4mm breiter und 60mm langer Streifen im mittleren Teil der Wunde unter Einbeziehung der unverletzten Seitenteile und der Subkutis exzidiert. Für die histologische Untersuchung wurde die Gewebeentnahme in 5%-iges gepuffertes Formalin gebettet und im Kühlraum bei -4°C aufbewahrt. Die Euthanasie wurde mit Midazolam 1mg/kg KG und Ketamin 10mg/kg KG und Atropin 0,05mg/kg KG durchgeführt.

## **2.2.4. Bakterielle Infektion mit *S. aureus***

### **2.2.4.1. Bakterielle Inokulation**

Für die bakterielle Inokulation des Versuchstiers wurde *S. aureus* (ATCC25923) verwendet. Eine einzelne Kolonie des Stammes wurde in Brain Heart Infusion culture media geimpft und diese über 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das bakterielle Pellet wurde in sterilem Phosphate Buffered Saline (PBS) resuspendiert und bis zum Erreichen einer Konzentration von  $2 \times 10^8$  CFU/ml seriell verdünnt. Vier Stunden nach Exzision wurde 1ml der bakteriellen Suspension (an Tag 0) auf die Wunden des Studientiers pipettiert.

### **2.2.4.2. Quantitative Bakterienbestimmung**

#### **1) Quantitative Bakterienbestimmung im Gewebe (Tag 6, 8, 12)**

An den Tagen 6, 8 und 12 wurden die oberflächlichen Fibrinschichten der Wunden abgelöst und 6mm große Stanzbiopsien entnommen. Die Proben wurden individuell gewogen und anschließend in 1ml steriler 0.9% Kochsalzlösung physikalisch homogenisiert. Nach serieller Verdünnung wurden die Proben für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl auf Casein-Soja-Agar mit 5% Schaf-Blut-Agar und für die selektive *S. aureus* Detektion auf Mannitol-Salz-Agar Platten aus-gestrichen. Die Platten wurden unter aeroben Bedingungen bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Die Gesamtkeimzahl wurde in CFU/g pro Gewebe bestimmt. Eine Bakterienzahl von  $>10^5$  CFU/ml wurde als bakterielle Infektion festgelegt.

#### **2) Quantitative Bakterienbestimmung in Wundflüssigkeit (Tag 2 bis 12)**

Für die quantitative Bakterienbestimmung (CFU/ml) wurden jeweils 100µl Wundflüssigkeit verwendet. Die Flüssigkeitsproben wurden ebenfalls auf Casein-Soja-Agar mit 5% Schaf-Blut-Agar und auf Mannitol-Salz-Agar Platten ausplattiert und anschließend inkubiert. Die Gesamtkeimzahl wurde in CFU/g pro ml Wundflüssigkeit bestimmt. Eine Bakterienzahl von  $>10^5$  CFU/ml wurde als bakterielle Infektion festgelegt.

### **2.2.5. Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten und HE-Färbung**

Die in Formalin gelagerten Schnittbiopsien (für die Herstellung von Paraffin-schnitten) wurden standardisiert in aufsteigenden Alkoholreihen entwässert, in Paraffin gegossen und mit dem Mikrotom in 3-5µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

### **2.2.6. Mikroskopische Begutachtung der Schnittpräparate**

Die gefärbten Schnittpräparate wurden mikroskopisch bezüglich Bindegewebsproliferation, Reepithelialisierung und Entzündungsreaktion der Wunden untersucht, um eine allgemeine Aussage zur Wundheilung und eventuellen Verzögerung selbiger treffen zu können. Jeder Schnitt wurde in Abschnitten fotografiert. Die digitalen Fotografien der einzelnen Wundabschnitte wurden als Fotomontage zu einem Bild zusammengefügt. Die nicht epithelialisierten Wundflächen wurden in Verhältnis zur gesamten Wunde gesetzt. Durch dieses Verfahren wurde die makroskopische Wundvermessung mit der mikroskopischen in Bezug gesetzt. Zur mikroskopischen Begutachtung wurden jeweils zwei Wunden pro Untersuchungstag ausgewählt.

### **2.2.7. Immunhistochemie für Paraffinschnitte**

Immunhistologisch wurden die Zellen der primären Immunabwehr des angeborenen Immunsystems (Makrophagen und neutrophile Granulozyten) sowie pBD-1 und pBD-3 untersucht. Zur Darstellung wurde eine immunhistochemische Färbung mittels Fluoreszenz und Diaminobenzidin (DAB) durchgeführt. Die immunhistochemischen Protokolle erfolgten nach den Empfehlungen der Hersteller und wurden wie folgt für die Anwendung für porkines Gewebe modifiziert.

#### **2.2.7.1. Immunhistochemische Färbung mittels Fluoreszenz**

Zuerst wurden die Schnitte einer einstündigen Hitzefixierung bei 70°C unterzogen und anschließend mit Xylol und Ethanol in absteigenden Konzentrationen entparaffiniert. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Schnitte in einer 1%-igen Citratlösung für 10min bei 95°C erhitzt. (Im Protokoll zur Anfärbung der neutrophilen

Granulozyten wurden die Schnitte für 20min erhitzt.) Nach 45min Abkühlungsphase (bei 4°C) wurden die Präparate auf den Objektträger mit einem Fettstift umrandet. Pro Objektträger wurden jeweils 200µl der Lösungen ein-gesetzt. Zwischen allen einzelnen der nun folgenden Inkubationsphasen erfolgte stets eine zweimalige Waschung der Präparate mit PBS (für jeweils 1 und danach 4min).

Zum Blockieren der unspezifischen Bindungen wurden die Präparate für 30min mit zweierlei Seren (15:1000 in PBST) inkubiert. Das Serum kam vom Wirt (Schwein) und von dem Tier, in dem der Zweitantikörper (Ziege und Pferd) entwickelt wurde. Bis auf die Kontrollschnitte, die stattdessen mit PBST benetzt wurden, wurden alle Präparate anschließend für 30min mit dem Primärantikörper (polyklonaler Antikörper Kaninchen Anti-human Myeloperoxidase 1:600, polyklonaler Antikörper Anti-human hBD3 1:50, polyklonaler Antikörper Anti-human pBD1 1:1000) inkubiert.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit standen keine Primärantikörper für die immunhistologische Darstellung von pBD-3 zu Verfügung. Vorherige Studien, die an humanem Hautgewebe durchgeführt wurden, benutzen den polyklonalen Antikörper anti-human hBD3 von Novus Biologicals <sup>56</sup>. Das porkine BD-3 zeigt Ähnlichkeiten zum humanen Gegenstück in Strukturaufbau, Sequenzlänge und dessen Eigenschaften <sup>41</sup>. Der verwendete Antikörper anti-human hBD3 aus der Ziege gilt als kreuzreaktiv gegenüber pBD-3, so dass er porkine BD-3 Epitope ebenfalls spezifisch erkennt.

Im nächsten Schritt wurden alle Präparate, einschließlich den Kontrollschnitten, mit den Sekundärantikörper (Pferd Anti-Ziege IgG 1:100 in 1,5% Pferdeserum in PBST, Ziege Anti-Kaninchen IgG 1:100 in 1,5% Ziegenserum in PBST) für 30min inkubiert. Alle Präparate wurden für 30min mit Streptavidin AlexaFluor 488 (5mg/ml PBST) inkubiert. Eine blaue Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte für 30min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 300ng/ml.

Nach der letzten Waschung mit PBS wurden die Schnitte mit je zwei Tropfen Eindeckmedium benetzt und mit einem Deckglas belegt.

#### **2.2.7.2. Immunhistochemische Färbung mittels DAB**

Wie bereits oben beschrieben, wurden die Präparate einer Hitzefixierung unterzogen. Zwischen allen einzelnen der folgenden Inkubationsphasen erfolgte

eine zweimalige Waschung der Präparate mit PBS (für jeweils 1 und danach 4min). Die Präparate wurden als Nächstes für 30min mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Präparate, wie oben beschrieben, geblockt und darauf folgend mit dem Primär- (Polyklonaler Primärantikörper Anti-human Cathepsin K 1:50) und Sekundärantikörper (Pferd Anti-Ziege IgG 1:100 in 1,5% Pferdeserum in PBST) inkubiert. Dann wurde das ABC Elite Reagenz gemischt und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Reaktion wurden jeweils 10µl Reagenz A und B mit 1ml PBST vermischt. Erst dann wurden die Schnitte mit der Lösung aus Reagenz A und B für 30min inkubiert. Danach wurde die DAB-Substratlösung zuerst auf einen einzelnen Kontrollschnitt aufgetragen und die Inkubationszeit bis zu einer deutlichen Braunfärbung der anzufärbenden Strukturen bestimmt. Die Färbung wurde dann durch eine PBS-Waschung unterbrochen. Darauf folgend wurden alle zu färbenden Objektträger mit der gleichen Inkubationszeit angefärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit filtrierter Hämatoxylinlösung. Als Nächstes erfolgte eine Waschung mit VE-Wasser und Fixierung in 100ml 70%igem Ethanol. Die Präparate wurden abschließend in aufsteigenden Ethanolreihen und Xylol entwässert und mit Entellan und Deckgläschen bedeckt.

Die Quantifizierung der Zellzahl erfolgte durch die Doktorandin und zwei weitere unabhängige Personen mittels einer Gesichtsfeld-Analyse (sogenannte High-Power Field Analyse). Hierfür wurden die gefärbten Zellen in einem zufällig gewählten Gesichtsfeldausschnitt unter dem Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung gezählt. Es wurden 10 Hauptgesichtsfelder/Person ausgezählt und anschließend der Mittelwert aller drei Ergebnisse/Person bestimmt.

### **2.2.8. Genexpressionsanalyse**

Zur Bestimmung der Expression von Interleukinen, Toll-like Rezeptoren und pBDs wurde die RNA der porkinen Hautzellen isoliert, in cDNA revers transkribiert und die entsprechenden Expressionen mittels qPCR dargestellt.

### **2.2.8.1. RNA Isolation**

Die RNA Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande). Die gefrorenen Stanzbiopsien wurden aufgetaut und längs in Streifen geschnitten. Ein Probengewicht zwischen 10 und 30mg wurde für die RNA Isolation festgelegt. Die Schnitte wurden gewogen und mit 600µl RLT-Puffer und 290µl Wasser homogenisiert. Nach Zugabe von 10µl Quiagen Proteinase K Lösung wurden die Präparate für 10min im Wasserbad (55°C) lysiert. Danach wurden die Proben bei 10.000 x g 3min zentrifugiert und der Überstand abpipetiert. Zu dem Sediment wurden 450µl 100%-iger Ethanol gegeben. Die Mischung wurde anschließend in einem RNeasy mini Tube 15s bei 8.000 x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 350µl RW1-Puffer wurde erneut zentrifugiert und der flüssige Abfall verworfen, während die zu isolierende RNA im Reaktionsgefäß verblieb. Daraufhin wurde die RNA mit 10µl DNase und 70µl RW1-Puffer für 15min bei Raumtemperatur gereinigt. Die RNA wurde erneut mit 350µl RW1-Puffer gespült, bei 8.000 x g zentrifugiert und daraufhin zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Mini Tubes 2min lang trocken zentrifugiert und die RNA daraufhin in 30µl (RNase-freien) Wasser gelöst. Die so erhaltene RNA-Konzentration wurde photometrisch gemessen und die RNA-Lösung bei -80°C bis zur DNA-Synthese gelagert.

### **2.2.8.2. c-DNA Synthese**

Für die cDNA-Synthese wurde 1µl RNA Lösung mit 1µl 10mM DNTP-Mix und 1µl Primer Mischung (50ng/µl) auf 10µl DEPC-Wasser aufgefüllt. Diese Mischung wurde für 5min bei 65°C inkubiert und danach auf Eis gelegt. Für jede Probe wurde ein Reaktionsansatz bestehend aus: 2µl TR-Puffer, 4µl 25mM Magnesiumchlorid, 2µl 0,1M DTT und 1µl rekombinanter RNase Inhibitor („RNASE OUT“) angesetzt und diesen mit der Probe für 2min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde jedem Reaktionsansatz 1µl SuperScript II (reverse Transkriptase) hinzugefügt und das Ganze bei 42°C für 50min inkubiert. Der abschließende Inkubationsschritt, bei dem die cDNA transkribiert wurde, erfolgte für 15min bei 70°C.

### **2.2.8.3. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

Die hergestellte cDNA wurde mittels qPCR auf die Expression der pBDs (pBD-1, -2, -3, -4 und 129), der regulatorischen Faktoren (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-8, IL-17 und IL-22) und der TLRs (TLR2 und TLR4) sowie CD14 untersucht. Für die Expressionsanalyse wurden 2 $\mu$ l cDNA mit 6 $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 10 $\mu$ l Master SYBR Green und je 1 $\mu$ l Forward und Reverse Primer (10 $\mu$ M) (oder für die negativen Kontrollen mit RNA und DNA freien Wasser) inkubiert. Die LightCycler Einstellungen entsprachen standardisierten Protokollen des Herstellers und wurden auf 50 PCR Zyklen festgelegt, um auch geringe mRNA Konzentrationen zu messen. (Die Temperatur zur Primerhybridisierung musste gelegentlich von Primer zu Primer angepasst werden. Die Temperatur für pBD-1 und pBD-4 wurde auf 64°C geändert.) Zur Bestimmung der Genexpression wurde die Konzentration der zu bestimmenden Gene in Relation zur Konzentration der 18sRNA (Housekeeping Gen) gesetzt.

### **2.2.9 Statistische Auswertung**

Für alle statistischen Auswertungen wurden die Unterschiede mit dem Student t-Test untersucht. Die Daten entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  den Standardabweichungen aus 3 Messungen. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Irrtumswahrscheinlichkeiten von unter 5 % ( $p < 0,05$ ) wurden als statistisch signifikant definiert. Für die statistischen Auswertungen wurde Microsoft Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) Software verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Verzögerte Wundheilung in (*S. aureus*) infizierten Wunden

##### 3.1.1. Erfolgreiche Wundinfektion (makroskopische Beurteilung)

Am 1. postoperativen Tag zeigten die Wunden beider Tiere klinische Entzündungszeichen wie Schwellung und Rötung. Die mit *S. aureus* inokulierten Wunden stellten sich klinisch als infiziert dar. An Tag 3 entwickelte sich in den infizierten Wunden ein eitriges Wundsekret. Im Verlauf von Tag 4 und 5 veränderte sich die Wundflüssigkeit zu einem trüben Sekret. Auf den infizierten Wunden bildeten sich fibrinöse-eitrige Blutgerinnsel. Dagegen war die Wundflüssigkeit der nicht-infizierten Wunden klar bis leicht rosa. In den infizierten Wunden wurde eine verzögerte Wundheilung beobachtet. Die Wundränder granulierten in den nicht-infizierten Wunden an Tag 4 und in den infizierten Wunden ab Tag 6.

##### 3.1.2. Erhöhte postoperative Infektparameter (Blutanalyse)

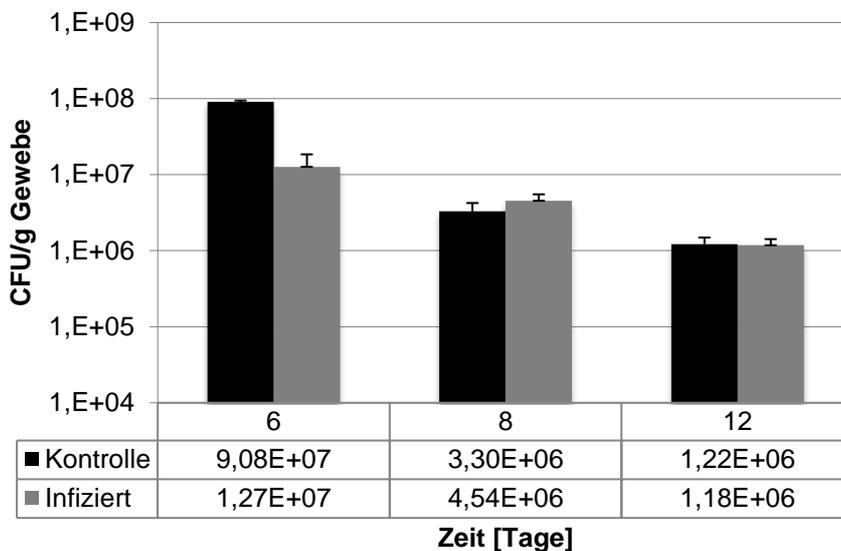
Im Versuchsverlauf stellte sich anhand der Blutanalyse ein Anstieg der Entzündungswerte dar. An Tag 2 bis Tag 8 konnte als Folge der Operation deutlich erhöhte Entzündungsparameter (CRP und Leukozyten) in beiden Tieren beobachtet werden. Die Entzündung klang jedoch an Tag 10 im Kontrolltier ab. Hingegen war im Studientier eine messbar anhaltende Entzündung durch eine erhöhte Leukozyten Anzahl nachweisbar.

##### 3.1.3. Nachweis der *S. aureus* Infektion (mikrobiologische Auswertung)

Selektive Kulturmedien für *S. aureus* zeigten keine Kolonisation der Wunden des Kontrolltiers durch *S. aureus*. Dennoch wurde eine signifikante bakterielle Wundbesiedlung festgestellt (Abbildung 6). Die Mikroorganismen wurden als *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Enterococcus faecium* identifiziert.

Die Wunden, die mit *S. aureus* inokuliert wurden, zeigten im Verlauf der Studie eine nachhaltige Infektion mit *S. aureus*. Neben *S. aureus* wurden *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Enterococcus faecium* identifiziert. Die höchste

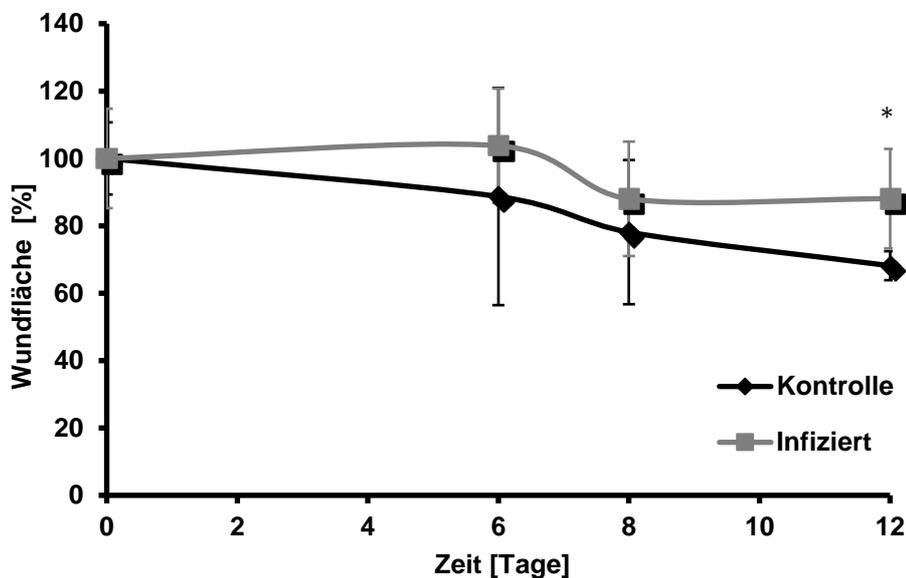
bakterielle Besiedlung wurde an Tag 6 im Wundgewebe des Kontrolltiers ( $9,08 \times 10^7$  CFU/ml) und in den inokulierten Wunden ( $1,27 \times 10^7$  CFU/ml) nachgewiesen (Abbildung 6). An Tag 10 sank die Bakterienzahl auf  $3,30 \times 10^6$  CFU/ml im Kontrollgewebe und  $4,54 \times 10^6$  CFU/ml im infizierten Gewebe. Am Versuchsende konnte eine Bakterienkolonisation von  $1,22 \times 10^6$  CFU/ml im Kontrollgewebe und  $1,18 \times 10^6$  CFU/ml im infizierten Gewebe gemessen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Keimanzahl inokulierter und nicht-inokulierter Wunden konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 6: Eine *S. aureus* Infektion wurde ausschließlich in den Proben des Studentiers festgestellt.** In allen Proben wurden *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Enterococcus faecium* nachgewiesen. Student t-Test, zweiseitig,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6}} = 0,24$ ,  $p_{\text{Tag 8}} = 0,79$ ,  $p_{\text{Tag 12}} = 0,97$ .

### 3.1.4. Verzögerte Wundheilung im Studientier (makroskopisch)

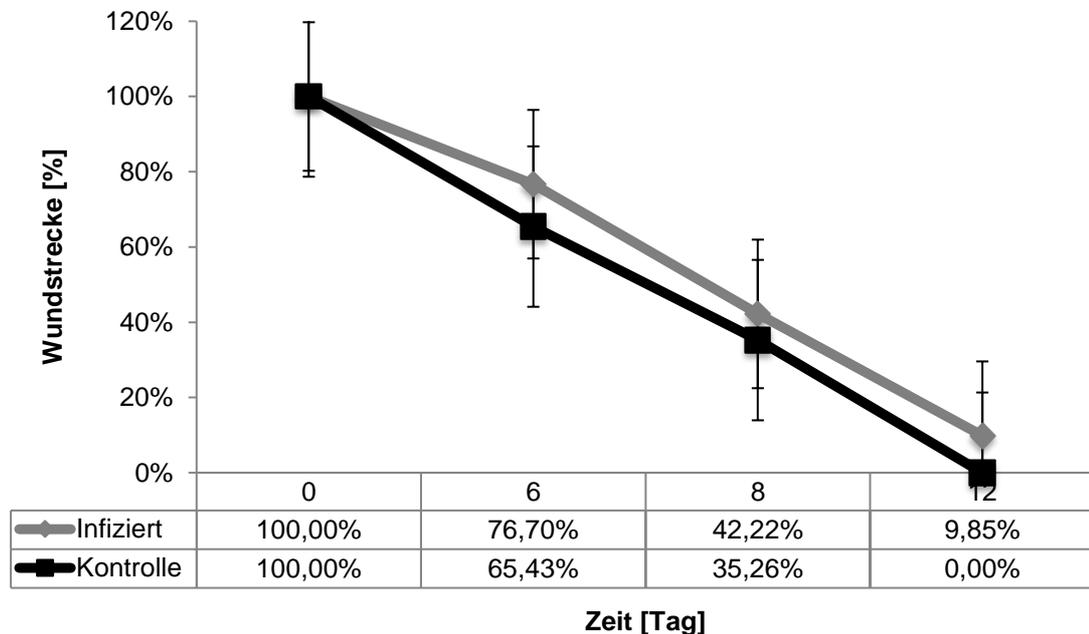
In der Planimetrie zeigte sich eine deutlich verzögerte Wundkontraktion der infizierten Wunden im Verlauf der Studie. Die mit *S. aureus* infizierten Wunden vergrößerten sich initial im Bezug auf die Wundfläche an Tag 0 (100%). An Tag 6 wurde eine Wundfläche von 104% gemessen. Danach verringerte sich die Wundfläche auf 88% an Tag 12 (Abbildung 7). Im Vergleich dazu heilten die Kontrollwunden besser. Die Wundfläche reduzierte sich an Tag 6 bereits auf 89%, an Tag 8 auf 78% und an Tag 12 auf 68% (Abbildung 7). Ein signifikanter Unterschied der Wundkontraktion wurde zum Endpunkt an Tag 12 festgestellt ( $p < 0,5$ ).



**Abbildung 7: Verzögerte Wundheilung in den infizierten Wunden.** Die Wunden wurden an Tag 0, 6, 8 und 12 vermessen. Initial vergrößerten sich die Wunden des Studientiers bevor sich die Wundflächen verkleinerten. Die Wunden des Kontrolltiers heilten im Vergleich zu denen des Studientiers besser. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ ,  $n = 12$ ,  $p_{\text{Tag } 0} = 0,1$ ,  $p_{\text{Tag } 6} = 0,32$ ,  $p_{\text{Tag } 8} = 0,36$ ,  $p_{\text{Tag } 12} = 0,032$ .

### 3.1.5. Verzögerte Wundheilung im Studientier (mikroskopisch)

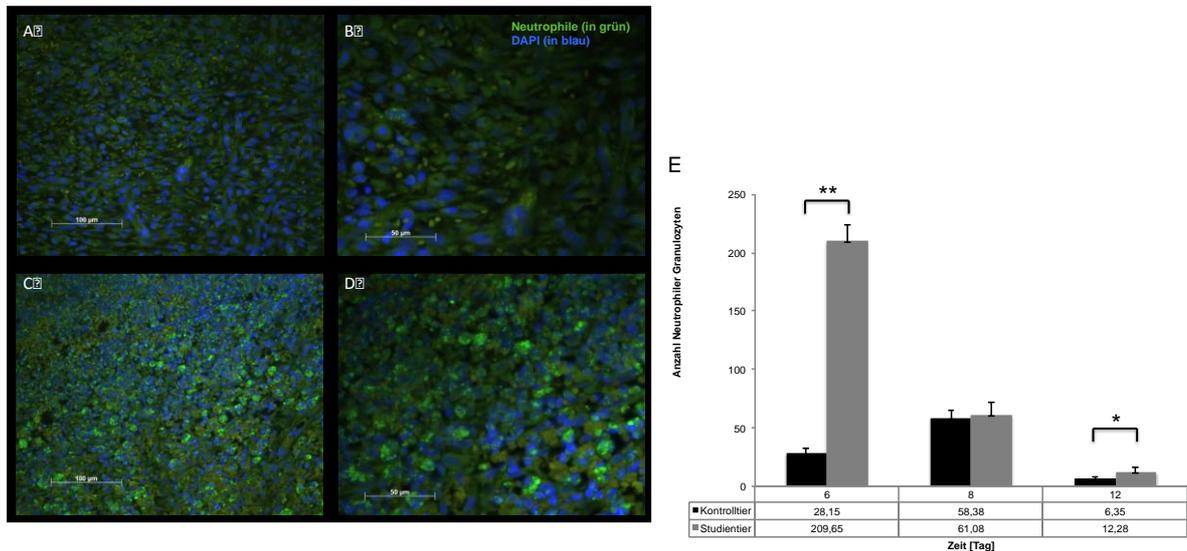
Es wurden Querschnittsbiopsien an den Tagen 6, 8 und 12 entnommen und histologisch untersucht. Die Reepithelialisierung ist Teil der zweiten Wundheilungsphase, die nach 48h einsetzt. Es zeigte sich eine verzögerte Reepithelialisierung der infizierten Wunden (Abbildung 8). Es wurde eine Verzögerung der Wundheilung (entspricht einer größeren Wundstrecke in %) an Tag 6 (76,70% Studientier versus 65,43% Kontrolltier), Tag 8 (42,22% Studientier versus 35,26% Kontrolltier) und Tag 12 (9,85% Studientier versus 0% Kontrolltier) nachgewiesen.



**Abbildung 8: Die Reepithelialisierung der Wundflächen war im Studientier verzögert.** In der mikroskopischen Untersuchung der Querschnittsbiopsien an Tag 6, 8 und 12 wurde eine verzögerte Wundheilung im Studientier beobachtet. Die Wunden im Kontrolltier heilten bereits an Tag 12 ab. Student t-Test, zweiseitig,  $n=4$ ,  $p_{\text{Tag } 6}=0,11$ ,  $p_{\text{Tag } 8}=0,55$ ,  $p_{\text{Tag } 12}=0,34$ .

### 3.2. Erhöhte Anzahl von Immunzellen im Studientier

An Tag 6, nach erfolgter Wundinfektion mit *S. aureus*, zeigte sich eine massive neutrophile Granulozyteninfiltration während selbige in nicht-infizierten Wunden nur vereinzelt vorkamen (Abbildung 9).

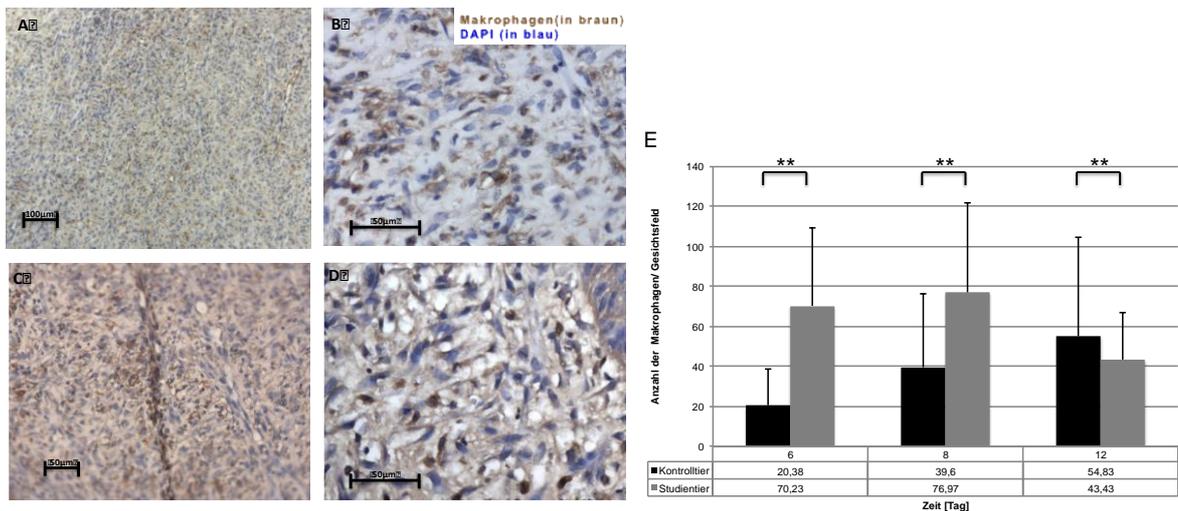


**Abbildung 9: Erhöhte Wundinfiltration der neutrophilen Granulozyten im Studientier.** (A, B) Immunhistochemisch wurden an Tag 6 in den nicht-infizierten Wunden nur vereinzelt neutrophile Granulozyten (grün) nachgewiesen. (C, D) In den *S. aureus* infizierten Wunden kam es hingegen zu einer massiven Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Die Zellkerne wurden zur besseren Übersicht mit DAPI (blau) gefärbt. (E) Insbesondere an Tag 6 zeigte sich eine signifikant höhere Granulozyteninfiltration. Im Verlauf der Wundheilung sank die Anzahl ab. An Tag 12 wurde in der quantitativen Analyse eine signifikant erhöhte Anzahl der neutrophilen Granulozyten festgestellt. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6}} < 0,001$ ,  $p_{\text{Tag 8}} = 0,85$ ,  $p_{\text{Tag 12}} = 0,02$

Verglichen mit den Kontrollwunden zeigte sich an Tag 6 in der Analyse der infizierten Wunden eine 7,4-fach höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld (Abbildung 9). Die quantitative Analyse bestätigte eine signifikant erhöhte Anzahl der neutrophilen Granulozyten. An Tag 8 konnten nur noch mäßig viele (58 Kontrolltier versus 61 Studientier) neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. An Tag 12 sank die Zahl der neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld auf 6 (Kontrolltier) zu 12 (Studientier) ab. Der Unterschied war in der quantitativen Analyse signifikant.

Die immunhistologische Darstellung der Makrophagen im Verlauf der Wundheilung zeigte eine signifikant höhere Makrophageninfiltration in den infizierten Proben (Abbildung 10). An Tag 6 lag die Anzahl der Makrophagen pro Gesichtsfeld bei 20

im Kontrolltier und im Studientier bei 70. An Tag 8 stieg die Anzahl der Makrophagen in beiden Tieren weiter an. In den infizierten Proben waren doppelt so viele Makrophagen zu erkennen im Vergleich zu den Kontrollproben. An Tag 12 sank die Makrophagen-Anzahl in beiden Tieren ab. In der Kontrolle waren 55, in den infizierten Proben 43 Makrophagen pro Gesichtsfeld zu zählen.



**Abbildung 10: Erhöhte Wundinfiltration der Makrophagen in den infizierten Proben.**

(A, B) Immunhistochemisch wurden an Tag 6 in den nicht-infizierten Wunden nur vereinzelt Makrophagen (braun) nachgewiesen.

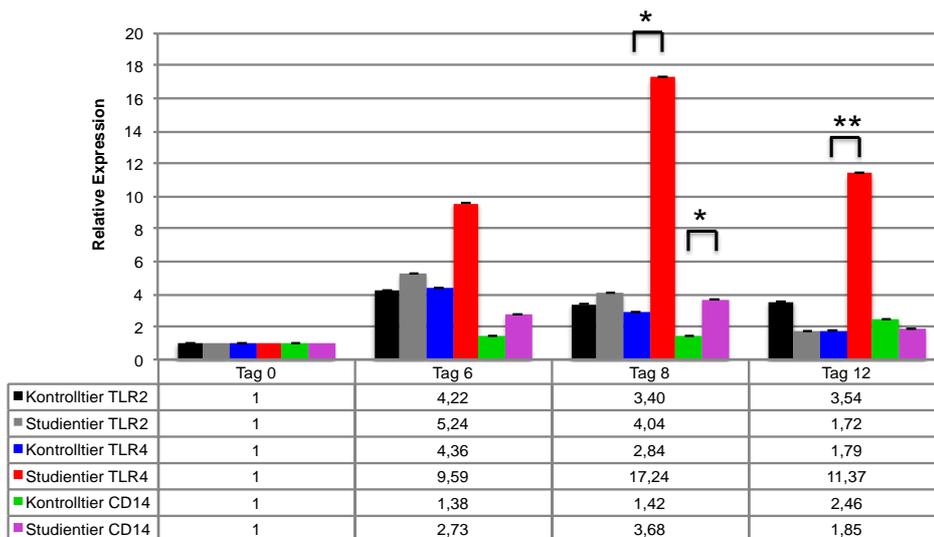
(C, D) In den *S. aureus* infizierten Wunden kam es hingegen zu einer massiven Infiltration von Makrophagen. Die Zellkerne wurden zur besseren Übersicht mit DAPI (blau) gefärbt.

(E) An Tag 6 und Tag 8 wurde eine signifikant erhöhte Makrophageninfiltration in den infizierten Wunden festgestellt. An Tag 12 sank die Anzahl der Makrophagen in den infizierten Wunden ab, hingegen stieg die Makrophagenanzahl in den Kontrollwunden an. In der quantitativen Analyse wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Proben der beiden Tiere bestätigt. Student t-Test, zweiseitig, \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6}} < 0,001$ ,  $p_{\text{Tag 8}} < 0,001$ ,  $p_{\text{Tag 12}} = 0,001$ .

### 3.3. Genexpression der Beta-Defensine in Korrelation zu Toll-like Rezeptoren und Interleukinen

#### 3.3.1. Erhöhte Expression von TLRs in infizierten Wunden

TLR2, TLR4 und CD14 ließen sich bereits in der intakten porkinen Haut nachweisen (Abbildung 11). Postoperativ stieg die TLR2 Genexpression in beiden Tieren an und sank am Tag 12 ab. An Tag 6 stieg die TLR2 Genexpression im Kontrolltier um das 4,22-fache an und fiel gegen Tag 12 auf das 3,54-fache. Im Studientier stieg die TLR2 Konzentration höher auf das 5,24-fache und sank an Tag 12 auf das 1,72-fache. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem infizierten und nicht-infizierten Gewebematerial konnte nicht dargestellt werden.



**Abbildung 11: Genexpression von TLR2, TLR4 und CD14.** TLR2 wurde in beiden Tieren vor allem an Tag 6 erhöht exprimiert und sank dann im Verlauf der Wundheilung ab. TLR4 wurde im Vergleich zu TLR2 und CD14 besonders stark im Studentier exprimiert. Die Expression von TLR4 stieg im Studentier bis Tag 8 an und sank daraufhin wieder ab. CD14 wurde schwach erhöht exprimiert. Alle angegebenen Werte wurden auf Tag 0 normiert. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 TLR2}} < 0,3$ ,  $p_{\text{Tag 8 TLR2}} < 0,47$ ,  $p_{\text{Tag 12 TLR2}} = 0,24$ ,  $p_{\text{Tag 6 TLR4}} < 0,06$ ,  $p_{\text{Tag 8 TLR4}} < 0,03$ ,  $p_{\text{Tag 12 TLR4}} < 0,001$ ,  $p_{\text{Tag 6 CD14}} < 0,07$ ,  $p_{\text{Tag 8 CD14}} < 0,05$ ,  $p_{\text{Tag 12 CD14}} = 0,73$ .

TLR 4 wurde um ein Vielfaches seines Ausgangswertes exprimiert (Abbildung 11). An Tag 6 stieg die Expression um das 4,36-fache im Kontrolltier und um das 9,59-fache im Studentier. An Tag 8 sank die Expression von TLR4 im Kontrolltier bereits wieder ab auf das 2,84-fache hingegen stieg die Expression im Studentier auf das 17,24-fache an. An Tag 12 sank die Genexpression in beiden Tieren ab. Die TLR4 Genexpression wurde im Studentier an Tag 8 und 12 signifikant erhöht gemessen im Vergleich zum Kontrolltier.

Die CD14 Genexpression stieg im Kontrolltier bis Tag 12 an (Abbildung 11). Im Studentier lag die Genexpression von CD14 am Anfang der Wundheilung höher als in der Kontrolle und fiel an Tag 12 unter den Wert der Kontrolle. In der quantitativen Analyse wurde an Tag 8 ein signifikanter Unterschied zwischen den Proben der beiden Tiere bestätigt.

### **3.3.2. Expression der Beta-Defensine in (*S. aureus*) infizierten Wunden**

Das Expressionsprofil von pBD-1 bis -3 korrelierte mit dem Expressionsprofil von TLR4 und CD14 (Abbildung 11, 12 und 13). Diese antimikrobiellen Peptide wurden vermehrt in den infizierten Proben exprimiert.

pBD-1 wurde über den Verlauf der Wundheilung vermindert exprimiert (Abbildung 12 A). Im Kontrolltier sank die pBD-1 Expression am 6. postoperativen Tag auf das 0,11-fache des Ausgangswertes (Tag 0) ab, stieg an Tag 8 auf das 0,88-fache des Ausgangswertes und sank an Tag 12 auf das 0,49-fache des Ausgangswertes ab. In den Wunden des Studientiers konnte an Tag 6 das 0,37-fache des Ausgangswertes nachgewiesen werden. An Tag 8 stieg in dem Studientier die Genexpression auf das 1,06-fache des Ausgangswertes und fiel an Tag 12 auf das 0,54-fache des Ausgangswertes. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tieren konnte nicht nachgewiesen werden.

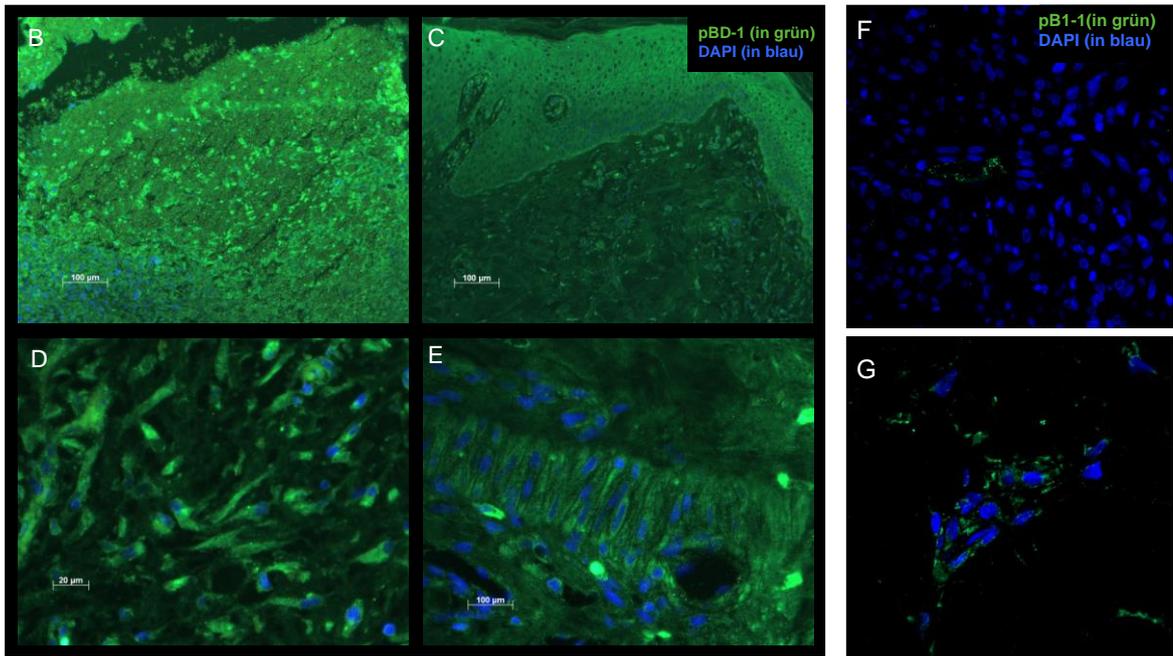
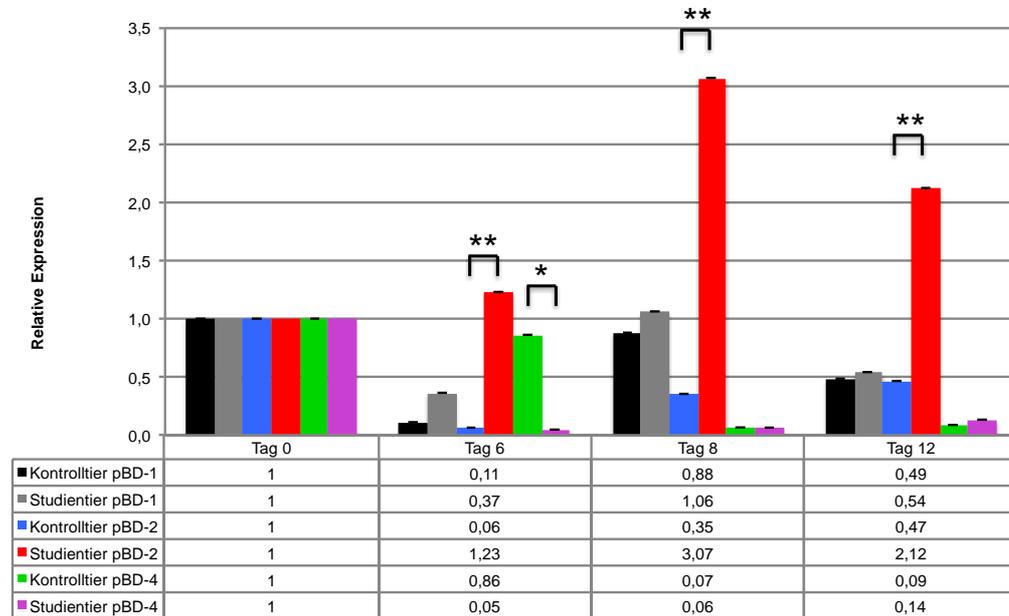
In der immunhistochemischen Darstellung wurde pBD-1 in der Epidermis (Stratum corneum, Stratum spinosum und im Stratum basale) nachgewiesen (Abbildung 12 B-E). Im Granulationsgewebe zeigten sich vermehrt einzelne mehrkernige Zellen, die pBD-1 anreicherten. Dabei handelte es sich möglicherweise um Gewebsmakrophagen (Abbildung 12 F, G).

Im Kontrolltier lag die pBD-2 Konzentration (wie pBD-1) im Verlauf der Wundheilung unter dem Ausgangswert (Abbildung 12 A). In der Kontrolle fiel die Genexpression an Tag 6 auf das 0,06-fache des Ausgangswertes, stieg an Tag 8 auf das 0,35-fache und an Tag 12 auf das 0,47-fache des Ausgangswertes. In den infizierten Wunden wurden signifikant höhere Werte im Verlauf der Wundheilung gemessen. Die Genexpression lag an Tag 6 bei einem Vielfachen von 1,23, an Tag 8 bei einem Vielfachen von 3,07 und an Tag 12 bei einem Vielfachen von 2,12 des Ausgangswertes.

Das vierte porkine  $\beta$ -Defensin wurde in beiden Tieren vermindert exprimiert (Abbildung 12 A). In der Kontrolle fiel die pBD-4 Konzentration an Tag 6 auf das 0,86-fache und an Tag 12 weiter auf das 0,09-fache des Ausgangswertes. In den infizierten Wunden wurde pBD-4 zu einem Vielfachen von 0,05 des

Ausgangswertes an Tag 6 nachgewiesen. Der Unterschied zwischen den beiden Tieren war an Tag 6 signifikant.

A

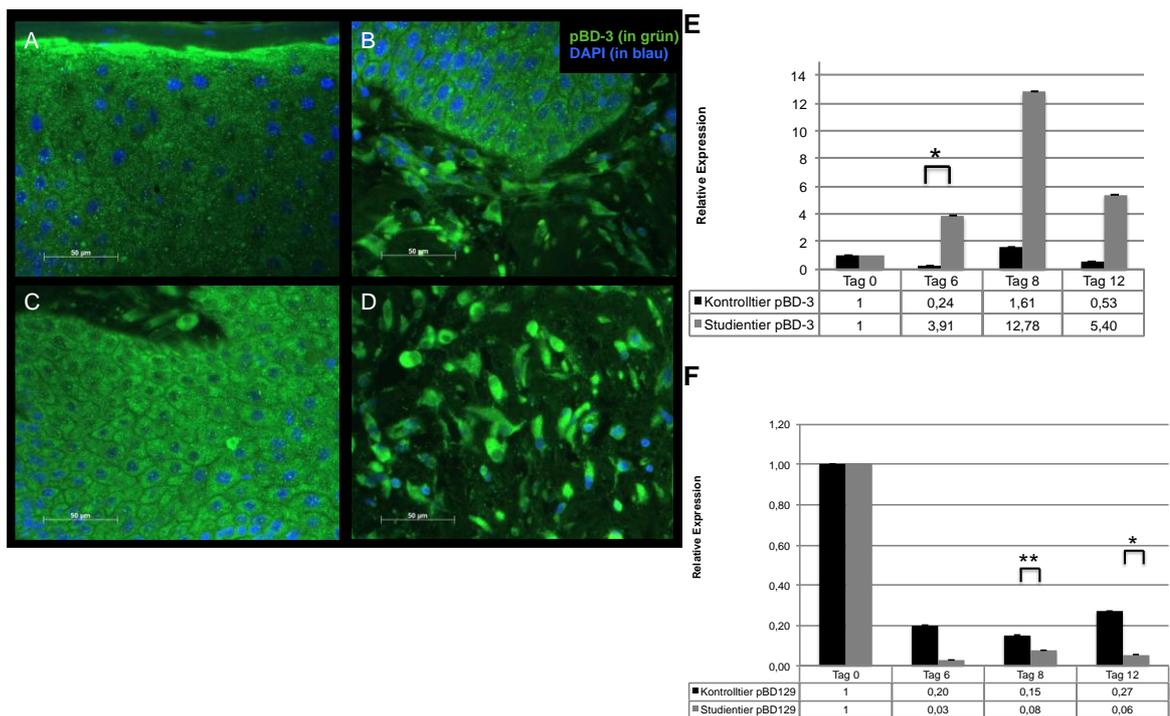


**Abbildung 12: Genexpression von pBD-1, pBD-2 und pBD-4 und Lokalisation pBD-1.**

(A) pBD-1, -2 und -4 wurden bis auf pBD-2 in den Wunden des Studentiers vermindert exprimiert. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 pBD-1}} < 0,28$ ,  $p_{\text{Tag 8 pBD-1}} < 0,75$ ,  $p_{\text{Tag 12 pBD-1}} = 0,83$ ,  $p_{\text{Tag 6 pBD-2}} < 0,006$ ,  $p_{\text{Tag 8 pBD-2}} = 0,01$ ,  $p_{\text{Tag 12 pBD-2}} = 0,006$ ,  $p_{\text{Tag 6 pBD-4}} = 0,04$ ,  $p_{\text{Tag 8 pBD-4}} = 0,75$ ,  $p_{\text{Tag 12 pBD-4}} = 0,18$

(B-E) pBD-1 (grün) wurde vor allem in Keratinozyten nachgewiesen und (F, G) in mehrkernigen Riesenzellen, vermutlich Gewebsmakrophagen. Die Zellkerne wurden zur besseren Übersicht mit DAPI (blau) gefärbt.

In den Proben des Studientiers wurde pBD-3 im Vergleich zu pBD-1, -2, -4 und -129 während der Wundheilung verstärkt exprimiert (Abbildung 13 E). In der Kontrolle lag die pBD-3 Konzentration an Tag 6 unter den Ausgangswert (Tag 0) und stieg an Tag 8 auf das 1,61-fache und sank an Tag 12 erneut ab auf das 0,53-fache des Ausgangswertes. Im Studientier stieg die pBD-3 Konzentration an Tag 6 auf das 3,91-fache und an Tag 8 auf das 12,78-fache des Ausgangswertes an. An Tag 12 sank die pBD-3 Konzentration auf das 5,4-fache des Ausgangswertes ab.



**Abbildung 13: Genexpression von pBD-3 und pBD-129 und Lokalisation pBD-3.**

(A, B) In den Wunden des Studientiers wurde pBD-3 an Tag 6, (C, D) Tag 8 und Tag 12 (hier nicht abgebildet) vermehrt exprimiert. pBD-3 (grün) wurde in Keratinozyten der Epidermis nachgewiesen. Die Zellkerne wurden zur besseren Übersicht mit DAPI (blau) gefärbt.

(E) pBD-3 wurde in der Kontrolle supprimiert und im Studientier vermehrt exprimiert. pBD-3 wurde vor allem an Tag 8 in den infizierten Wunden exprimiert. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 pBD-3}} = 0,04$ ,  $p_{\text{Tag 8 pBD-3}} = 0,75$ ,  $p_{\text{Tag 12 pBD-3}} = 0,18$

(F) pBD-129 wurde im Verlauf der Wundheilung in beiden Tieren vermindert nachgewiesen. Dabei wurde pBD-129 in den infizierten Wunden stärker supprimiert als in den nicht-infizierten Wunden. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 pBD-129}} = 0,06$ ,  $p_{\text{Tag 8 pBD-129}} = 0,004$ ,  $p_{\text{Tag 12 pBD-129}} = 0,04$

Die Lokalisation von pBD-3 wurde immunhistochemisch analysiert (Abbildung 13 A-E). pBD-3 wurde in allen Schichten der Epidermis (in den Keratinozyten) dargestellt. Überwiegend lagte sich das Peptid zum Schutz auf die Epidermis (Abbildung 13 A). Im Granulationsgewebe wurden Fibroblasten allenfalls schwach angefärbt. In der Dermis wurde pBD-3 nachgewiesen, jedoch wurde der Zelltyp nicht weiter analysiert.

Das Expressionsmuster von pBD-129 ähnelte dem von pBD-1, -2 und -3. Das Expressionsprofil sank bei beiden Tieren postoperativ ab. Dabei lagen die Werte der infizierten Proben signifikant unter der Kontrolle. An Tag 6 wurde in der Kontrolle das 0,2-fache des Ausgangswertes exprimiert versus im Studientier das 0,03-fache, an Tag 8 in der Kontrolle das 0,15-fache versus im Studientier das 0,08-fache und an Tag 12 in der Kontrolle das 0,27-fache versus im Studientier das 0,06-fache des Ausgangswertes.

### **3.3.3. Expression von regulatorischen Faktoren der Beta-Defensine**

In der Literatur wird eine erhöhte Defensin Expression als Reaktion auf IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-17, IL-22 und IFN- $\gamma$  diskutiert.

Das Interleukin IL-1 $\alpha$  stieg in beiden Tieren postoperativ deutlich an (Abbildung 14 A). Der höchste Wert wurde an Tag 6 erreicht (Kontrolltier das 3,13-fache und Studientier das 6,34-fache des Ausgangswertes). An Tag 8 sank die IL-1 $\alpha$  Genexpression in der Tendenz (Kontrolltier das 2,84-fache und Studientier das 2,47-fache des Ausgangswertes) ab, jedoch zeigte sich eine anhaltend gesteigerte Exprimierung bis Tag 12 (Kontrolltier das 2,88-fache und Studientier das 1,53-fache des Ausgangswertes). IL-1 $\alpha$  wurde an Tag 12 in Proben des Kontrolltiers signifikant höher exprimiert als in Proben des Studientiers.

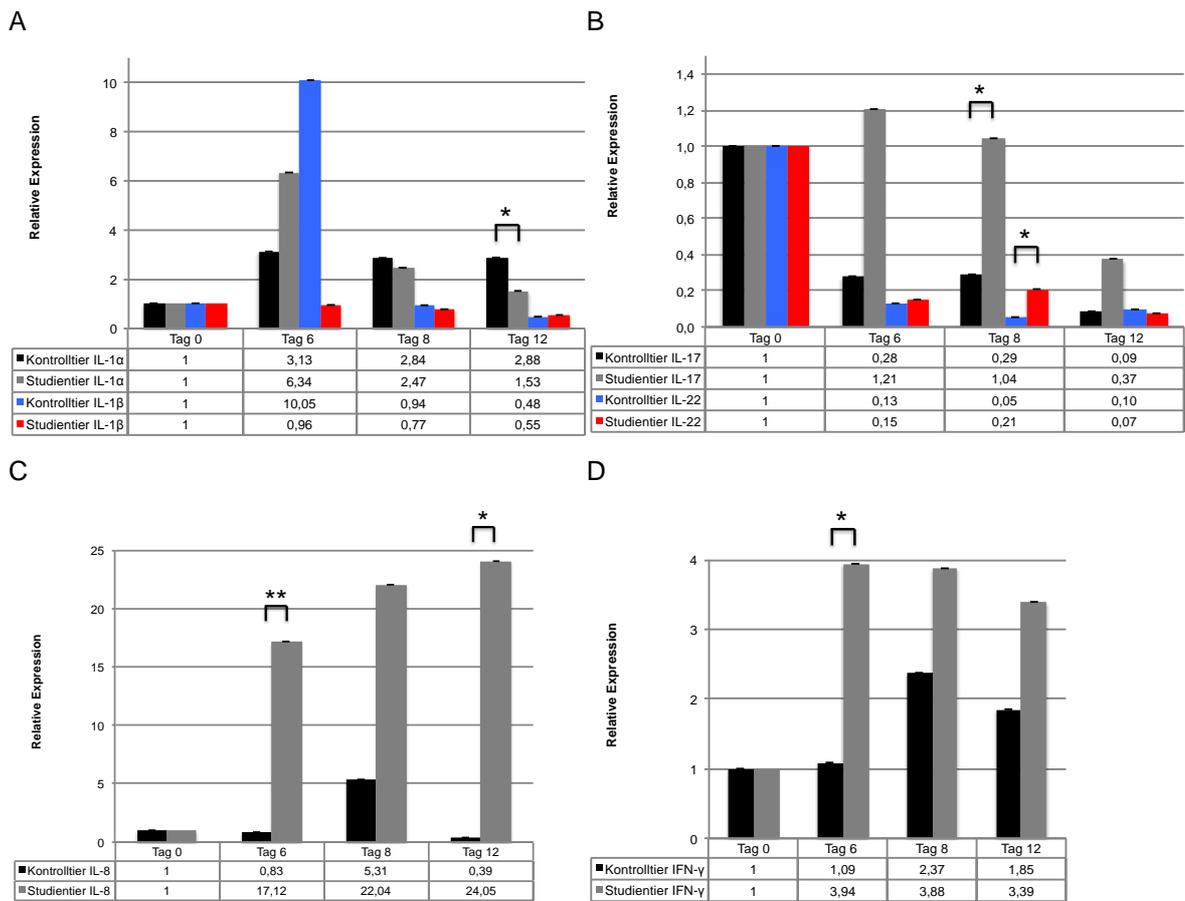
IL-1 $\beta$  mRNA wurde postoperativ verstärkt in den Kontrollproben, nicht jedoch in den infizierten Proben, exprimiert (Abbildung 14 A). Initial stieg die IL-1 $\beta$  Genexpression an Tag 6 in der Kontrolle auf das 10,05-fache an und sank dann an Tag 8 und 12 unter den Ausgangswert ab. In den Proben des Studientiers sank die IL-1 $\beta$  Genexpression weiter unter den Ausgangswert (Tag 0).

IL-17 und IL-22 werden von Zellen des adaptiven Immunsystems ausgeschüttet und orchestrieren die angeborene wie adaptive Immunabwehr als Reaktion auf eine bakterielle Infektion wie zum Beispiel durch *S. aureus*.

Postoperativ zeigte sich in den *S. aureus* infizierten Wunden ein Genexpressionsanstieg von IL-17 (Abbildung 14 B). Die Genexpression sank im Verlauf der Wundheilung vom Vielfachen von 1,21 des Ausgangswertes an Tag 6 auf das

0,09-fache des Ausgangswertes an Tag 12 ab. In den Proben der Kontrolle wurde IL-17 supprimiert.

Die IL-22 Genexpression sank in beiden Tieren postoperativ ab (Abbildung 14 B). Das Genexpressionsprofil des Kontrolltiers lag dabei unter dem des Studientiers. An Tag 8 wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt.



**Abbildung 14: Genexpression der Interleukine-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -8, -17, -22 und IFN- $\gamma$**   
 (A) Das Interleukin IL-1 $\alpha$  stieg in beiden Tieren postoperativ deutlich an. IL-1 $\beta$  wurde postoperativ verstärkt im Kontrolltier, nicht jedoch in den infizierten Proben, exprimiert. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 IL-1}\alpha} = 0,07$   $p_{\text{Tag 8 IL-1}\alpha} = 0,62$ ,  $p_{\text{Tag 12 IL-1}\alpha} = 0,03$ ,  $p_{\text{Tag 6 IL-1}\beta} = 0,11$   $p_{\text{Tag 8 IL-1}\beta} = 0,53$ ,  $p_{\text{Tag 12 IL-1}\beta} = 0,76$   
 (B) Ein Genexpressionsanstieg von IL-17 wurde nur in den infizierten Proben nachgewiesen. Die IL-22 Expression sank in beiden Tieren postoperativ ab. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 IL-17}} = 0,89$   $p_{\text{Tag 8 IL-17}} = 0,04$ ,  $p_{\text{Tag 12 IL-17}} = 0,79$ ,  $p_{\text{Tag 6 IL-22}} = 0,3$   $p_{\text{Tag 8 IL-22}} = 0,02$ ,  $p_{\text{Tag 12 IL-22}} = 0,81$   
 (C) IL-8 wurde in den infizierten Proben postoperativ gesteigert exprimiert. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 IL-8}} = 0,002$   $p_{\text{Tag 8 IL-8}} = 0,09$ ,  $p_{\text{Tag 12 IL-8}} = 0,02$   
 (D) Die IFN- $\gamma$  Expression stieg im Verlauf der Wundheilung in beiden Tieren an. Das Genexpressionsprofil lag im Studientier über dem des Kontrolltieres. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 IFN-}\gamma} = 0,01$   $p_{\text{Tag 8 IFN-}\gamma} = 0,27$ ,  $p_{\text{Tag 12 IFN-}\gamma} = 0,26$

Im Vergleich zur Kontrolle wurde die IL-8 Genexpression im infizierten Wundmilieu ab Tag 6 signifikant hochreguliert (Abbildung 14 C). Im Kontrolltier fiel die Genexpression an Tag 6 auf das 0,83-fache des Ausgangswertes hingegen stieg die Genexpression im Studientier über das 17-fache des Ausgangswertes. In der Tendenz stieg die IL-8 Genexpression an Tag 8 weiter an. An Tag 12 wurde die höchste IL-8 Expression festgestellt (Kontrolltier das 0,39-fache des Ausgangswertes und Studientier das 24,05-fache des Ausgangswertes). Die Unterschiede zwischen Kontroll- und Studientier waren an Tag 6 und 12 signifikant.

Die IFN- $\gamma$  Konzentration stieg im Verlauf der Wundheilung in beiden Tieren an (Abbildung 14 D). In den infizierten Wunden wurde IFN- $\gamma$  kontinuierlich gesteigert exprimiert (an Tag 6 um das 3,94-fache, an Tag 8 um das 3,88-fache und an Tag 12 um das 3,39-fache des Ausgangswertes). Hingegen stieg die IFN- $\gamma$  Genexpression in den Kontrollproben nur moderat an (an Tag 6 um das 1,09-fache, an Tag 8 um das 2,37-fache und an Tag 12 um das 1,85-fache des Ausgangswertes).

## 4. Diskussion

### 4.1. Erfolgreiche Etablierung des infizierten Wundheilungsmodells

Eine Kolonisation von Wunden mit Bakterien der Hautflora ist im allgemeinen üblich; dazu gehören *Staphylococcus epidermidis* (oder andere *Koagulase negative Staphylococci*), *Corynebacterium sp.*, *Brevibacterium sp.* und *Propionibacterium acnes*<sup>92</sup>. Im Verlauf der Wundheilung verändert sich dabei das Keimspektrum von Gram-positiven zu Gram-negativen und anaeroben Bakterien<sup>92</sup>. Wie erwartet zeigte sich eine bakterielle Infektion mit Gram-negativen Bakterien in den Kontroll-Wunden wie auch in den *S. aureus* inokulierten Wunden. In den untersuchten Wunden konnten bis auf *S. aureus* auch eine geringe Anzahl von *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Enterococcus faecium* identifiziert werden. *S. aureus* wurde ausschließlich in den *S. aureus* inokulierten Wunden nachgewiesen. Im Vergleich zum Kontrolltier zeigte sich eine signifikant verzögerte Reepithelialisierung um 12% in den *S. aureus* inokulierten Wunden. Somit konnte für die Untersuchung der  $\beta$ -Defensine erfolgreich ein chronisch infiziertes Wundheilungsmodell mit *S. aureus* etabliert werden.

### 4.2. Identifizierung der porkinen Beta-Defensine in der Haut

Harder et. al. konnten hBD-1 bis -4 in der gesunden humanen Haut identifizieren<sup>60</sup>. Die Arbeitsgruppe stellte niedrige hBD-1 und hBD-4 mRNA Konzentrationen fest<sup>60</sup>. hBD-2 und hBD-3 wurden laut dieser Publikation erhöht exprimiert<sup>60</sup>. Diese Daten beruhen auf in vitro  $Ca^{2+}$  stimulierten Keratinozyten. Die  $\beta$ -Defensin Produktion der Haut wird im Organismus jedoch zusätzlich von vielen anderen Faktoren bestimmt. In der vorgelegten in vivo Studie wurden alle porkinen  $\beta$ -Defensine identifiziert. Die Ergebnisse der einzelnen Genexpressionsprofil der Defensine zeigen Abweichungen zu denen der Arbeitsgruppe Harder. pBD-1 (entspricht hBD-2) und pBD-4 (entspricht hBD-4) wurden schwächer exprimiert als pBD-2 (entspricht hBD-1) und pBD-3 (entspricht hBD-3).

### 4.3. Genexpressionsprofil der $\beta$ -Defensine in infizierten Wunden

In dieser Studie wurden  $\beta$ -Defensine im Zusammenhang mit ihren endogenen und exogenen Induktoren im Rahmen der Wundheilung betrachtet. Bakterien und deren Produkte sind dabei die stärksten exogenen Induktoren der  $\beta$ -Defensine. In vitro Studien mit Keratinozyten konnten nachweisen, dass *S. aureus* Produkte vor allem die Expression des menschlichen  $\beta$ -Defensin-1 (hBD-1) und hBD-3 (nicht aber hBD-2) induzieren<sup>93,94</sup>. Durch den Kontakt mit dem lebendigen Bakterium wurde auch die hBD-2 mRNA Expression stimuliert<sup>93-95</sup>. In unserer Studie konnten vergleichbare Ergebnisse beobachtet werden. pBD-1, pBD-2 und pBD-3 konnten vermehrt in infizierten Wunden gemessen werden. Insbesondere die pBD-3 Expression wurde durch die *S. aureus* Infektion stark stimuliert. Die Expressionsquantität stieg zwei Tage verzögert (abhängig von der Bakterienanzahl) an. An Tag 6 wurde die höchste bakterielle Besiedlung der Wunden nachgewiesen, während der höchste mRNA-Anstieg erst an Tag 8 erreicht wurde. Das Expressionsprofil von pBD-4 ist zu großen Teilen unbekannt. In dieser Studie kam es im Verlauf der Wundheilung in den Proben beider Tiere zu einer Expressions-suppression von pBD-4. Die Bedeutung des Peptid pBD-129 für die Wundheilung ist bisher in der Literatur nicht näher beschrieben. Es ist ebenfalls unklar, durch welche Mediatoren die Expression von pBD-129 gesteuert wird. Postoperativ wurde pBD-129 vor allem in die infizierten Wunden supprimiert.

### 4.4. Lokalisation pBD-1 und pBD-3 in der porkinen Haut

Im Verlauf der Wundheilung wurde die Lokalisation der Peptide pBD-1 und pBD-3 immunhistochemisch untersucht. In in vitro Studien mit epidermaler Zellkultur wurde hBD-2 in lamellaren Körper des Stratum spinosum stimulierter Keratinozyten identifiziert<sup>96</sup>. In humanen Gewebebiopsien gesunder Probanden zeigten sich interindividuelle und ortsspezifische Unterschiede in der Intensität der Immunreaktion und Lokalisierung des Peptides<sup>97</sup>. Ali et al. beschrieb die hBD-2 Lokalisation im Stratum germinativum (auch Malpighi-Schicht genannt) und/oder Stratum corneum der Epidermis<sup>97</sup>. Die Arbeitsgruppe Poindexter et. al beschrieb die Lokalisation von hBD-2 ferner in der Epidermis (Stratum basale)<sup>98</sup>. In diesem

porkinen Modell wurde pBD-1 in Keratinozyten aller Schichten der Epidermis dargestellt.

Danach wurde die Lokalisation von pBD-3 immunhistochemisch analysiert. pBD-3 konnte keinen speziellen Zelltyp zugeordnete werden. Vor allem wurde pBD-3 im Stratum corneum dargestellt. Im Stratum basale wurde pBD-3 schwächer nachgewiesen. In einer aktuellen Studie mit humaner Haut zeigte sich, dass hBD-3 überwiegend in den oberen Schichten der Epidermis im Stratum spinosum und Stratum granulosum lokalisiert wurde <sup>56</sup>. Eine weitere Studie, die denselben Antikörper verwendete, konnte hBD-3 ebenfalls keinen bestimmten Zelltyp oder Hautanhangsgebilde zuordnen <sup>98</sup>. Beide Untersuchungen stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Es wird vermutet, dass hBD-3 aus einem speziellen sekretorischen System über die interzelluläre Räume in die oberen Schichten der Epidermis gelangt und somit den eindringenden Mikroorganismen entgegenwirkt <sup>56</sup>.

#### **4.5. Aktivierung von Beta-Defensinen durch Toll-like Rezeptoren**

Die Aktivierung von  $\beta$ -Defensinen wird den TLRs zugeschrieben. Über welchen genauen Mechanismus TLRs  $\beta$ -Defensine aktivieren ist bis dato nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert. Keratinozyten exprimieren TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 und TLR9 <sup>99</sup>. Aktuelle Studien konnten eine konstante Expression von TLR2 an der Oberfläche von Keratinozyten nachweisen <sup>100</sup>. hBD-3 wird durch mehrere Regulationsmechanismen aktiviert, zum Beispiel TLR2 abhängig <sup>101</sup>. Die TLR2 vermittelte Aktivierung scheint eine besondere Stellung einzunehmen. Eine funktionelle Hemmung des TLR2 auf Keratinozyten reduziert die hBD-3 Genexpression in Reaktion auf *S. aureus* um 37% <sup>101</sup>. Die Expression von TLR4 und die Reaktion auf den bekannten TLR4-Liganden Lipopolysaccharid (LPS) wurde widersprüchlich publiziert <sup>99,102</sup>. Einige Studien beschrieben eine Induktion von hBD-2 in Keratinozyte durch TLR4 <sup>102-105</sup>, während andere diese Ergebnisse widerlegten <sup>106,107</sup>. In dieser Studie wurden TLR2 und TLR4 in den intraoperativen (Tag 0) porkinen Hautproben identifiziert. Die Reaktion der beiden TLRs auf die Verletzung und bakterielle Infektion war unterschiedlich ausgeprägt. Die TLR2 Konzentration stieg in den Kontrollwunden wie auch in den infizierten Wunden

gleichermaßen an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht nachweisbar. Eine direkte Expressionsstimulierung durch *S. aureus* war somit nicht erkennbar. Das Expressionsprofil des TLR2 korrelierte ebenfalls nicht mit denen der pBDs. Hingegen korrelierten die Expressionsprofile von TLR4 und dessen Co-Rezeptor CD14 eng mit den Expressionsprofilen von pBD-1 bis 3. Es wurde eine signifikant erhöhte TLR4 Stimulation durch die *S. aureus* Infektion an Tag 8 und Tag 12 beobachtet. Diese Daten unterstützen vorangehende Studien, die die Vermutung nahe legen, dass TLR4 ebenfalls von Gram-positiven Bakterienstämmen wie *S. aureus* stimuliert wird und einen Einfluss auf die  $\beta$ -Defensin Aktivierung haben könnte <sup>108</sup>.

#### **4.6. Erhöhte Beta-Defensin Expression in Gegenwart von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten**

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ist essentiell in der Immunabwehr gegen *S. aureus*. Die immunhistologische Auswertung zeigte, dass neutrophile Granulozyten in der frühen Phase der Wundheilung stark vertreten waren. Im Vergleich zur Kontrolle war das Vorkommen in den *S. aureus* infizierten Wunden 7,45-fach höher. Neutrophile Granulozyten üben zusammen mit Keratinozyten eine synergistische Wirkung auf die  $\beta$ -Defensin Produktion aus <sup>109</sup>. Durch die Sezernierung von IL-12 und CCL3 werden Keratinozyten verstärkt zur Produktion von hBD-2 und hBD-3 angeregt <sup>109</sup>. Eine erhöhte Präsenz neutrophiler Granulozyten und somit erhöhte Stimulation von Keratinozyten mag zu einer gesteigerten  $\beta$ -Defensin Produktion in den infizierten Wunden führen. Diese Daten zeigten, dass die Konzentration von pBD-2 und pBD-3 in den infizierten Wunden hochreguliert wurde.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Mastzellen durch hBD-2, hBD-3 und hBD-4 angelockt werden und hBD-1 eine potente Chemoattraktion für Makrophagen darstellt <sup>91,110,111</sup>. Duiets et al. zeigte die Expression von hBD-2 mRNA in humanen Monozyten, differenzierten Makrophagen und alveolären Makrophagen <sup>43</sup>. Die immunhistologische Darstellung der porcinen Hautschnitte zeigte eine deutlich vermehrte Anreicherung von pBD-1 in Makrophagen. Diese Ergebnisse lassen

vermuten, dass pBD-1 in Makrophagen produziert, gespeichert und/oder intrazellulär aufgenommen wird. Makrophagen (M $\phi$ ) orchestrieren entscheidende Prozesse der Wundheilung und nehmen somit eine zentrale Rolle in allen Phasen ein. Aktivierte Makrophagen sind unterteilbar in einen proinflammatorischen Phenotyp M1 und einen antiinflammatorischen Phenotyp M2 <sup>112</sup>. M1 M $\phi$  wird unter anderem durch Bakterienbestandteile wie LPS und Peptidoglykane aktiviert. Während der ersten Phase üben M1 M $\phi$  proinflammatorische Funktionen aus wie zum Beispiel Antigen-Präsentation, Phagozytose und Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen (unter anderem IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$ ) und Wachstumsfaktoren <sup>113</sup>. In der zweiten Phase stimulieren M2 M $\phi$  die Reepithelialisierung und Gefäßneubildung durch die Förderung der Proliferation von EZM, Endothel- und Epithelzellen <sup>113</sup>. In der finalen Phase koordinieren M2 M $\phi$  die Balance zwischen EZM Produktion, Abbau und Umbau <sup>113</sup>. Diese Ergebnisse unterstützen eine mögliche Rolle für  $\beta$ -Defensine als Vermittler der verstärkten Immunreaktion während der Infektion mit *S. aureus*. Die Anzahl der Makrophagen stieg an Tag 8 parallel zum höchsten Anstieg der  $\beta$ -Defensine an.

#### **4.7. IL-8, IL-22, TLR4 und CD14 korrelieren zu pBD-1, pBD-2 und pBD-3**

In dieser Studie wurde die Korrelation von IL-1 auf die pBD-1 Expression untersucht. Das Expressionsprofil von pBD-1 zu IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zeigte keine direkten Korrelationen. Die IL-1 $\alpha$  Konzentration stieg postoperativ in beiden Tieren an und sank dann langsam ab. An Tag 6 lag die IL-1 $\alpha$  mRNA Konzentration in den infizierten Wunden über denen der Kontrollwunden. An Tag 8 und 12 sank die Konzentration in den infizierten Wunden unter denen des Kontrolltiers. An Tag 6 wurde IL-1 $\beta$  vermehrt in den Kontrollwunden exprimiert, hingegen wurde IL-1 $\beta$  im Studientier supprimiert. Die infizierten Proben wiesen eine höhere pBD-1 Genexpression auf als die der Kontrollwunden. Es lässt sich abschließend nicht unterscheiden, ob die pBD-1 Expression in den Infizierten Proben weniger supprimiert oder vielleicht teilweise durch einen anderen unbekanntem Mediator stimuliert wurde. Weitere Stimulanzen außer IL-1 sind für hBD-2 oder pBD-1 nicht bekannt <sup>114</sup>.

IFN- $\gamma$  spielt eine wichtige Rolle in der viralen und bakteriellen Infektion sowie der Tumorbilogie <sup>115</sup>. Produziert wird IFN- $\gamma$  von einer Reihe von Immunzellen unter anderem T-Helferzellen vom Typ 1 Lymphozyten, zytotoxische Lymphozyten, B-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (Monozyten/ Makrophagen und DC) <sup>115</sup>. Eine vermehrte Induktion der hBD-2 und hBD-3 Expression durch IFN- $\gamma$  wurde in der Haut von Patienten mit Psoriasis nachgewiesen <sup>116,117</sup>. hBD-2 stimuliert wiederum seine eigene Expression über eine vermehrte Expression von IFN- $\gamma$  <sup>117</sup>. IFN- $\gamma$  wurde in dieser Arbeit vermehrt in den infizierten Wunden exprimiert. Es zeigte ein vergleichbares Profil zu pBD-1 und pBD-3. Eine direkte Induktion von pBD-1 und pBD-3 ist daher möglich.

IL-17 und IL-22 werden von Zellen des adaptiven Immunsystems unter anderem aktivierten T-Zellen und natürlichen Killer-Zellen ausgeschüttet und orchestrieren die angeborene wie adaptive Immunabwehr als Reaktion auf eine bakterielle Infektion <sup>118</sup>. Das Zytokin IL-17 induziert die Expression von  $\beta$ -Defensinen in Epithelzellen <sup>119-121</sup>. In Epithelzellen des Respirationstraktes stellte sich IL-17 vor IL-1 und IFN- $\gamma$  als stärkster Stimulator für die hBD-2 Expression dar <sup>120</sup>. In Keratinozyten der Haut wurde ebenfalls gezeigt, dass IL-17 die hBD-2 Expression stimuliert <sup>119</sup>. Wurden Keratinozyten zusammen mit IL-17 und IFN- $\gamma$  stimuliert, zeigte sich dosenabhängig eine synergistisch stärkere Induktion der Genexpression von hBD-2 und hBD-3 <sup>121</sup>. In dieser Arbeit wurde IL-17 vermehrt in den infizierten Proben nachgewiesen. An Tag 6 und Tag 8 konnten hohe Werte gemessen werden, wohingegen die IL-17 Expression an Tag 12 bereits absank. Das Expressionsprofil ähnelt IFN- $\gamma$ . Eine direkte dosisabhängige Expression von pBD-1 und pBD-3, wie in vorherigen Studien beschrieben, konnte anhand dieser Expressionsprofile von IL-17 und IFN- $\gamma$  nicht bestätigt werden.

IL-22 wurde erst kürzlich als weiterer Stimulator der  $\beta$ -Defensin Expression beschrieben <sup>49</sup>. Keratinozyten verfügen über eine besonders hohe IL-22 Rezeptordichte, die zusätzlich durch IFN- $\gamma$  stimuliert wird <sup>49</sup>. IL-22 fördert vermutlich die hBD-2 und hBD-3 Expression <sup>49</sup>. IL-22 wurde in der vorliegenden Arbeit vermehrt in den infizierten Proben gemessen. Das Expressionsprofil von IL-22 korreliert mit dem von pBD-3. Dies lässt vermuten, dass wie bereits von Wolk et al.

beschrieben ein direkter Zusammenhang zwischen der IL-22 Sekretion und der pBD-3 Expression besteht <sup>49</sup>.

IL-8 nimmt eine wichtige Rolle in der Immunmodulation der Wundheilung ein <sup>122</sup>. IL-8 wird vermehrt von Fibroblasten, Keratinozyten und Monozyten gebildet. In der Wundheilung stimuliert IL-8 die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und vermittelt die Reepithelialisierung durch Stimulation der Keratinozytenproliferation und Migration <sup>122</sup>. In der Literatur wurde insbesondere IL-8 als stärkster Induktor genannt <sup>123</sup>. Das Chemokin IL-8 wurde auch in dieser Studie am stärksten durch die Infektion mit *S. aureus* induziert und in hoher Konzentration exprimiert. Die Konzentration von IL-8 blieb über den Verlauf der Wundheilung in den *S. aureus* infizierten Wunden stark erhöht. Hingegen wurde IL-8 in den Kontrollwunden nur kurzzeitig an Tag 8 erhöht exprimiert. Eine Korrelation zur  $\beta$ -Defensin Expression kann auf Grund des ähnlichen Expressionsprofils vermutet werden. Eine durch IL-8 ausgelöste Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten konnte nicht durch einen proportionalen Anstieg der Granulozytenanzahl zur IL-8 Konzentration erklärt werden.

Die vorliegenden Untersuchungen belegen die Beobachtungen, dass durch die Gegenwart von *S. aureus* eine Vielzahl von Genen stimuliert werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen zusammengefasst, dass IL-8, IL-22, pBD-1, pBD-2, pBD-3, TLR4 und CD14 ein vergleichbares Expressionsprofil im Verlauf der Wundheilung aufweisen. Eine Verbindung dieser Faktoren wurde in der Literatur bisher nur in in vitro Studien beschrieben, jedoch bestand Uneinigkeit darüber, welche der endogenen Faktoren zu einer Stimulation der  $\beta$ -Defensine führt und welcher der Faktoren den stärksten Stimulator darstellt. Für die Zytokine IL-1, IL-17 und für IFN- $\gamma$  konnte in dieser Studie keine Korrelation mit den pBDs gefunden werden.

## 5. Ausblick und Zusammenfassung

Chronisch infizierte Wunden mit *S. aureus* stellen ein relevantes sozioökonomisches Problem dar. Die Entstehung von bakteriellen Resistenzen gegen Antibiotika führt zu einer erhöhten Dringlichkeit der Entwicklung alternativer Therapieformen. Unser Immunsystem stellt dem Menschen in Form von Host Defense Peptiden eine natürliche biologische Abwehr mit niedriger Inzidenz bakterieller Resistenzen zur Verfügung. Die Sequenz der nativen Host Defense Peptide kann deshalb als Vorlage für die Konstruktion von synthetischen Host Defense Peptiden verwendet werden. Diese sogenannten Designer Peptide zeigen eine verbesserte antimikrobielle Aktivität<sup>124-126</sup>. Die klinische Anwendung von Host Defense Peptiden steckt derzeit noch in den Kinderschuhen. Unter den wenigen vorliegenden klinischen Studien gibt es jedoch vielversprechende Ergebnisse. Die topische Anwendung des synthetischen Peptid MSI-78 beim diabetischen Fußsyndrom und bei der Impetigo zeigt eine vergleichbar gute Wirkung zu systemisch verabreichten antimikrobiellen Pharmaka und eine bemerkenswert hohe Sensibilität auf Antibiotika-resistente Bakterienstämme<sup>127</sup>. MIGENIX MX-226 ist ein weiteres synthetisch hergestelltes Peptid, dass bereits in einer Phase 3b - Studie zur erfolgreichen Behandlung und Prävention von Katheter assoziierten Infektionen eingesetzt wurde<sup>128</sup>.

$\beta$ -Defensine zeigen ein breites Wirkungsspektrum und ein hohes Potenzial für die direkte antimikrobielle Behandlung und immunmodulatorische Therapien in der Wundheilung. Dabei ist die Rolle von  $\beta$ -Defensinen in der physiologischen und pathologischen chronischen Wundheilung unzureichend bekannt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das porcine Großtiermodell ein geeignetes Wundheilungsmodell für die Untersuchung der  $\beta$ -Defensine in *S. aureus* infizierten Wunden darstellt. Alle porcinen  $\beta$ -Defensine werden in der Epidermis exprimiert und reagieren in ihren Genexpressionsprofilen auf eine Infektion mit *S. aureus*. Insbesondere pBD-2 und pBD-3 werden als Reaktion auf die Infektion signifikant erhöht exprimiert. Die Lokalisation von pBD-1 und pBD-3 verhält sich dabei analog zu ihren menschlichen Pendants. pBD-1 wurde in Gewebsmakrophagen der porcinen Haut dargestellt. Über die Funktion und Wirkung von pBD-1 in Gewebsmakrophagen ist bislang nichts bekannt. Diese

Studie könnte die Grundlage einer zielgerichteten Therapie mit synthetischen Beta-Defensinen gegen eine bakterielle Infektion und für die Behandlung von Wundheilungsstörungen darstellen.

## 6. Anhänge

### Literaturverzeichnis

1. Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321 (2008).
2. Singer, A.J. & Clark, R.A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* **341**, 738-746 (1999).
3. Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S. & Oono, T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. *J Dermatol Sci* **42**, 203-214 (2006).
4. Wertheim, H.F., *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* **5**, 751-762 (2005).
5. Noble, W.C., Valkenburg, H.A. & Wolters, C.H. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J Hyg (Lond)* **65**, 567-573 (1967).
6. Tuazon, C.U., Perez, A., Kishaba, T. & Sheagren, J.N. *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients. An increased carrier rate. *Jama* **231**, 1272 (1975).
7. Tuazon, C.U. & Sheagren, J.N. Increased rate of carriage of *Staphylococcus aureus* among narcotic addicts. *J Infect Dis* **129**, 725-727 (1974).
8. Yu, V.L., *et al.* *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. Efficacy of antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* **315**, 91-96 (1986).
9. Weinke, T., Schiller, R., Fehrenbach, F.J. & Pohle, H.D. Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **11**, 985-989 (1992).
10. Trilla, A. & Miro, J.M. Identifying high risk patients for *Staphylococcus aureus* infections: skin and soft tissue infections. *J Chemother* **7 Suppl 3**, 37-43 (1995).
11. Lee, M.H., *et al.* A postinfluenza model of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Infect Dis* **201**, 508-515 (2010).
12. Otto, M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 207-228 (2008).
13. Balaban, N., Gov, Y., Bitler, A. & Boelaert, J.R. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm on dialysis catheters and adherence to human cells. *Kidney Int* **63**, 340-345 (2003).
14. Wolcott, R.D., Rhoads, D.D. & Dowd, S.E. Biofilms and chronic wound inflammation. *J Wound Care* **17**, 333-341 (2008).
15. Schierle, C.F., De la Garza, M., Mustoe, T.A. & Galiano, R.D. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair Regen* **17**, 354-359 (2009).

16. Wilson, M.A. Skin and soft-tissue infections: impact of resistant gram-positive bacteria. *Am J Surg* **186**, 35S-41S; discussion 42S-43S, 61S-64S (2003).
17. McCaig, L.F., McDonald, L.C., Mandal, S. & Jernigan, D.B. Staphylococcus aureus-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. *Emerg Infect Dis* **12**, 1715-1723 (2006).
18. Davies, J. & Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 417-433 (2010).
19. Vinh, D.C. & Embil, J.M. Rapidly progressive soft tissue infections. *Lancet Infect Dis* **5**, 501-513 (2005).
20. Moet, G.J., Jones, R.N., Biedenbach, D.J., Stilwell, M.G. & Fritsche, T.R. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* **57**, 7-13 (2007).
21. Barber, M. & Rozwadowska-Dowzenko, M. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* **2**, 641-644 (1948).
22. Benner, E.J. & Kayser, F.H. Growing clinical significance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Lancet* **2**, 741-744 (1968).
23. Armstrong, G.L., Conn, L.A. & Pinner, R.W. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. *Jama* **281**, 61-66 (1999).
24. Goetghebeur, M., Landry, P.A., Han, D. & Vicente, C. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A public health issue with economic consequences. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **18**, 27-34 (2007).
25. Clark, N.C., Weigel, L.M., Patel, J.B. & Tenover, F.C. Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 470-472 (2005).
26. Hancock, R.E. & Scott, M.G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8856-8861 (2000).
27. Hancock, R.E. Peptide antibiotics. *Lancet* **349**, 418-422 (1997).
28. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395 (2002).
29. Hancock, R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* **1**, 156-164 (2001).
30. Steinstraesser, L., Oezdogan, Y., Wang, S.C. & Steinau, H.U. Host defense peptides in burns. *Burns* **30**, 619-627 (2004).
31. Brahmachary, M., et al. ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Res* **32**, D586-589 (2004).
32. Seshadri Sundararajan, V., et al. DAMPD: a manually curated antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Res* **40**, D1108-1112 (2012).
33. Thomas, S., Karnik, S., Barai, R.S., Jayaraman, V.K. & Idicula-Thomas, S. CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res* **38**, D774-780 (2010).
34. Wang, Z. & Wang, G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res* **32**, D590-592 (2004).
35. Andreu, D. & Rivas, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* **47**, 415-433 (1998).

36. van 't Hof, W., Veerman, E.C., Helmerhorst, E.J. & Amerongen, A.V. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* **382**, 597-619 (2001).
37. Koczulla, A.R. & Bals, R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs* **63**, 389-406 (2003).
38. Lehrer, R.I., *et al.* Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest* **84**, 553-561 (1989).
39. Ganz, T., Oren, A. & Lehrer, R.I. Defensins: microbicidal and cytotoxic peptides of mammalian host defense cells. *Med Microbiol Immunol* **181**, 99-105 (1992).
40. Lehrer, R.I. & Ganz, T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* **14**, 96-102 (2002).
41. Sang, Y., Patil, A.A., Zhang, G., Ross, C.R. & Blecha, F. Bioinformatic and expression analysis of novel porcine beta-defensins. *Mamm Genome* **17**, 332-339 (2006).
42. Bensch, K.W., Raida, M., Magert, H.J., Schulz-Knappe, P. & Forssmann, W.G. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* **368**, 331-335 (1995).
43. Duits, L.A., Ravensbergen, B., Rademaker, M., Hiemstra, P.S. & Nibbering, P.H. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* **106**, 517-525 (2002).
44. Goldman, M.J., *et al.* Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**, 553-560 (1997).
45. Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J.M. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**, 861 (1997).
46. Braff, M.H., Bardan, A., Nizet, V. & Gallo, R.L. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* **125**, 9-13 (2005).
47. Sorensen, O.E., *et al.* Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* **174**, 4870-4879 (2005).
48. Liu, L., Roberts, A.A. & Ganz, T. By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J Immunol* **170**, 575-580 (2003).
49. Wolk, K., *et al.* IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* **21**, 241-254 (2004).
50. Ong, P.Y., *et al.* Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* **347**, 1151-1160 (2002).
51. Milner, S.M. & Ortega, M.R. Reduced antimicrobial peptide expression in human burn wounds. *Burns* **25**, 411-413 (1999).
52. Singh, P.K., *et al.* Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 14961-14966 (1998).
53. Yang, D., *et al.* Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**, 525-528 (1999).
54. Garcia, J.R., *et al.* Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* **306**, 257-264 (2001).
55. Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J.M. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* **276**, 5707-5713 (2001).

56. Sawamura, D., *et al.* Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection. *Gene Ther* **12**, 857-861 (2005).
57. Miller, L.S., *et al.* TGF- $\alpha$  regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol* **174**, 6137-6143 (2005).
58. Kisich, K.O., *et al.* The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on beta-defensin 3. *J Invest Dermatol* **127**, 2368-2380 (2007).
59. Garcia, J.R., *et al.* Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J* **15**, 1819-1821 (2001).
60. Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Wehkamp, K., Schwichtenberg, L. & Schroder, J.M. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* **123**, 522-529 (2004).
61. Steinstraesser, L., *et al.* Host defense peptides in wound healing. *Mol Med* **14**, 528-537 (2008).
62. Lee, S.H. & Baek, D.H. Antibacterial and neutralizing effect of human beta-defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. *J Endod* **38**, 351-356 (2012).
63. Supp, D.M., Gardner, J., Klingenberg, J.M. & Neely, A.N. Antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* does not impact sensitivity to human beta defensin 4. *Burns* **35**, 949-955 (2009).
64. Tsutsumi-Ishii, Y. & Nagaoka, I. NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. *J Leukoc Biol* **71**, 154-162 (2002).
65. Krisanaprakornkit, S., Kimball, J.R. & Dale, B.A. Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF- $\kappa$ B transcription factor family. *J Immunol* **168**, 316-324 (2002).
66. Moon, S.K., *et al.* Activation of a Src-dependent Raf-MEK1/2-ERK signaling pathway is required for IL-1 $\alpha$ -induced upregulation of beta-defensin 2 in human middle ear epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1590**, 41-51 (2002).
67. Hoebe, K., Janssen, E. & Beutler, B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* **5**, 971-974 (2004).
68. Cook, D.N., Pisetsky, D.S. & Schwartz, D.A. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* **5**, 975-979 (2004).
69. Takeuchi, O., *et al.* Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**, 10-14 (2002).
70. Yang, I.A., Fong, K.M., Holgate, S.T. & Holloway, J.W. The role of Toll-like receptors and related receptors of the innate immune system in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **6**, 23-28 (2006).
71. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. & Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738 (2001).
72. Heil, F., *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529 (2004).
73. Hemmi, H., *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745 (2000).

74. Tabeta, K., *et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 3516-3521 (2004).
75. Beutler, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**, 257-263 (2004).
76. Bell, J.K., *et al.* Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **24**, 528-533 (2003).
77. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511 (2004).
78. O'Neill, L.A., Golenbock, D. & Bowie, A.G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 453-460 (2013).
79. Marcarian, H.Q. & Calhoun, M.L. Microscopic anatomy of the integument of adult swine. *Am J Vet Res* **27**, 765-772 (1966).
80. Meyer, W., Schwarz, R. & Neurand, K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Curr Probl Dermatol* **7**, 39-52 (1978).
81. Weinstein, G.D. Autoradiographic Studies on Turnover Time and Protein Synthesis in Pig Epidermis. *J Invest Dermatol* **44**, 413-419 (1965).
82. Forbes, P.D. Radiation effects in swine. I. Vascular supply of the skin and hair. USNRDL-TR-67-141. *Res Dev Tech Rep*, 1-18 (1967).
83. Meyer, W., Neurand, K. & Radke, B. Collagen fibre arrangement in the skin of the pig. *J Anat* **134**, 139-148 (1982).
84. Sullivan, T.P., Eaglstein, W.H., Davis, S.C. & Mertz, P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* **9**, 66-76 (2001).
85. Deans, K.J., Haley, M., Natanson, C., Eichacker, P.Q. & Minneci, P.C. Novel therapies for sepsis: a review. *J Trauma* **58**, 867-874 (2005).
86. Birchler, T., *et al.* Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol* **31**, 3131-3137 (2001).
87. Hertz, C.J., *et al.* Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol* **171**, 6820-6826 (2003).
88. Wang, X., *et al.* Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2. *Faseb J* **17**, 1727-1729 (2003).
89. Zarembek, K.A. & Godowski, P.J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* **168**, 554-561 (2002).
90. Jia, H.P., *et al.* Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene* **263**, 211-218 (2001).
91. Soruri, A., Grigat, J., Forssmann, U., Riggert, J. & Zwirner, J. beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *Eur J Immunol* **37**, 2474-2486 (2007).
92. Dow, G., Browne, A. & Sibbald, R.G. Infection in chronic wounds: controversies in diagnosis and treatment. *Ostomy Wound Manage* **45**, 23-27, 29-40; quiz 41-22 (1999).
93. Ommori, R., *et al.* Selective induction of antimicrobial peptides from keratinocytes by staphylococcal bacteria. *Microb Pathog* **56**, 35-39 (2013).

94. Midorikawa, K., *et al.* Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect Immun* **71**, 3730-3739 (2003).
95. Dinulos, J.G., Mentele, L., Fredericks, L.P., Dale, B.A. & Darmstadt, G.L. Keratinocyte expression of human beta defensin 2 following bacterial infection: role in cutaneous host defense. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 161-166 (2003).
96. Oren, A., Ganz, T., Liu, L. & Meerloo, T. In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol* **74**, 180-182 (2003).
97. Ali, R.S., *et al.* Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* **117**, 106-111 (2001).
98. Poindexter, B.J., Bhat, S., Buja, L.M., Bick, R.J. & Milner, S.M. Localization of antimicrobial peptides in normal and burned skin. *Burns* **32**, 402-407 (2006).
99. Mempel, M., *et al.* Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J Invest Dermatol* **121**, 1389-1396 (2003).
100. Kawai, K., *et al.* Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* **30**, 185-194 (2002).
101. Menzies, B.E. & Kenoyer, A. Signal transduction and nuclear responses in Staphylococcus aureus-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes. *Infect Immun* **74**, 6847-6854 (2006).
102. Song, P.I., *et al.* Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol* **119**, 424-432 (2002).
103. Pivarcsi, A., *et al.* Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **296**, 120-124 (2004).
104. Pivarcsi, A., *et al.* Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* **15**, 721-730 (2003).
105. Nagy, I., *et al.* Distinct strains of Propionibacterium acnes induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol* **124**, 931-938 (2005).
106. Kollisch, G., *et al.* Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology* **114**, 531-541 (2005).
107. Baker, B.S., Ovigne, J.M., Powles, A.V., Corcoran, S. & Fry, L. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* **148**, 670-679 (2003).
108. Dziarski, R. & Gupta, D. Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria and activation of chemokine genes. *J Endotoxin Res* **6**, 401-405 (2000).
109. Kawasaki, T., *et al.* Impaired ability of burn patient neutrophils to stimulate beta-defensin production by keratinocytes. *Immunol Cell Biol* **90**, 796-801 (2012).
110. Chen, X., *et al.* Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *Eur J Immunol* **37**, 434-444 (2007).

111. Niyonsaba, F., Iwabuchi, K., Matsuda, H., Ogawa, H. & Nagaoka, I. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int Immunol* **14**, 421-426 (2002).
112. Ferrante, C.J. & Leibovich, S.J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Advances in wound care* **1**, 10-16 (2012).
113. Mahdavian Delavary, B., van der Veer, W.M., van Egmond, M., Niessen, F.B. & Beelen, R.H. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* **216**, 753-762 (2011).
114. Sorensen, O.E., *et al.* Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* **170**, 5583-5589 (2003).
115. Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. & Hume, D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**, 163-189 (2004).
116. Albanesi, C., *et al.* IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol* **179**, 984-992 (2007).
117. Kanda, N., *et al.* Human beta-defensin-2 enhances IFN-gamma and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells. *J Leukoc Biol* **89**, 935-944 (2011).
118. Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K. & Sabat, R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* **168**, 5397-5402 (2002).
119. Eyerich, K., *et al.* IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response. *J Allergy Clin Immunol* **123**, 59-66 e54 (2009).
120. Kao, C.Y., *et al.* IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J Immunol* **173**, 3482-3491 (2004).
121. Simanski, M., *et al.* IL-17A and IFN-gamma synergistically induce RNase 7 expression via STAT3 in primary keratinocytes. *PLoS One* **8**, e59531 (2013).
122. Rennekampff, H.O., *et al.* Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J Surg Res* **93**, 41-54 (2000).
123. Wang, Z.M., Liu, C. & Dziarski, R. Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. *J Biol Chem* **275**, 20260-20267 (2000).
124. Ingham, A.B. & Moore, R.J. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnol Appl Biochem* **47**, 1-9 (2007).
125. Hilpert, K., *et al.* Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides. *Chem Biol* **13**, 1101-1107 (2006).
126. Cherkasov, A., *et al.* Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs. *ACS Chem Biol* **4**, 65-74 (2009).

127. Lipsky, B.A., Holroyd, K.J. & Zasloff, M. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clin Infect Dis* **47**, 1537-1545 (2008).
128. Hancock, R.E. & Sahl, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* **24**, 1551-1557 (2006).

## Verzeichnis der Abbildungen

**Abbildung 1: TLRs und entsprechende Liganden.** Extrazelluläre TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10) werden vor allem von Bakterien, Parasiten und Pilzen aktiviert. Intrazellulär gelegene TLRs (TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9) erkennen hingegen Viren ..... **Seite 19**

**Abbildung 2: Toll-like Rezeptoren erkennen unter anderem mikrobielle Produkte und lösen eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Genen aus.** Der wichtigste Signalweg führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Nuclear Factor- $\kappa$ B und der Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinasen p38 und JNK. Diese Signalkaskaden erhöhen die Expression von proinflammatorischen Genen. Der zweite Weg führt über die Stimulation von TLR3 und TLR4 zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und anderen Transkriptionsfaktor wie Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3). Dieser Signalweg induziert die Expression von antiviralen Genen wie Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ )<sup>78</sup>. ..... **Seite 21**

**Abbildung 3: Übersicht des Tierexperiments.** Der Versuchszeitraum betrug 12 Tage. An Tag 0 wurde die Wundsetzung durchgeführt und die Wunden des Studientiers mit *S. aureus* infiziert. An jedem zweiten Tag erfolgte die Blutprobenentnahme. An Tag 0, 6, 8 und 12, hier rot markiert, erfolgte eine Tieroperation in Vollnarkose, in der Flüssigkeits- und Gewebeproben zur weiteren Untersuchung unter sterilen Bedingungen entnommen wurden. Der Tierversuch wurde an Tag 12 beendet ..... **Seite 29**

**Abbildung 4: Weibliches Göttinger Minischwein mit zwölf Untersuchungsarealen an Tag 0.** Insgesamt wurden zwei Tiere untersucht (n=2). Die Wunden des Studientiers wurden mit *S. aureus* infiziert. Zu dem Studientier diente ein Tier desselben Wurfs als Kontrolle (Kontrolltier) ..... **Seite 30**

**Abbildung 5: Untersuchungsareal 1,5 x 1,5cm große Wunde an Tag 0**.....**Seite 32**

**Abbildung 6: Eine *S. aureus* Infektion wurde ausschließlich in den Proben des Studentiers festgestellt.** In allen Proben wurden *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Enterococcus faecium* nachgewiesen. Student t-Test, zweiseitig,  $n=4$ ,  $p_{\text{Tag } 6}=0,24$ ,  $p_{\text{Tag } 8}=0,79$ ,  $p_{\text{Tag } 12}=0,97$  ..... **Seite 41**

**Abbildung 7: Verzögerte Wundheilung in den infizierten Wunden.** Die Wunden wurden an Tag 0, 6, 8 und 12 vermessen. Initial vergrößerten sich die Wunden des Studentiers bevor sich die Wundflächen verkleinerten. Die Wunden des Kontrolltiers heilten im Vergleich zu denen des Studentiers besser. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p<0,05$ ,  $n=12$ ,  $p_{\text{Tag } 0}=0,1$ ,  $p_{\text{Tag } 6}=0,32$ ,  $p_{\text{Tag } 8}=0,36$ ,  $p_{\text{Tag } 12}=0,032$  ..... **Seite 42**

**Abbildung 8: Die Reepithelialisierung der Wundflächen war im Studentier verzögert.** In der mikroskopischen Untersuchung der Querschnittsbiopsien an Tag 6, 8 und 12 wurde eine verzögerte Wundheilung im Studentier beobachtet. Die Wunden im Kontrolltier heilten bereits an Tag 12 ab. Student t-Test, zweiseitig,  $n=4$ ,  $p_{\text{Tag } 6}=0,11$ ,  $p_{\text{Tag } 8}=0,55$ ,  $p_{\text{Tag } 12}=0,34$  ..... **Seite 43**

**Abbildung 9: Erhöhte Wundinfiltration der neutrophilen Granulozyten im Studentier.** (A, B) Immunhistochemisch wurden an Tag 6 in den nicht-infizierten Wunden nur vereinzelt neutrophile Granulozyten (grün) nachgewiesen. (C, D) In den *S. aureus* infizierten Wunden kam es hingegen zu einer massiven Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Die Zellkerne wurden zur besseren Übersicht mit DAPI (blau) gefärbt. (E) Insbesondere an Tag 6 zeigte sich eine signifikant höhere Granulozyteninfiltration. Im Verlauf der Wundheilung sank die Anzahl ab. An Tag 12 wurde in der quantitativen Analyse eine signifikant erhöhte Anzahl der neutrophilen Granulozyten festgestellt. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ ,  $n=4$ ,  $p_{\text{Tag } 6}<0,001$ ,  $p_{\text{Tag } 8}=0,85$ ,  $p_{\text{Tag } 12}=0,02$  ..... **Seite 44**

**Abbildung 10: Erhöhte Wundinfiltration der Makrophagen in den infizierten Proben.** (A, B) Immunhistochemisch wurden an Tag 6 in den nicht-infizierten Wunden nur vereinzelt Makrophagen (braun) nachgewiesen. (C, D) In den *S. aureus* infizierten Wunden kam es hingegen zu einer massiven Infiltration von Makrophagen. Die Zellkerne wurden zur besseren Übersicht mit DAPI (blau)

gefärbt. (E) An Tag 6 und Tag 8 wurde eine signifikant erhöhte Makrophageninfiltration in den infizierten Wunden festgestellt. An Tag 12 sank die Anzahl der Makrophagen in den infizierten Wunden ab, hingegen stieg die Makrophagenanzahl in den Kontrollwunden an. In der quantitativen Analyse wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Proben der beiden Tiere bestätigt. Student t-Test, zweiseitig, \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6}} < 0,001$ ,  $p_{\text{Tag 8}} < 0,001$ ,  $p_{\text{Tag 12}} = 0,001$ ..... **Seite 45**

**Abbildung 11: Genexpression von TLR2, TLR4 und CD14.** TLR2 wurde in beiden Tieren vor allem an Tag 6 erhöht exprimiert und sank dann im Verlauf der Wundheilung ab. TLR4 wurde im Vergleich zu TLR2 und CD14 besonders stark im Studientier exprimiert. Die Expression von TLR4 stieg im Studientier bis Tag 8 an und sank daraufhin wieder ab. CD14 wurde schwach erhöht exprimiert. Alle angegebenen Werte wurden auf Tag 0 normiert. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 TLR2}} < 0,3$ ,  $p_{\text{Tag 8 TLR2}} < 0,47$ ,  $p_{\text{Tag 12 TLR2}} = 0,24$ ,  $p_{\text{Tag 6 TLR4}} < 0,06$ ,  $p_{\text{Tag 8 TLR4}} < 0,03$ ,  $p_{\text{Tag 12 TLR4}} < 0,001$ ,  $p_{\text{Tag 6 CD14}} < 0,07$ ,  $p_{\text{Tag 8 CD14}} < 0,05$ ,  $p_{\text{Tag 12 CD14}} = 0,73$ ..... **Seite 46**

**Abbildung 12: Genexpression von pBD-1, pBD-2 und pBD-4 und Lokalisation pBD-1.** (A) pBD-1, -2 und -4 wurden bis auf pBD-2 in den Wunden des Studientiers vermindert exprimiert. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 pBD-1}} < 0,28$ ,  $p_{\text{Tag 8 pBD-1}} < 0,75$ ,  $p_{\text{Tag 12 pBD-1}} = 0,83$ ,  $p_{\text{Tag 6 pBD-2}} < 0,006$ ,  $p_{\text{Tag 8 pBD-2}} = 0,01$ ,  $p_{\text{Tag 12 pBD-2}} = 0,006$ ,  $p_{\text{Tag 6 pBD-4}} = 0,04$ ,  $p_{\text{Tag 8 pBD-4}} = 0,75$ ,  $p_{\text{Tag 12 pBD-4}} = 0,18$  (B-E) pBD-1 (grün) wurde vor allem in Keratinozyten nachgewiesen und (F, G) in mehrkernigen Riesenzellen, vermutlich Gewebsmakrophagen. Die Zellkerne wurden zur besseren Übersicht mit DAPI (blau) gefärbt..... **Seite 48**

**Abbildung 13: Genexpression von pBD-3 und pBD-129 und Lokalisation pBD-3.** (A, B) In den Wunden des Studientiers wurde pBD-3 an Tag 6, (C, D) Tag 8 und Tag 12 (hier nicht abgebildet) vermehrt exprimiert. pBD-3 (grün) wurde in Keratinozyten der Epidermis nachgewiesen. Die Zellkerne wurden zur besseren Übersicht mit DAPI (blau) gefärbt. (E) pBD-3 wurde in der Kontrolle supprimiert und im Studientier vermehrt exprimiert. pBD-3 wurde vor allem an Tag 8 in den

infizierten Wunden exprimiert. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 pBD-3}} = 0,04$ ,  $p_{\text{Tag 8 pBD-3}} = 0,75$ ,  $p_{\text{Tag 12 pBD-3}} = 0,18$  (F) pBD-129 wurde im Verlauf der Wundheilung in beiden Tieren vermindert nachgewiesen. Dabei wurde pBD-129 in den infizierten Wunden stärker supprimiert als in den nicht-infizierten Wunden. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 pBD-129}} = 0,06$   $p_{\text{Tag 8 pBD-129}} = 0,004$ ,  $p_{\text{Tag 12 pBD-129}} = 0,04$ ..... **Seite 49**

**Abbildung 14: Genexpression der Interleukine-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -8, -17, -22 und IFN- $\gamma$**

(A) Das Interleukin IL-1 $\alpha$  stieg in beiden Tieren postoperativ deutlich an. IL-1 $\beta$  mRNA wurde postoperativ verstärkt im Kontrolltier, nicht jedoch in den infizierten Proben, exprimiert. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 IL-1}\alpha} = 0,07$   $p_{\text{Tag 8 IL-1}\alpha} = 0,62$ ,  $p_{\text{Tag 12 IL-1}\alpha} = 0,03$ ,  $p_{\text{Tag 6 IL-1}\beta} = 0,11$   $p_{\text{Tag 8 IL-1}\beta} = 0,53$ ,  $p_{\text{Tag 12 IL-1}\beta} = 0,76$

(B) Ein Genexpressionsanstieg von IL-17 wurde nur in den infizierten Proben nachgewiesen. Die IL-22 Expression sank in beiden Tieren postoperativ ab. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 IL-17}} = 0,89$   $p_{\text{Tag 8 IL-17}} = 0,04$ ,  $p_{\text{Tag 12 IL-17}} = 0,79$ ,  $p_{\text{Tag 6 IL-22}} = 0,3$   $p_{\text{Tag 8 IL-22}} = 0,02$ ,  $p_{\text{Tag 12 IL-22}} = 0,81$

(C) IL-8 wurde in den infizierten Proben postoperativ gesteigert exprimiert. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 IL-8}} = 0,002$   $p_{\text{Tag 8 IL-8}} = 0,09$ ,  $p_{\text{Tag 12 IL-8}} = 0,02$  (D) Die IFN- $\gamma$  Expression stieg im Verlauf der Wundheilung in beiden Tieren an. Das Genexpressionsprofil lag im Studientier über dem des Kontrolltieres. Student t-Test, zweiseitig, \*  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ,  $p_{\text{Tag 6 IFN-}\gamma} = 0,01$   $p_{\text{Tag 8 IFN-}\gamma} = 0,27$ ,  $p_{\text{Tag 12 IFN-}\gamma} = 0,26$  ..... **Seite 51**

## Verzeichnis der Tabellen

**Tabelle 1: Antibakterielles, antifungales und antivirales Spektrum der humanen  $\beta$ -Defensine 1-4<sup>60-63</sup>.** hBD-1 wirkt antibakteriell. hBD-2 und hBD-3 agieren zusätzlich gegen Pilze und Viren. hBD-4 hat ein antibakterielles wie antifungales Wirkspektrum. hBD-1 bis -4 wirken chemotaktisch auf das angeborene und adaptive Immunsystem. (+ = aktiv gegen, ? = unbekannte Wirkung)..... **Seite 18**

**Tabelle 2: Nomenklatur der  $\beta$ -Defensine im Mensch und im Schwein.** hBD-1 entspricht dem pBD-2 sowie hBD-2 dem pBD-1 entspricht. .... **Seite 19**

**Tabelle 3: Gruppierung für Probenentnahme der jeweiligen Untersuchungsareale.** Die Wunden wurden in Gruppen eingeteilt, um das durch die Gewebeprobe entstandene Trauma gering zu halten. Zusätzlich wurden Blut- und Wundflüssigkeitsproben entnommen sowie die Wunden makroskopisch beurteilt und die Größe der Wundareale dokumentiert. .... **Seite 30**

## Liste der Veröffentlichungen und Vorträge

### Veröffentlichungen

1. Steinstraesser L, **Kraneburg UM**, Hirsch T, Kesting M, Steinau HU, Jacobsen F, Al-Benna S. Host Defense Peptides as effector molecules of the innate immune response: a sledgehammer for drug resistance? *Int J Mol Sci.* 2009 Sep 9;10(9):3951-70.
2. Steinstraesser L, **Kraneburg U**, Jacobsen F, Al-Benna S. Host Defense Peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology.* 2011 Mar;216(3):322-33.
3. **Kraneburg U**. Congress memorandum: day of teaching 2010 at the University Heidelberg, *GMS Z Med Ausbild.* 2011;28(1)
4. **Kraneburg UM**, Rinsky LA, Chrisholm K and Khosla RK Emergency surgical treatment of an ulcerative and hemorrhagic congenital/infantile fibrosarcoma of the lower leg: Case report and literature review. *J Pediatr Orthop B.* 2013 May;22(3):228-32.
5. Suero EM, Citak M, **Kraneburg UM**, Pearle AD, Kendoff DO Robotic-assisted unicompartmental knee arthroplasty in a patient with combined medial compartment arthritis and subchondral defect of the medial femoral condyle. *Knee* 2012 Oct19(5):724-7.
6. Karagianni M, **Kraneburg U**, Klüter H, Bieback K, Papadopulos N. Fetttransplantation und supportive Anreicherung mit autologen stromalen Fettvorläuferzellen - aktueller Stand und zukünftige Anwendungsmöglichkeiten. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie. Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2013 Apr;45(2):93-8.
7. Echo A, Otake LR, Mehrara BJ, **Kraneburg UM**, Agrawal N, Da Lio AL, Shaw WW, Lee GK. Surgical management of silicone mastitis: case series and review of the literature. *Aesthetic Plast Surg.* 2013 Aug;37(4):738-45.
8. **Kraneburg UM**, Nga VD, Ting EY, Hui FK, Lwin S, Teo C, Chou N, Yeo TT. Intracranial pial arteriovenous fistula in infancy: a case report and literature review. *Childs Nerv Syst.* 2013 Jul 2.

## Kongressvorträge

1. **Kraneburg UM**, Rozbruch SR, Fragoman A. Ilizarov vs. Tailor Frame - micromotions? Limb lengthening and Reconstruction-ASAMI North American Meeting 2009
2. **Kraneburg UM**, Jacobsen F, Thiele I, Rittig A, Steinau HU, Steinstraesser L: Viktor von Bruns Preis: Immunmodulating analysis of Host Defense Peptides in infected porcine woundhealing-model, 14. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung 2011
3. **Kraneburg UM**, Jacobsen F, Thiele I, Rittig A, Steinau HU, Steinstraesser L Host Defense Peptides in Infected Porcine Wound-healing Model, 3rd European Plastic Surgery Research Council, Hamburg 2011
4. Manzoni D., Schütz G., Braun A., **Kraneburg U**, Grotemeyer D. Effekte der lokalen hyperbaren Sauerstofftherapie auf die qualitative und quantitative bakterielle Besiedlung von chronischen Wunden, Dreiländertagung Linz, 2013
5. **Kraneburg U**, Uhlig S, Elvers-Hornung S, Klüter H, Bieback K. Adipose Stromal Cells express functional Toll-like Receptors 3 and 4 but cultured in human serum compared to FBS alters cytokine profile, DGTI Dresden, 2014
6. **Kraneburg U**, Uhlig S, Elvers-Hornung S, Klüter H, Bieback K. Culture in human serum affects TLR-mediated adipokine release of human adipose tissue-derived stromal cells. EPLRC Hamburg, 2015

## **Danksagung**

**Herrn Professor Dr. Lars Steinsträßer** für seine unentwegte wissenschaftliche und persönliche Motivation, Unterstützung, Förderung und Betreuung dieser Arbeit.

**Herrn Dr. Frank Jacobsen** für die freundschaftliche Unterstützung bei der praktischen Arbeit, der theoretischen Planung und Durchführung dieser Arbeit.

**Frau Andrea Rittig**, sowie der gesamten Arbeitsgruppe für die unentwegte Hilfestellung, Bereitschaft zur kritischen Diskussion und eine in jeder Hinsicht bereichernde Zusammenarbeit.

**Herrn Professor Dr. Harald Klüter** für die Förderung und Unterstützung zur wissenschaftlichen Arbeit und persönlichen Weiterentwicklung.

## Lebenslauf

### Ursula Marie Kraneburg

\* 08. 11.1985 in Münster, Deutschland

---

#### WERDEGANG

Juni 2005	Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife Bischöfliches Mädchengymnasium Marienschule Münster
2006 bis 2008	Forschungsassistentin Hospital for Special Surgery, NYC
2008 bis 2014	Studium der Humanmedizin an der Universität Witten/Herdecke
2011 bis 2014	Master of Science of Translational Medical Research an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
2015 bis heute	Assistenzärztin Klinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie MRI Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

#### STIPENDIEN

2012 bis 2014	Studienstiftung des Deutschen Volkes Studienförderung Medizin
2011 bis 2014	Stiftung Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Studienförderung MSc TMR