

Philipps Universität Marburg

Dissertation

Der Insekten-Metalloprotease-Inhibitor IMPI zur Therapie von Wundinfektionen

Präklinische Untersuchungen und Formulierungsdesign

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
dem Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

Hochschulkenziffer: 1180

vorgelegt von:

Dipl. Ing. (FH) Michaela Eisenhardt
aus Gießen

Marburg, 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen
Zweitgutachter: Prof. Dr. Frank Runkel
Einreichung: 27.04.2016
Prüfung: 08.06.2016

Abstract

Chronic wound infections are a worldwide occurring health care problem with massive consequences for the patient and high costs for the health care system. Due to the frequent antibiotic resistance of pathogenic bacteria the therapeutic options are limited and not rarely resulting in a sepsis with high amputation and mortality rate. The *Pseudomonas aeruginosa* is one of the commonest and most important germs in chronic wounds with high antibiotic resistance. Its key virulence factor, the M4-Metalloproteinase (MP) Pseudolysin (PE), takes part in the intoxication, the invasion and the distribution of the pathogen. The inhibition of this virulence factor is a novel promising therapeutic approach, but most of the MP-inhibitors are unspecific and thus unsuitable for the pharmaceutical use. The Insect-Metalloproteinase-Inhibitor (IMPI), however, was proved to be an efficient and highly specific inhibitor against bacterial M4-MP, like PE.

The focus of this thesis research was on the one hand the pharmacological verification of IMPI and on the other hand the development of a suitable formulation for its application in wound infections. Therefore, for the first time the therapeutic potential of IMPI against infections with *P. aeruginosa* was investigated on molecular, cellular and histological level.

The inhibitory capacity of IMPI-GST was initially tested against pure PE and the secretome of wound isolated *P. aeruginosa* in proteolytic activity assays. In comparison to the reference inhibitor Phosphoramidon (PA), IMPI-GST was more efficient and showed a narrower active window.

In this thesis the *P. aeruginosa* secretome was studied on skin cells for the first time. A strong decrease in the cell viability was measured due to an increasing secretome concentration and treatment with 10% secretome resulted in complete cell death. This was mainly caused by the detachment of cells from the surface and thus the occurrence of Anoikis. Immunohistochemical stainings of secretome-treated cells showed retraction of F-Aktin and morphological changes in the cytoskeleton. Therefore, it was hypothesized that the main reasons are the destruction of cell contacts, like Tight Junctions, Adherence Junctions and Focal Adhesions, the degradation of proteins of the extracellular matrix as well as the influence in the MAPK pathway. Although the cell based examinations suggested a multifactorial virulence of the secretome PE seems to be mainly responsible.

Subsequently, the potential pharmaceutical effect of IMPI-GST was examined *in vitro* and *ex vivo*. IMPI-GST showed no cytotoxic impact and prevented the secretome-related cell detachment, which resulted in a significant increase in viability of more than 60%.

The migration of keratinocytes is an essential process in wound healing. The *in vitro* cell migration was strongly reduced in accordance to an increased applied secretome concentration. IMPI-GST enhanced the migration and completely prevented the secretome-induced impact on the keratinocytes.

Finally, the observed *in vitro* results were tested in an *ex vivo* porcine skin wound healing model. Therein the healing diminishing, necrotic and cell destructing effects of the secretome were confirmed. Also, the positive results of the IMPI-GST treatment were proved. The tissue destruction, induced by the secretome, was prevented due to a simultaneous application of IMPI-GST and a clear improvement in wound healing was observed based on a formed wound tongue. The second part of the thesis focused on the formulation development for the application of IMPI-GST in chronic wound infections. Therefore, a thermosensitive hydrogel with the main gelling agent Poloxamer 407 was designed. The suitable Poloxamers and additives as well as their appropriate concentrations were investigated in relation to their rheological parameters, elastic and viscous modulus, in oscillatory measurements. This led to a final gel composition of 16% P407, 15% P188 and 3% Glycerin. Germ-contamination-tests approved the use of the preservative combination of 0.2% potassium sorbate with 0.1% citric acid. Final activity assays demonstrated no interference in the inhibitory activity of IMPI-GST with the formulation. In Franz cell diffusion assays IMPI-GST was continuously released out of the hydrogel over a period of 10 h. Furthermore, neither the influence of IMPI-GST on the rheological characteristic of the hydrogel nor any other interaction between the formulation and the active pharmaceutical ingredient was recognized.

In conclusion, this study confirms the presumed therapeutic activity of IMPI against infections with *P. aeruginosa* on molecular, cellular and histological level. The influence of the pathogenic *P. aeruginosa* secretome on human keratinocytes and a porcine wound model was identified for the first time. An improvement in viability, morphology and migration capacity of the secretome-treated cells as well as wound healing in all *in vitro* and *ex vivo* experiments occurred by the application of IMPI-GST. For the use of this active peptide IMPI a thermosensitive hydrogel was developed.

Zusammenfassung

Chronische Wundinfektionen stellen ein weltweit auftretendes medizinisches Problem mit hoher Prävalenz, gravierenden Folgen für die betroffenen Patienten und hohen Kosten für das Gesundheitssystem dar. Aufgrund der zahlreichen Resistenzen der verursachenden Pathogenen, fehlen derzeit die therapeutischen Alternativen und nicht selten resultiert eine Sepsis mit hoher Amputations- und Mortalitätsrate. *Pseudomonas aeruginosa* ist eines der häufigsten und bedeutendsten Bakterien in chronischen Wunden mit einer hohen Antibiotikaresistenz. Sein Schlüsselvirulenzfaktor, die M4-Metalloprotease (MP) Pseudolysin (PE), ist an der Intoxikation, der Invasion und der Verteilung im Wirt beteiligt. Die Hemmung dieses Virulenzfaktors entspricht einem neuen, vielversprechenden Behandlungsansatz. Allerdings wirken die meisten MP-Inhibitoren unspezifisch und sind daher für die pharmazeutische Anwendung weniger geeignet. Der Insekten-Metalloprotease-Inhibitor (IMPI) hingegen zeigte in proteolytischen Aktivitätstests eine effiziente, spezifische Wirkung gegen bakterielle M4-MP, wie z.B. PE.

Das Ziel dieser Arbeit war auf der einen Seite, die pharmakologische Charakterisierung von IMPI und auf der anderen Seite die Entwicklung einer geeigneten Formulierung für dessen Anwendung bei infizierten Wunden. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde erstmals das Potenzial von IMPI zur Therapie von Infektionen mit *P. aeruginosa* auf molekularer, zellulärer und histologischer Ebene bestimmt. Die inhibitorische Kapazität von IMPI-GST gegen reines PE und das Sekretom, eines aus der Wunde isolierten *P. aeruginosa* Stammes, wurde in proteolytischen Aktivitätstests ermittelt. Im Vergleich zum Referenz-Inhibitor Phosphoramidon (PA) zeigte IMPI-GST eine effizientere Wirkung und ein engeres Wirkfenster.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Wirkung des *P. aeruginosa* Sekretoms auf Hautzellen untersucht. Mit steigender Sekretom-Konzentration wurde ein steiler Abfall in der Viabilität der behandelten Keratinozyten gemessen und nach Applikation von 10% Sekretom wurde ein komplettes Zellsterben festgestellt. Die Hauptursache dafür war die Ablösung der Zellen von der Oberfläche und damit das Auftreten einer Anoikis. In immunhistologischen Färbungen zeigten sich eine Abnahme im F-Aktin sowie starke morphologische Veränderungen des Zytoskeletts der mit Sekretom behandelten Keratinozyten. Aus diesen Ergebnissen und unter Berücksichtigung der Literatur wurde angenommen, dass die Zerstörung von Zellkontakten, wie Tight Junctions, Adherence Junctions und Fokalen Adhäsionskontakten, die Degradierung von Proteinen der Extrazellulären Matrix sowie der Einfluss auf den MAPK-Signalweg ursächlich für das Auftreten der Anoikis sind. Obwohl die zellbasierten Untersuchungen auf

eine multifaktorielle Virulenz des Sekretoms hinweisen, scheint PE dafür hauptverantwortlich zu sein. Die potenzielle Wirkung von IMPI-GST wurde zunächst *in vitro* und *ex vivo* ermittelt. IMPI-GST zeigte selbst keinen zytotoxischen Einfluss, verhinderte die Sekretom-bedingten Zellablösungen und führte zu einer signifikanten Steigerung der Viabilität um mehr als 60%. Die Migration von Keratinozyten ist ein essentieller Vorgang der Wundheilung und wurde *in vitro* unter Einfluss des Sekretoms ermittelt. Mit steigender Sekretom-Konzentration verminderte sich die Zellmigration stetig. IMPI-GST führte bei gleichzeitiger Applikation zu einer signifikanten Erhöhung der Migration und verhinderte die Auswirkungen des Sekretoms auf die Keratinozyten vollständig. Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen wurden *ex vivo* in einem Schweinehaut-Wundmodell überprüft. Hierbei bestätigten sich der nekrotische, zellschädigende und heilungsvermindernde Einfluss des Sekretoms sowie die Wirkung des Wirkstoffpeptids, IMPI-GST. Bei gleichzeitiger Applikation von IMPI-GST wurde der vom Sekretom induzierte Gewebeabbau zum Großteil verhindert und eine deutlich verbesserte Wundheilung anhand einer sich ausbildenden Wundzunge beobachtet.

Der Fokus des zweiten Teils dieser Arbeit lag auf der Entwicklung einer Formulierung zur Anwendung von IMPI bei Wundinfektionen. Dazu wurde ein thermosensitives Hydrogel mit dem Hauptgelbildner Poloxamer 407 designt. Die geeigneten Poloxamere und Additive wurden in Bezug auf ihre rheologischen Parameter, wie Speicher- und Verlustmodul, in oszillatorischen Messungen untersucht. Daraus ergab sich eine ideale Gelzusammensetzung aus 16% P407 mit 15% P188 sowie 3% Glycerin. Keimbelastungstests beweisen den Einsatz von 0,2% Kaliumsorbat mit 0,1% Zitronensäure als geeignete Konservierungsmittel. Abschließende Aktivitätstests mit der finalen Galenik zeigten keine Beeinträchtigung der Wirkstoff-Aktivität durch die Darreichungsform. In einem Franz-Zell-Diffusionsversuch zeigte IMPI-GST eine kontinuierliche Freisetzung aus dem Hydrogel, über einen Zeitraum von 10 h und IMPI-GST beeinflusste die rheologische Charakteristik des Gels nicht signifikant.

Die vorliegende Arbeit bestätigt das Wirkpotential von IMPI-GST zur Therapie von Infektionen mit *P. aeruginosa* auf molekularer, zellulärer und histologischer Ebene. Es wurde erstmals der schädigende Einfluss eines pathogenen *P. aeruginosa* Sekretoms auf humanen Keratinozyten und einem Schweinehaut-Wundmodell identifiziert. Die Behandlung mit IMPI-GST verbesserte systematisch in allen *in vitro* und *ex vivo* Experimenten deutlich die Viabilität, die Morphologie und die Migrationsfähigkeit sowie insgesamt die Wundheilung. Für die Applikation von IMPI-GST erwies sich das entwickelte thermosensitive Hydrogel als geeignet.

Publikationsliste

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Veröffentlichung in Peer-Reviewed Journals:

- M. Eisenhardt, D. Dobler D, P. Schlupp, T. Schmidts, M. Salzig, A. Vilcinskas, D. Salzig, P. Czermak, M. Keusgen, F. Runkel. Development of an insect metalloproteinase inhibitor drug carrier system for application in chronic wound infections. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2015. 67. 1481-1491 [1].

Konferenz-Poster:

- M. Eisenhardt, D. Dobler, T. Schmidts, F. Runkel. Thermosensitive hydrogels as carriersystems for insect-based proteins in chronic wound management. 17. Jahrestagung der Gesellschaft für Dermopharmaka, Mainz 2013.
- M. Eisenhardt, T. Schmidts, P. Schlupp, F. Runkel: IMPI – a novel therapeutic for chronic wound infections, Antimicrobial Peptides - Gordon Research Conference, Lucca (Barga), Italy, 2015.

Konferenz-Beiträge:

- M. Eisenhardt: Insect Metalloproteinase Inhibitor (IMPI): A novel therapeutic in chronic wound infections with *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Peptides (Gordon Research Seminar) – Mechanism, Function and Application, Lucca (Barga), Italy, 2015.

Geplante Veröffentlichung:

- M. Eisenhardt, P. Schlupp, F. Höfer, T. Schmidts, D. Hoffmann, A. Pöppel, A. Vilcinskas, F. Runkel.: IMPI-GST prevents the toxic impact of *Pseudomonas aeruginosa* secretome on skin cells and a porcine wound model.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AcN	Acetonitril
AMP	Antimikrobielles Peptid
AprA	Alkaline Protease
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
CASO	Casein-Soja-Pepton
Cdc42	Cell Division Control protein 42
CGF	Zementwachstumsfaktor
CS	Controlled Stress
DEJ	Dermoepidermale Junctionzone
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTPA	Diethylene triamine Penta Acetic Acid
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)tetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
Exoenzym	Exo
EZM	Extrazelluläre Matrix
F-Aktin	filamentöses Aktin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
Fn	Fibronektin
g	Erdbeschleunigung
GJ	Gap Junctions
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes-Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hyaluronic Acid
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IMPI	Insect-Metalloproteinase-inhibitor
IGF	Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren
INF	Interferon
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IL	Interleukin
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LVE	Linear viskoelastisch
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase

Mind.	mindestens
MMP	Matrix Metalloproteasen
MP	Metalloprotease
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OD	Optische Dichte
P407 / 188	Poloxamer 407 / 188
PA	Phosphoramidon
PAR-2	Proteinase aktivierender Rezeptor 2
PBS	Phosphat gepufferte isotonische Salzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEG	Polyethylenglycol
PEO	Polyoxyethylen
pI	Isoelektrischer Punkt
PKC	Proteinkinase C
PPO	Polyoxypropylen
P/S	Penicillin/Streptomycin
QS	Quorum Sensing
R ²	Korrelationskoeffizient, Bestimmtheitsmaß
Rac	Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrat
Ras	Rat sarcoma
RFU	Relative Fluoreszenz Units
Rho	Ras-Homologe
rpm	Rotationen pro Minute
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEK	Sekretom
T3SS	Typ 3 Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung
TEWL	Transepidermal Water loss
TGF	Tissue Growth Factor
TIL	Trypsin ähnlicher Inhibitor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TJ	Tight Junctions
TNF	Tumornekrosefaktor
uPAR	Urokinase-type Plasminogen aktivated Rezeptor
% v/v	Volumenprozent
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren
Vn	Vitronektin
w/w	Gewichtsprozent
WST	Water-soluble Tetrazolium
z.B.	zum Beispiel
ZO	Zonula occludens

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	II
Zusammenfassung	IV
Publikationsliste	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Inhaltsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1. Aufbau und Funktion der Haut.....	3
2.1.1 Struktur der Epidermis	4
2.1.2 Dermis und Subkutis	8
2.2. Die Wundheilung	9
2.2.1 Akute Wundheilung	9
2.2.2 Migration der Keratinozyten	13
2.2.3 Chronische Wunden	16
2.2.4 Wundinfektionen.....	17
2.3. Infektionen mit <i>P. aeruginosa</i>	18
2.3.1 Virulenzfaktoren von <i>P. aeruginosa</i>	19
2.3.2 <i>P. aeruginosa</i> Elastase (PE).....	21
2.4. PE-Inhibitoren	25
2.4.1 Der Insekten-Metalloprotease-Inhibitor (IMPI).....	27
2.5. Therapie von Wunden	28
2.5.1 Anforderungen an eine Wundformulierung	30
2.5.2 Hydrogele.....	31
2.5.3 Poloxamer 407	32
3 Material und Methoden	35
3.1. Materialien.....	35
3.1.1 Chemikalien, Proteine und Reagenzien	35
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	37
3.1.3 Geräte	37
3.1.4 Medien und Puffer.....	39
3.2. Methoden.....	40

3.2.1	Herstellungsprotokolle.....	40
3.2.2	Analytik.....	41
3.2.3	Zellbasierte Methoden	43
3.2.4	Schweinehaut-Wundmodell.....	46
3.2.5	Design der Formulierung	51
4	Ergebnisse.....	55
4.1.	Präklinische Untersuchung.....	55
4.1.1	Inhibitorische Aktivität von IMPI-GST	55
4.1.2	Zellviabilitätsstudien.....	62
4.1.3	Mikroskopie und Immunhistologie der behandelten Zellen	67
4.1.4	Zellmigrationsstudien	75
4.1.5	Untersuchung des <i>ex vivo</i> Wundmodells	78
4.2.	Entwicklung der Formulierung	80
4.2.1	Rheologie	80
4.2.2	Überprüfung der Konservierungsmittel	85
4.2.3	Proteinen in der Formulierung	86
4.2.4	Aktivität von IMPI-GST	87
4.2.5	Freisetzung von IMPI-GST.....	88
5	Diskussion.....	90
5.1.	Präklinische Untersuchungen.....	90
5.1.1	Wirkung von IMPI-GST gegen M4-MP.....	90
5.1.2	Wirkung von IMPI-GST gegen <i>P. aeruginosa</i>	92
5.1.3	<i>P. aeruginosa</i> Sekretom auf HaCaT-Zellen.....	94
5.1.4	Wirkung von IMPI-GST auf mit Sekretom behandelte Zellen.....	96
5.1.5	Zellmigration unter Sekretom- und IMPI-GST-Einfluss.....	98
5.1.6	Sekretom und IMPI-GST im <i>ex vivo</i> Wundmodell.....	100
5.2.	Formulierungsdesign.....	102
5.2.1	Rheologische Charakterisierung	102
5.2.2	Eignung des Hydrogels	106
5.3.	Fazit und Ausblick	108
	Referenzen.....	112
	Anhang	121
	Lebenslauf	130
	Danksagung.....	131
	Eidesstattliche Erklärung.....	133

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Haut.....	3
Abb. 2: Aktin-Dynamik.....	5
Abb. 3: Zell-Kontakte.....	5
Abb. 4: Schematischer Aufbau eines Desmosoms.....	6
Abb. 5: Schematischer Aufbau der Adherence Junctions (AJ).....	6
Abb. 6: Aufbau der Tight Junctions (TJ).	7
Abb. 7: Inflammationsphase der Wundheilung.....	10
Abb. 8: Proliferationsphase der Wundheilung.	11
Abb. 9: Fokale Adhäsionskontakte (FA).....	14
Abb. 10: Migration der Zelle.....	15
Abb. 11: 3-dimensionale Struktur von Pseudolysin (PE).....	21
Abb. 12: Möglicher Katalysemechanismus einer Carboxypeptidase A.....	22
Abb. 13: Der Insekten-Metalloprotease-Inhibitor IMPI.....	27
Abb. 14: Struktur des Thermolysin-IMPI-Komplexes.....	28
Abb. 15: Schematische Darstellung des Gelierungsmechanismus von Poloxamer 407.	33
Abb. 16: Schematische Darstellung hydrophober Interaktionen.....	34
Abb. 17: Ibidi® Zellmigrationstestsystem.	45
Abb. 18: Ablösen der Haut vom Schweineohr.....	46
Abb. 19: Wunderzeugung mit Biopsie-Punch.....	47
Abb. 20: Ex vivo Wundmodelle in Air-Liquid-Kultur.....	47
Abb. 21: Stereomikroskop-Aufnahme eines ex vivo Schweineohrhaut-Wundmodells.....	48
Abb. 22: Aufnahme eines gefärbten Gewebeschnitts des Wundmodells.....	50
Abb. 23: Franz-Diffusions-Zelle.	54
Abb. 24: Vergleich der inhibitorischen Aktivität von IMPI-GST mit IMPI.....	56
Abb. 25: Inhibitorische Aktivität unterschiedlicher IMPI-GST Chargen.	57
Abb. 26: Stabilitätskontrolle der inhibitorischen Aktivität von IMPI-GST.....	57
Abb. 27: Vergleich der inhibitorische Aktivität von IMPI-GST und PA gegen Thermolysin.	58
Abb. 28: Vergleich der inhibitorischen Aktivität von IMPI-GST und PA gegen PE.	59
Abb. 29: Proteolytische Aktivität des Sekretoms in Abhängigkeit der Inkubationszeit.	60
Abb. 30: PE-Konzentration in <i>P. aeruginosa</i> Sekretom.	61
Abb. 31: Hemmung der proteolytischen Aktivität des Sekretoms mit PA und IMPI-GST.	62
Abb. 32: Einfluss des <i>P. aeruginosa</i> Sekretom auf die Zellviabilität.	63
Abb. 33: Einfluss von FKS im Medium auf die Zytotoxizität des Sekretoms.....	64
Abb. 34: Zellviabilität von HaCaTs behandelt mit Sekretom und IMPI-GST oder PA.	65
Abb. 35: Zellviabilität von HaCaTs 24 h nach der Behandlung mit Sekretom und Inhibitor... ..	66
Abb. 36: Zellviabilität nach der Behandlung mit 3% Sekretom und IMPI-GST oder PA.....	67
Abb. 37: Auswirkung des Sekretoms auf HaCaTs in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.	68

Abb. 38: Auswirkung der Sekretom-Konzentration auf HaCaTs.	69
Abb. 39: Immunhistologische Färbung von mit 5% Sekretom behandelten HaCaTs.	70
Abb. 40: Immunhistologische Färbungen von mit steigenden Sekretom-Konzentrationen behandelten HaCaTs.	71
Abb. 41: Mikroskopische Aufnahmen von HaCaTs behandelt mit Sekretom und IMPI-GST.	72
Abb. 42: Immunhistologisch gefärbte, mit 10% Sekretom und 0,5 μ M IMPI-GST behandelte HaCaTs.....	73
Abb. 43: Immunhistologisch gefärbte, mit 10% Sekretom und IMPI-GST behandelte HaCaT-Zellen.....	74
Abb. 44: Einfluss des Sekretoms auf die Migration von HaCaTs.	76
Abb. 45: Migration von Keratinozyten unter dem Einfluss von Sekretom und IMPI-GST.	77
Abb. 46: <i>Ex vivo</i> Schweinehaut-Wundmodell nach Sekretom und IMPI-GST-Behandlung. ..	78
Abb. 47: Poloxamer Hydrogel.	80
Abb. 48: Betrag der dynamischen Viskosität von P407-Lösungen in Abhängigkeit der Temperatur.	81
Abb. 49: Gelstärke und Gel-Sol-Übergangstemperatur von P407-Gelen.	82
Abb. 50: Einfluss von Hyaluronsäure (HA) auf die Rheologie des Hydrogels.	83
Abb. 51: Einfluss der P188-Konzentration auf die Rheologie des Hydrogels.....	84
Abb. 52: Verschiedene Proteine in Poloxamer Hydrogelen.	86
Abb. 53: IMPI in Poloxamer Hydrogel.....	87
Abb. 54: Einfluss von IMPI-GST auf die Rheologie des Hydrogels.....	87
Abb. 55: Vergleich der Aktivität von IMPI-GST in Puffer und Hydrogel.	88
Abb. 56: Freisetzung von IMPI-GST aus dem Hydrogel.	89

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Alle verwendeten Chemikalien, Proteine und Reagenzien.....	35
Tab. 2: Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	37
Tab. 3: Alle verwendeten Geräte.....	37
Tab. 4: Einbettungsschritte der Gewebeproben im Einbettautomat.....	49
Tab. 5: Arbeitsschritte zur Entparaffinierung.....	49
Tab. 6: Eosin B-Färbelösung.....	50
Tab. 7: Arbeitsschritte zur Hämalaun/Eosin-Färbung.....	50
Tab. 8: Zusammensetzung des finalen Hydrogels.....	51

1 Einleitung und Zielsetzung

Chronische Wunden sind mit über 30 Millionen Patienten weltweit ein häufig vorkommendes und schwer zu therapierendes medizinisches Problem [2]. Für die etwa 3 Millionen Betroffenen in Deutschland bedeuten chronische Wunden große Schmerzen, erhebliche Einschränkungen der Mobilität sowie oftmals soziale Isolation [3]. Laut gesetzlicher Krankenversicherung (GKV) verursachen sie eine jährliche Belastung auf das Gesundheitssystem von 2-2,5 Mrd. € [2]. Für das Auftreten einer chronischen Wunde ist eine zerstörte Integrität der Hautbarriere Voraussetzung, die meist als Folge von Brandwunden, postoperativen Wundheilungsstörungen oder größtenteils Ulzera auftritt [4]. Aufgrund des demografischen Wandels und der ansteigenden Zahl an Arteriosklerose, Diabetes mellitus und Adipositas werden sich daher die Häufigkeit und die Schwere dieser Wundheilungsstörungen ebenso wie die Belastungen auf das Gesundheitssystem noch weiter erhöhen [2]. Insbesondere die fast immer mit chronischen Wunden einhergehenden bakteriellen Infektionen sind für die hohen Rezidivraten (42-78%) [2] und die schlechten Behandlungsaussichten verantwortlich [5]. Die dramatischen Folgen einer solchen chronisch infizierten Wunde sind nicht selten die Amputation der betroffenen Gliedmaße oder das Ausbrechen einer lebensbedrohlichen Sepsis [4]. Eines der wichtigsten dafür ursächlichen Erreger ist das gramnegative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* [5,6]. *P. aeruginosa* ist eines der häufigsten Bakterien in Wunden und hat zusätzlich zu seinen zahlreichen Antibiotikaresistenzen, die gravierendsten Konsequenzen auf den Wundheilungsverlauf [5]. Derzeit werden chronische Wundinfektionen standardmäßig mit Antibiotika behandelt. Systemisch applizierte Antibiotika gelangen allerdings aufgrund der meist schlechten Durchblutung des zu behandelnden Gewebes nur schwer zu ihrem Wirkungsort. Lokale Antibiotika führen besonders schnell zur Ausbildung von Resistenzen. Durch die wachsende Zahl antibiotikaresistenter Pathogene werden die Behandlungsmöglichkeiten zunehmend eingeschränkt. Vor allem die stetige Zunahme multiresistenter Keime bedarf des Einsatzes von alternativen Therapien [7,8]. Das immer häufiger auftretenden *P. aeruginosa* ist dabei von besonderer Bedeutung [6], weil es zu etwa 70% bis über 90% antibiotikaresistent vorkommt [5,9]. Ein vielversprechender Behandlungsansatz mit niedrigem Resistenz- und Nebenwirkungspotenzial ist die Hemmung spezifischer Virulenzfaktoren, unter Umgehung einer direkt bakteriziden Wirkung [7]. Der Hauptvirulenzfaktor von *P. aeruginosa* ist die M4-Metalloprotease (M4-MP) Pseudolysin (PE). PE erfüllt eine Schlüssel-funktion bei der Intoxikation, der Invasion und der Verteilung des Bakteriums im Wirt [10].

Innerhalb des Bakteriums hängt PE mit der Ausbildung von Biofilmen und der Antibiotikaresistenz zusammen. Die Rolle von PE ist jedoch weder intrazellulär, noch in Bezug auf die Virulenz vollständig aufgeklärt [11]. Die Bedeutsamkeit von PE wird daran deutlich, dass ein Gendefekt bei der Synthese von PE in Mäusen keine systemische, sondern nur eine wesentlich harmlosere Infektion verursachte [12]. Andere nicht-letalen *Pseudomonas*-Stämme lösten allerdings in Kombination mit PE wieder Mortalität aus [13]. Damit gilt PE zu den berüchtigtsten bakteriellen Proteasen [14] und ist das ideale Zielmolekül einer auf der Hemmung von Virulenzfaktoren basierten Behandlung. Ein spezifischer, natürlich vorkommender und effektiver Inhibitor von solchen bakteriellen M4-MP, wie PE, ist der Insekten-Metalloprotease-Inhibitor IMPI. Die Wirkung dieses Peptids gegen Proteasen der M4-Familie wurde bereits in biochemischen Untersuchungen bestätigt [15]. In der vorliegenden Arbeit soll das Potenzial von IMPI zur Therapie von Wundinfektionen mit *P. aeruginosa* auf molekularer, zellulärer und histologischer Ebene näher untersucht und eine geeignete Darreichungsform für dessen Anwendung entwickelt werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit lag der Fokus auf der pharmakologischen Erforschung dieses vielversprechenden Wirkstoffs. Dabei soll die Wirkung von IMPI auf das Sekretom von *P. aeruginosa* *in vitro* und *ex vivo* überprüft sowie eine mögliche Zytotoxizität des Inhibitors kontrolliert werden. Zunächst wird in biochemischen Aktivitätstests die inhibitorische Kapazität von IMPI-GST gegen PE und das Sekretom bestimmt. Bisher ist der Einfluss des Sekretoms auf Hautzellen noch unerforscht und soll in dieser Arbeit anhand von Zytotoxizitätstests, immunhistochemischen Färbungen und Migrationsversuchen an einer Keratinozyten-Zelllinie untersucht werden. Anschließend sollen die potenzielle Wirkung von IMPI in den gleichen Experimenten überprüft werden, damit schließlich die erzielten *in vitro* Erkenntnisse in einem *ex vivo* Wundheilungsmodell mit Schweineohrhaut unter Zugabe des Sekretoms in An- und Abwesenheit von IMPI bestätigt werden können. Das Ziel des zweiten Teils der Arbeit ist die Entwicklung einer geeigneten Formulierung für die Anwendung von IMPI bei chronischen Wundinfektionen. Die Herausforderung dabei war das Design einer idealen Wundformulierung, die ebenfalls einem Drug Delivery System für Proteinwirkstoffe gerecht wird. Um optimale Feuchtigkeitsbedingungen zu schaffen, vor Neuinfektionen zu schützen und eine möglichst schmerzfreie Applikation zu ermöglichen, wurde sich für die Entwicklung eines thermosensitiven Hydrogels mit dem Gelbildner Poloxamer 407 entschieden. Neben der Eignung als Wundformulierung muss die Kompatibilität innerhalb der Galenik zwischen Formulierung und Wirkstoff in Bezug auf die Rheologie, die Aktivität von IMPI und die Freisetzung gewährleistet sein.

2 Theoretische Grundlagen

Im folgenden Kapitel werden der Aufbau der Haut, der Prozess der Wundheilung und die dabei auftretenden Probleme einer chronischen bzw. infizierten Wunde näher betrachtet. Dabei stehen das Bakterium *P. aeruginosa* mit den beteiligten Virulenzfaktoren, wie PE und verschiedenen PE-Inhibitoren, zur Behandlung dieser Infektionen im Vordergrund. Außerdem werden aktuelle Wundtherapien und mögliche Wundformulierungen, speziell thermosensitive Hydrogele, vorgestellt.

2.1. Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und bildet eine Schutzschicht zwischen Organismus und Umwelt. Die Haut ist als Epithelgewebe in die drei Schichten Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subkutis) (Abb. 1) aufgebaut. Innerhalb dieser Schichten befinden sich die Hautanhangsgebilde, wie Nägel, Haare, Schweiß- und Talgdrüsen sowie Lymph- und Blutgefäße. Die zentralen Zellarten der Haut sind die Keratinozyten in der Epidermis und die Fibroblasten in der Dermis [16].

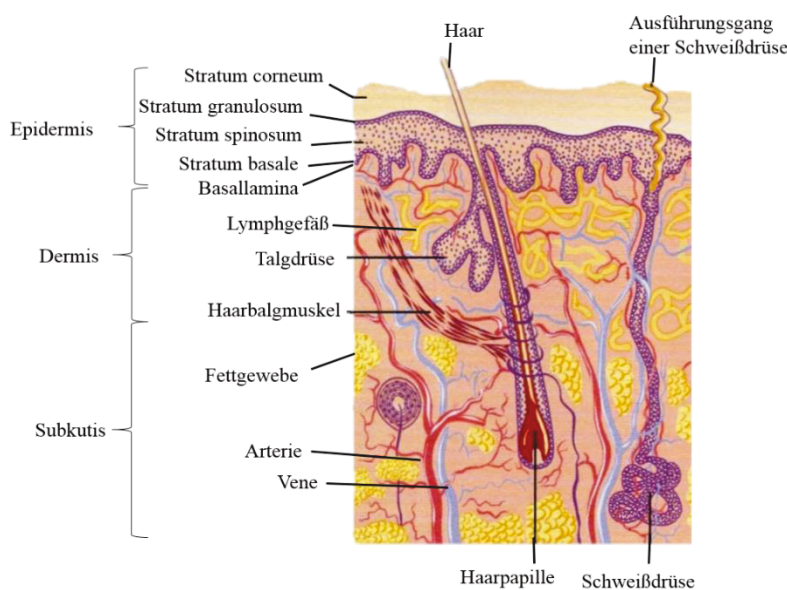


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Haut. verändert mit freundlicher Genehmigung von Vaupel et al.[17].

Die Hauptaufgabe der Haut ist der Schutz des Organismus vor Umwelteinflüssen, wie Austrocknung, UV-Strahlung oder dem Eindringen von Mikroorganismen, insbesondere Pathogenen. Mit dem Säureschutzmantel (pH-Wert: 5-5,5) und den, von Hautzellen produzierten, antimikrobiellen Peptiden (AMP) wirkt sie dem Angriff von möglichen Erregern entgegen. Die

Haut besitzt ein eigenes Immunsystem und stellt ein Sinnes- und Repräsentationsorgan dar. Außerdem fungiert sie als Temperaturregulator, Isolator sowie als Energie- und Wasserspeicher. Die Dicke der Haut variiert je nach Körperregion [16-18].

2.1.1 Struktur der Epidermis

Die **Epidermis** ist die oberste Hautschicht und die eigentliche Schutzhülle des Organismus. Sie besteht aus einem mehrschichtigen, verhornten und gefäßlosen Plattenepithel zu über 90% aus keratinbildenden Keratinozyten. Die übrigen 10% füllen symbiontische Zellen, wie Langerhans-Zellen, Merkelzellen und die für die Hautfärbung verantwortlichen Melanozyten aus. Die Epidermis gliedert sich in unterschiedliche Schichten, von außen nach innen in Horn- (*Stratum Corneum*), Keim- oder Körnerzell- (*Stratum granulosum*), Stachelzell- (*Stratum spinosum*) und Basalschicht (*Stratum basale*), die über eine komplex aufgebaute dermoepidermale Junctionzone (DEJ) mit der Dermis verbunden ist. Innerhalb dieser Schichten sind die einzelnen Keratinozyten mit ihrem Zytoskelett über Zellkontakte verbunden.[16-18].

Das **Zytoskelett** besteht aus einem röhrenförmigen Gerüstsystem aus Mikrotubuli (ca 25 nm), Intermediärfilamenten (ca 10 nm) und Mikrofilamenten (6-8 nm). Diese strukturellen Hauptelemente stellen die mechanische Stabilität der Zellen her, dienen dem intrazellulären Transport und der Adhärenz der Zelle [16,19,20]. Die Bestandteile der Intermediärfilamente sind die Zytokeratine, die an Desmosomen (Zell-Zell-Kontakte) und Hemidesmosomen (Zell-Matrix-Kontakte) ansetzen. Die Mikrofilamente werden von dem häufigsten Strukturprotein, dem Aktin, gebildet, das in filamentöser (F-Aktin) oder in globulärer Form (G-Aktin) vorliegen kann. F-Aktin besteht aus zwei helikalen Ketten polymerisierter G-Aktin-Moleküle, die sich bei seinem Aufbau in gleicher Richtung aneinander lagern und die Polarität des F-Aktins bedingen. Innerhalb der Zelle kann F-Aktin in größeren Bündeln vorliegen, antiparallele F-Aktin-Bündel werden als Stressfasern bezeichnet (Abb. 2) [16,19,20].

Stressfasern sind organisierte Aktin-Strukturen mit verdickten Enden. Sie können den Zellkörper an der Längsseite durchspannen und besitzen kontraktile Eigenschaften [21]. Aus den Mikrofilamenten entsteht über Verbindungsproteine, wie Villin, ein lockeres Netzwerk innerhalb der Zelle. An den Rändern sind die Mikrofilamenten über Adapterproteine mit Adherence Junctions (AJ) und Fokalen Adhäsionskontakten (FA) verknüpft [19,20].

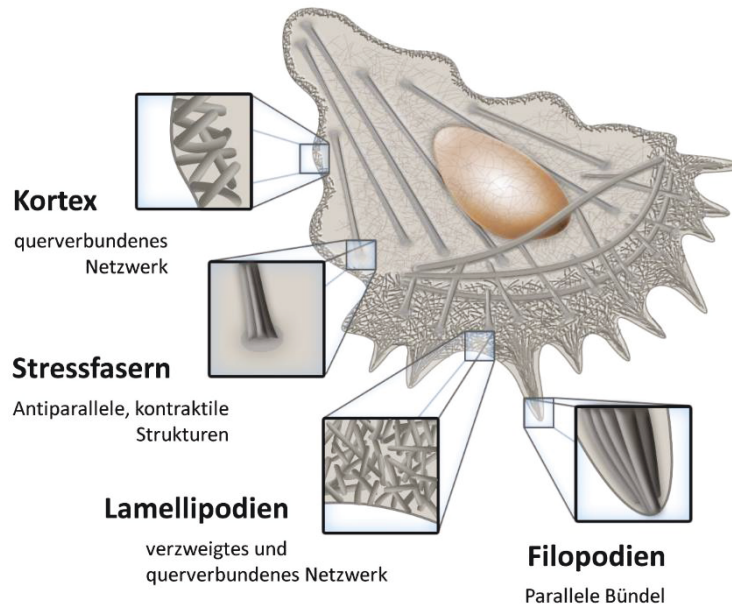


Abb. 2: Aktin-Dynamik. erstellt nach Blanchoin et al. [22].

Die verschiedenen **Zellkontakte** (Abb. 3) der Keratinozyten sind haftend, kommunizierend oder verschließend. Die Zellkontakte sind aus Zelladhäsionsproteinen von sechs verschiedenen Unterfamilien, der Selektine, Claudine, Zell-Adäsionsmoleküle (CAM), Cadherine, Integrine und Connexine, aufgebaut. Die haftenden Zell-Zell-Kontakte, Desmosomen und Adherence Junctions (AJ), liegen in der Zytoplasmamembran übereinander. Die gürtelförmig rund um die Zelle angeordneten AJ werden auch als Adhäsionsgürtel (Zonula adherens) bezeichnet und befinden sich direkt unterhalb der verschließenden Zell-Verbindungen, den Tight Junctions (TJ) [19,20,23].

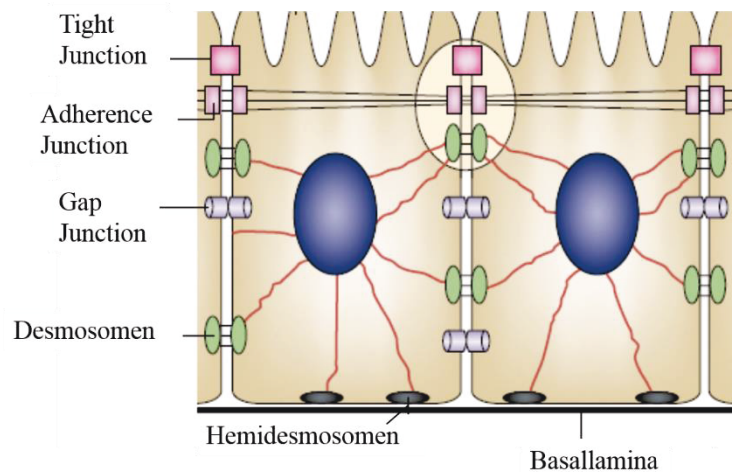


Abb. 3: Zell-Kontakte. mit freundlicher Genehmigung von Tsukita et al. [24].

Desmosome (Abb. 4) sind äußerst stabile, punktförmige Haltekontakte [25]. Sie bestehen aus einer zytoplasmatischen Proteinplatte aus Desmoplakin mit Verankerungen der Intermediärfilamente. Interzellulär sind die Plaques über desmosomale Cadherine homolog verbunden. Cadherine sind kalziumabhängige transmembrane Glycoproteine. Zusammen mit den AJ tragen Desmosome zur mechanischen Kohäsion des Gewebes bei [19,20].

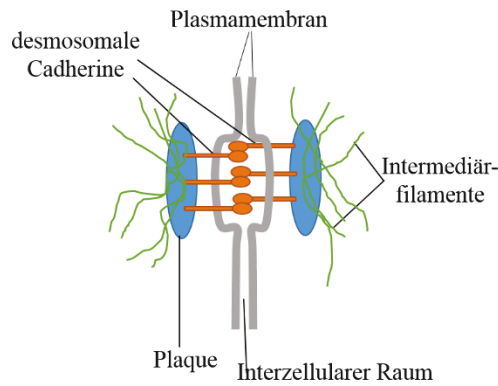


Abb. 4: Schematischer Aufbau eines Desmosoms.in Anlehnung an Munk et al. [19].

Der molekulare Aufbau der **Adherence Junctions (AJ)** (Abb. 5) ähnelt dem der Desmosomen. Ihre interzellulären Adhäsionsmoleküle bestehen ebenfalls aus Cadherinen, wie E-Cadherine der Epithelzellen, die sich allerdings von den desmosomalen unterscheiden. Sie sind über Ankerproteine, wie Catenin, Vinculin oder α -Actinin, mit dem intrazellulären Aktin-Zytoskelett verbunden [17,19,20,26].

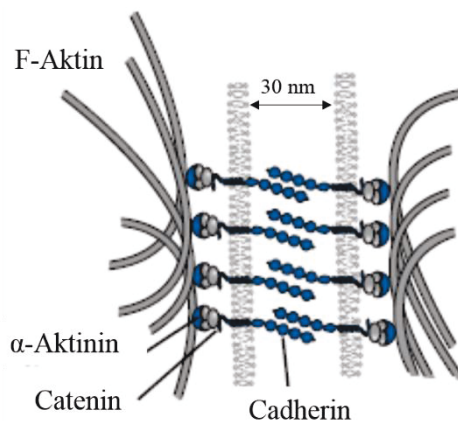


Abb. 5: Schematischer Aufbau der Adherence Junctions (AJ). mit freundlicher Genehmigung von Boujard et al.,© Dunod, 2012 [27].

Tight Junctions (TJ) sind verschließende Kontakte und werden auch als Occluding Junctions bezeichnet (Abb. 6). Sie kontrollieren den Transport von Molekülen und Ionen innerhalb des Gewebes und sind als „Schlussleisten“ um die Zelle angeordnet. TJ bestehen aus netzförmigen Transmembranproteinen der Occludine, Claudine und junctionalen Adhäsionsmoleküle (JAM).

Diese Ankerproteine verknüpfen die Zellen untereinander vermutlich über Disulfidbrücken, erzeugen eine parazelluläre Barriere und halten die Polarität der Zelle aufrecht. Intrazellulär verbinden die Zonula Occludens (ZO)-Proteine die TJ direkt mit dem Aktin-Zytoskelett. Die diversen TJ-Proteine sind für den Aufbau, den Erhalt und den Abbau von TJ zuständig und ferner in die Permeabilität, die Signaltransduktion und die Proliferation der Zelle involviert [19,20,23,28,29].

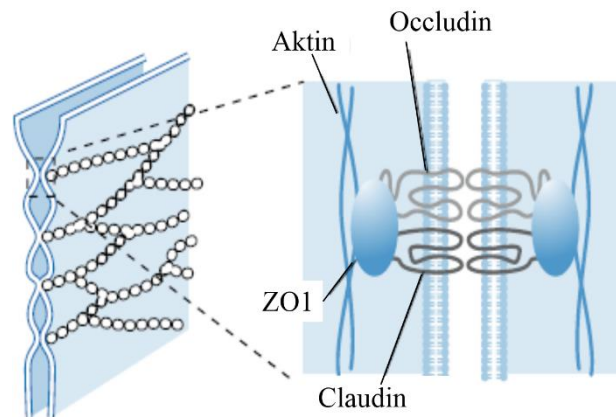


Abb. 6: Aufbau der Tight Junctions (TJ). mit freundlicher Genehmigung von Boujard et al., © Dunod, 2012 [27].

Eine weitere Art von Zell-Verbindungen sind die kommunizierenden **Gap Junctions (GJ)**. Sie ermöglichen den freien Durchfluss von chemischen und elektrischen Signalen, Ionen oder kleinen Molekülen. GJ werden von hexagonal angeordneten Kanalproteinen, den Connexinen gebildet, die das Zytosol von zwei Zellen über einen im Vergleich zu TJ relativ großen Abstand verbinden [19,26].

Die verknüpften epidermalen Keratinozyten sind im *Stratum basale* über **Hemidesmosomen** in der DEJ an die Basallamina befestigt. Bei diesen, so genannten „halben Desmosomen“, ersetzen die heterogen-bindenden Integrine die Cadherine der Desmosomen [20].

Die **dermoepidermale Junction Zone (DEJ)** besteht aus der Zellmembran der epidermalen Keratinozyten, der Basallamina, dem Interzellularraum *lamina lucida* und dem sublaminaren Raum. Ankerfibrillen aus Kollagen, Laminin und weiteren Proteinen bilden ein Schlaufen-Netzwerk, das fest an das dermale Kollagen gebunden ist. Über die Verbindung der DEJ wird die Epidermis mit Nährstoffen aus den darunterliegenden Schichten versorgt [16].

Die **Differenzierung** der Keratinozyten zu nicht vitalen Korneozyten verläuft innerhalb der einzelnen Schichten der Epidermis und dauert etwa 30 Tage. Im Laufe dieser Verhornung verändern die Keratinozyten ständig ihre Form und ihre Ausrichtung, sodass nach und nach Zell-

plasma, -kern und -organellen durch Keratin ersetzt werden. Im *Stratum basale* werden die zylindrisch angeordneten Keratinozyten stetig über Mitose von Stammzellen der Basalschicht gebildet. In dem darüber liegende *Stratum Spinosum* verlieren die keratinbildenden Keratinozyten die Fähigkeit zur Zellteilung. Die zahlreichen Desmosomen lassen die mehrlagigen Zellen im Mikroskop wie Stacheln erscheinen, weshalb diese dickste Schicht der Epidermis auch Stachelzellschicht genannt wird. Nach oben hin zum *Stratum granulosum* flacht die Form der Keratinozyten ab und die Degeneration von Zellkern und -organellen beginnt. Der Anteil des Zytoplasmas steigt und die Zellen lagern Keratingranula ein. Diese Körnerzellschicht wird daher als Vorstufe der Verhornung angesehen. In stark verhornten Hautpartien ist das *Stratum lucidum*, eine zellkernlose Keratohyalinschicht, ausgebildet. In der obersten Schicht der Epidermis, dem *Stratum corneum*, liegen schließlich keratinhaltige, leblose Korneozyten in 15-20 festen Schichten backsteinartig übereinander. Die Zellgrenzen sind abgesehen von den Desmosomen weitestgehend aufgelöst und interzellulär hat sich eine Lipidmatrix aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren gebildet. Die Hornschicht bildet die eigentliche Barriere zur Umwelt und ist widerstandsfähig gegen physikalische, chemische und mechanische Einflüsse. In der obersten Lage der Hornschicht werden die Korneozyten kontinuierlich aus dem Verband abgeschuppt [16,18].

2.1.2 Dermis und Subkutis

Die **Dermis** ist eine als Korium bezeichnete Hautschicht und dient als Verankerung und Nährstofflieferant der Epidermis. Die Dermis enthält den Ursprung der Schweiß- und Talgdrüsen sowie zahlreiche Nervenfasern. Damit ist sie hauptsächlich an der Temperatur-, Druck- und Schmerzregulation beteiligt. Die als fibroelastisches Bindegewebe aus ineinander vernetzten Kollagenfasern aufgebaute Zellschicht besteht vorwiegend aus Fibroblasten und der Extrazellulären Matrix (EZM). Die EZM umfasst das Interstitium sowie faserige Elementen, hier überwiegend Kollagen und Elastin. Das Interstitium ist ein Gemisch aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen, wie z.B. Hyaluronsäure, die hauptsächlich von Fibroblasten gebildet werden. Die EZM unterstützt die Interaktion der Zellen miteinander und mit der Matrix. Damit bildet sie auch die Grundlage für die Zellbewegung, die Wasserspeicherung und die Aufrechterhaltung des Elektrolytgleichgewichts. Der Übergang von der Kutis zur Subkutis ist fließend. [16,17,19]. Die **Subkutis** ist die Verbindungsschicht zwischen Haut und darunterliegender Körperfaszie. Sie besteht hauptsächlich aus einem lockeren Bindegewebe mit eingelagerten Adipozyten. Dieses Unterhautfettgewebe dient vorwiegend als Energiespeicher, Temperaturisolierung und

mechanisches Polster. Im Gegensatz zu den oberen Hautschichten, enthält die Subkutis auch größere Blutgefäße, Nerven und Lymphgefäße sowie apokrine und epokrine Drüsen [17].

2.2. Die Wundheilung

Die Hauptfunktion der Haut ist der Schutz des Organismus. Bei einer Verletzung dieser Barriere, entsteht eine Wunde und die akute Wundheilung mit dem primären Ziel der Hautverschließung setzt ein. Der Wundheilungsprozess ist mit der Beteiligung unterschiedlicher Zellen und Molekülen einer der komplexesten Prozesse im Organismus. Durch eine Störung im Heilungsverlauf können chronische Wunden mit einem hohen Infektionsrisiko entstehen [3,30].

2.2.1 Akute Wundheilung

Der dynamische Wundheilungsprozess ist meist in drei voneinander weder zeitlich noch räumlich trennbaren Phasen, der Inflammations-, Proliferations- und Remodellierungsphase, gegliedert [30,31]. Manche Autoren nehmen eine Unterteilung der ersten Inflammationsphase in Gerinnungs- und Exsudationsphase vor [4], wobei andere zusätzlich die zweite Phase in Migration und Proliferation separieren [32]. In der Regel führt der Heilungsverlauf nach etwa 2-3 Wochen zu einer verschlossenen Wunde, und dauert anschließend noch bis zu 2 Jahre an [30,31,33,34].

1. Inflammationsphase

Die Inflammations- oder Entzündungsphase (Abb. 7) setzt direkt bei der Verwundung ein und kann 2-3 Tage andauern [30,31,33]. Durch die Verletzung des Gewebes tritt Blut aus der Wunde aus, das bereits tote Gewebebestandteile, Fremdkörper und mögliche Keime ausschwemmt. Mit dem Blut strömen erste zirkulierende Leukozyten in die Wunde und bewahren meist vor einer Infektion [33]. Anschließend kommt es zur vorübergehenden Vasokonstriktion und Verlangsamung der Blutung bis hin zur Blutstillung und es entsteht ein Blutgerinnsel [34]. Über die Gerinnungskaskade kommt es dabei zur Aggregation der Thrombozyten und zur Ausbildung eines Fibrinnetzes aus unlöslichen Fibrinfasern, in das Fibronectin (Fn), Vitronectin (Vn) und Wachstumsfaktoren eingebunden sind [30]. Später dient der Thrombus als Gerüst für infiltrierende Zellen und Wachstumsfaktoren [31,33]. Gleichzeitig sekretieren die Blutplättchen und die Immunzellen des umliegenden Gewebes diverse Wachstumsfaktoren für die Wundheilung, wie z.B. Platelet derived growth factor (PDGF), Tumornekrosefaktor (TNF) oder Epidermale Wachstumsfaktoren (EGF) [35]. Im nächsten Schritt wird über aktive Vasodilation die Exsudation verstärkt. Die ersten, bereits nach wenigen Minuten infiltrierenden Immunzellen sind neutrophile Granulozyten. Ihre Aufgabe ist die Reinigung der Wunde von Partikeln und

Bakterien. Innerhalb der ersten 24 h kommen als Antwort auf chemische Signalstoffe Monozyten in der Wunde an und differenzieren dort durch Anheftung an Proteine der EZM zu aktiven Makrophagen. Diese Adhärenz induziert ebenfalls die Produktion und Sekretion von essentiellen Wachstumsfaktoren. Durch Bindung von Integrin-Rezeptoren der Makrophagen an spezifische Proteine der EZM, werden sie zur Phagozytose von Mikroorganismen und verschiedenen Fragmenten der EZM sowie zur Auflösung des Thrombus stimuliert. Später können die Makrophagen zu ortsständigen Gewebsmakrophagen (Histiozyten) differenzieren, um weiter anfallende Abbauprodukte oder Mikroorganismen zu zersetzen [30,31,33].

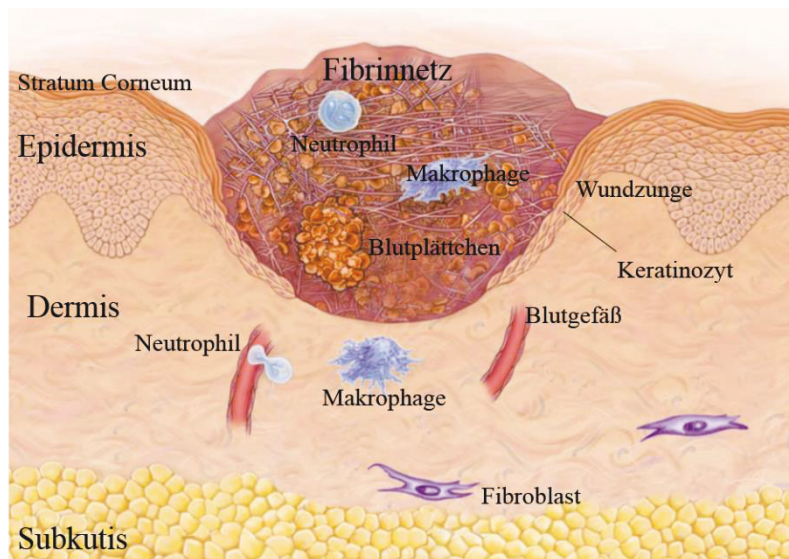


Abb. 7: Inflammationsphase der Wundheilung. Kutane Wunde drei Tage nach der Verletzung, (Reproduziert mit Genehmigung von Singer und Clark, 1999 [31], Copyright Massachusetts Medical Society).

Das während der Inflammationsphase gebildete Exsudat besteht aus Serumbestandteilen, Entzündungszellen sowie Wachstumsfaktoren [30]. Die Wachstumsfaktoren sind unter anderem PDGF, Tissue growth factor (TGF)- α und TGF- β sowie TNF, Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF) und Interleukine (IL). Ihre Aufgabe ist die Stimulation der Migration, der Proliferation sowie der Bildung von Granulationsgewebe und Blutgefäßen. PDGF aktiviert Makrophagen und fördert den Heilungsprozess auf unterschiedliche Weise. PDGF stimuliert die Angiogenese, die Migration von Keratinozyten und Fibroblasten sowie die Synthese von Kollagen und anderen Proteinen zur Gewebeneubildung. In Kombination mit IGF-I/-II kommt es zu synergistischen Effekten auf die Mitogenese desmodontaler Fibroblasten. TGF- β 1 stimuliert die Bildung der EZM. TGF- α und IL-1 aktivieren die epidermale Regeneration und die Bildung von Granulationsgewebe. Außerdem sind EGF, vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) und Zementwachstumsfaktor (CGF) präsent, die ebenfalls mitogen auf Fibroblasten wirken.

Nach ihrem Einsatz werden die Wachstumsfaktoren mit dem Schorf ausgestoßen oder von Makrophagen phagozytiert [31,34,35].

Neben Wachstumsfaktoren sind auch Proteasen und Proteaseinhibitoren Bestandteil der EZM. Matrix Metalloproteasen (MMP) werden insbesondere von Makrophagen, aber auch von Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, freigesetzt. Diese MMPs dienen der Reinigung der Wunde und Zersetzung des nekrotischen Gewebes, außerdem wird bei diesem endogenen Debridement die Freisetzung von weiteren Wachstumsfaktoren stimuliert. Die Konzentration der MMPs steigt bis zum dritten Tag nach der Verwundung an und fällt bis zum fünften Tag wieder ab. Dabei stehen die MMPs immer in einem empfindlichen Gleichgewicht zu den Gewebeinhibitoren der Metalloproteasen (TIMP), die sich gegenseitig beeinflussen und den Auf- und Abbau der provisorischen Matrix, der Basalmembran und der EZM regulieren. Weiterhin sind sie entscheidend an der Angiogenese, der Migration und der Proliferation beteiligt [30,31,36].

2. Proliferationsphase

Die Proliferationsphase wird auch Granulations-, Gewebebildungs- oder Aufbauphase genannt. Dabei kommt es zur Reepithalisierung, dem Aufbau von Granulationsgewebe und zur Angiogenese. Innerhalb von 2-10 Tagen wird über Proliferation und Migration von Keratinozyten und Fibroblasten die Barrierefunktion wiederhergestellt (Abb. 8) [30].

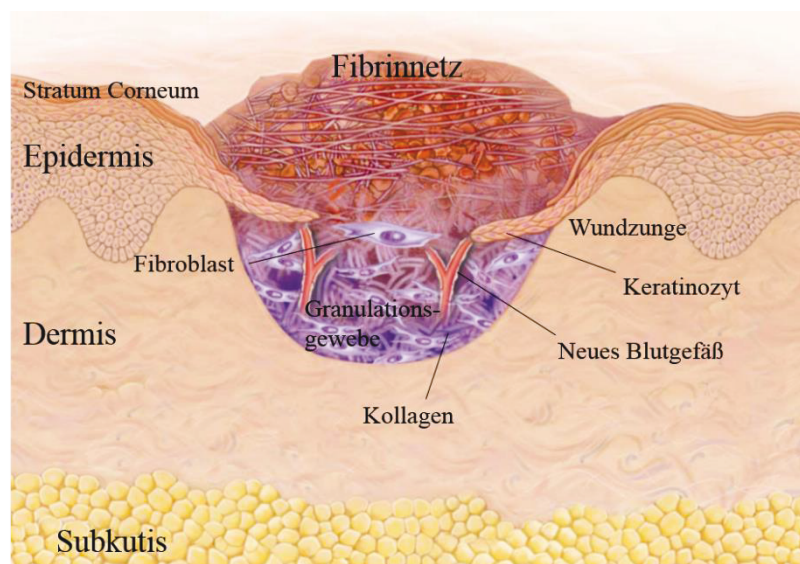


Abb. 8: Proliferationsphase der Wundheilung. Kutane Wunde fünf Tage nach der Verletzung, (Reproduziert mit Genehmigung von Singer und Clark, 1999 [31], Copyright Massachusetts Medical Society).

Bereits in den ersten Stunden nach der Verletzung beginnen die Keratinozyten vom Wundrand und den Hautanhangsgebilden unter dem Blutgerinnsel in die Wunde zu migrieren [37]. Daraus

resultiert eine Wundzunge, die zu einem hyperproliferativen Epithelium entlang der geschädigten Dermis quer durch die Wunde ausgebaut wird. Dieser Vorgang wird von Wachstumsfaktoren der vorherigen Inflammationsphase gesteuert und trennt das lebende Wundgewebe vom getrocknetem Schorf [31]. Während der Migration am Wundrand (siehe 2.2.2), beginnen die hinteren Zellen aktiv zu proliferieren, zu reifen und stellen schließlich die Barrierefunktion der Haut wieder her. Die Migration von Zellen wird durch die provisorische Matrix aus Fibrin, Fn und Hyaluronsäure (HA) unterstützt [38]. Am Ende der Epithalisierung wird die Basallamina synthetisiert und die Hemidesmosomen der Keratinozyten werden ausgebildet [30].

Zusätzlich zur Wiederherstellung der Epidermis beginnen auch in der Dermis nach dem Abgang der Makrophagen im Wundgewebe, die Fibroblasten zu migrieren und zu proliferieren. Teilweise werden die Fibroblasten auch von multipotenten Zellen, die in der Dermis vorliegen und das Potenzial haben zu Fibroblasten zu differenzieren, rekrutiert. Einige Fibroblasten differenzieren in der Wunde dann zu Myofibroblasten [33]. Die Fibroblasten und Myofibroblasten führen zur Annäherung der Wundränder und lösen schließlich den Wundverschluss aus. Dabei bilden Fibroblasten aus der direkten Nachbarschaft Stressfasern, die eine verbindende Gewebekontraktion ermöglichen [33]. Die Myofibroblasten besitzen aktinhaltige, kontraktile Filamente auf der Zellmembran, durch ihre Kontraktion kommt es zur Verkleinerung der Wundgröße bis hin zum Verschluss [33]. Gleichzeitig findet die Angiogenese statt und stellt Sauerstoff und Nährstoffe für den Zellmetabolismus bereit. Während dieser Reepithalisierung lösen Fibroblasten den Thrombus der Wunde auf und ersetzen ihn mit Granulationsgewebe, sodass die Struktur und die Funktion der Haut zum Großteil wiederhergestellt wird [31].

3. Remodellierungsphase

Die Remodellierungsphase wird auch als Regenerations-, Reifungs- oder Reperationsphase bezeichnete und ist die letzte und längste Phase der Wundheilung. Sie setzt etwa 2-4 Wochen nach der Verletzung ein und kann über 1-2 Jahre andauern. In der Remodellierungsphase wird das gebildete Granulationsgewebe in Narbengewebe umgebaut. Das zellarme Bindegewebe der Narbe befindet sich dabei in einem kontinuierlichen, aktiven Umbauprozess. Die überwiegend von Fibroblasten, Keratinozyten und Makrophagen sekretierten MMPs degradieren das Kollagen-3, das überwiegend von dem festeren Kollagen-1 ersetzt wird. Die neue EZM wird hauptsächlich von Fibroblasten und Myofibroblasten synthetisiert. Anschließend vollziehen die meisten Zellen in der Wunde entweder Apoptose, sie werden von Makrophagen phagozytiert oder sie emigrieren über lymphatische Gefäße [30,31]. Während der Remodellierungsphase

verringert sich die Gefäßdichte der Wunde und das Gewebe fällt unter das normale Hautniveau ab, nach dem Umbau steht die entstandene Narbe etwas hervor [31]. Das reparierte Gewebe wird durch die Remodellierung des Kollagens zwar gestärkt, dennoch erreicht die weder Hautanhangsgebilde noch Zellen enthaltende Haut höchsten 70-80% der ursprünglichen Festigkeit und ersetzt nie adäquat die unverletzte Haut [30,31].

2.2.2 Migration der Keratinozyten

Die Migration der Keratinozyten ist Voraussetzung für eine erfolgreichen Wundheilung [37]. Bei der kollektiven Migration, während der Wundheilung bilden sich Aktin-Fortsätze der führenden Zellen aus, die über FA an der Sublamina befestigt werden und über die später die Zelle hinweg wandert [21,39]. Die Interaktion zwischen Keratinozyten und EZM über ein Zusammenspiel von Motorproteinen und dynamischem Zytoskelett ist für diesen komplexen Vorgang entscheidend [40].

Die **Dynamik des Zytoskeletts** ist eine der wichtigsten Funktionen der Zelle und wird über intrazelluläre Signalkaskaden gesteuert. An der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts sind die Guanosintriphosphat-bindenden (G-)-Proteine der Rho-Familie (Ras (Rat sarcoma)-Homologe), wie Rho, Cdc42 (cell division control protein) und Rac (Ras-verbundenes C3 Botulinum Toxin Substrat) beteiligt. Rho wird vermutet an dem Aufbau der FA und der Bildung von Stressfasern beteiligt zu sein, indem es die Adhäsion von F-Aktin unterstützt. Dabei stimuliert das aktive Rho die Dephosphorylierung von Myosin und bedingt damit eine Zerstörung der Stressfasern [20,22]. Rac und Cdc42 initiieren eine Polymerisierung von Aktin, so wurde beschrieben, Rac sei an der Ausbildung der Lamellipodien und Cdc42 an der von Filopodien beteiligt [20]. Neuere Studien zeigen aber, dass sowohl Rac, als auch Cdc42 an der Ausbildung von Lamellipodien beteiligt sind [22]. Damit sind die an der Umstrukturierung des Aktins beteiligten und in den Rho-GTPase-Zyklus involvierten Mechanismen und Proteine noch ungeklärt [22,41].

Fokale Adhäsionskonstrukte (FA) sind eher kurzfristige, dynamische Verbindungen zwischen Zellen und der EZM. Sie fungieren außer als Verankerungspunkt der Zelle auch als Signalüberträger. FA werden von transmembranen Adhäsionsproteinen der Familie der Integrine gebildet, die eine mechanische Bindung zwischen den Aktin-Filamenten des Zytoskeletts und den Ankerproteinen der EZM, wie Laminin, Fn und Vn herstellen (Abb. 9).

Insbesondere Fn spielt eine wichtige Rolle in der Wundheilung, der Zellmigration und -adhäsion. Fn erfüllt eine Brückenfunktion zwischen Kollagenfibrillen und anderen EZM-Molekülen,

wie Proteoglykanen oder Fibrin. Durch die Vermittlung der Zelladhärenz kommt auch seine Bezeichnung als Zellkleber zustande [19,20].

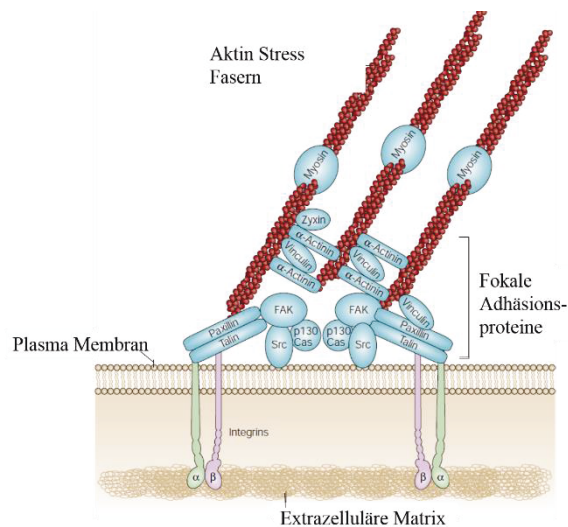


Abb. 9: Fokale Adhäsionskontakte (FA). mit freundlicher Genehmigung von Mitra et al. [42].

Die **Migration** der Zellen ist in die 4 Abschnitte Polarisation, Protrusion, Adhäsion und Traktion gegliedert [21,39]. Um diesen Zellfortbewegungsmechanismus zu ermöglichen, müssen die Keratinozyten zuerst von der Basallamina getrennt werden. Dabei spalten sich die Integrine der Hemidesmosomen vom Laminin und die Verbindung zum Zytoskelett ist gelöst. Außerdem bauen sich die meisten Desmosomen und anderen Zell-Zell-Kontakte ab.

Bei der Polarisation der Zelle bilden sich ein vorderer, schmaler und länglicher sowie ein hinterer, hoher und abgerundeter Pol, der den Zellkörper enthält (Abb. 10a). Die Protrusion bezeichnet die Ausbildung von aktinreichen Strukturen am vorangehenden Zellpol. Dabei ist die Oberflächenmembran an der Zellfront in Kriechrichtung gewölbt und es entstehen flache, breite Vorschübe, die so genannten Lamellipodien. Diese peripheren, zytoplasmatischen Filamente bilden sich über die Polymerisation von Aktin und bestehen aus orthogonal vernetztem F-Aktin (Abb. 10b). Der überwiegende Teil der Lamellipodien liegt in einer Ebene parallel zum festen Substratum. Aus den Lamellipodien heraus werden teilweise schlanke, kleine Fortsätze, die Filopodien, ausgebildet. Zur Adhäsion der Lamellipodien an das Substratum werden punktuell FA über Integrin gebildet [21,39].

Die Integrin-Rezeptoren interagieren mit verschiedenen Proteinen der EZM, wie Fn und Vn. Diese liegen am Wundrand in Kollagen-1 zerstreut vor und sind mit dem Fibrin-Gerinnsel in der Wundfläche verwoben [31]. Auf der Zytoplasmaseite sind die FA mit dem F-Aktin des Zytoplasmas verbunden. Dabei kommt es über Rho-induzierte Zugfasern aus kontraktile instabilen Muskelbündeln zur Ausbildung von Zugkräften und zur Streckung des Zellkortex [20]. Die

Folge ist eine Traktion der Zelle über Myosin-Motor-Proteine (Abb. 10c). Gleichzeitig mit der Kontraktion von Myosin-2, depolymerisieren die Aktinfilamente am hinteren Zellpol, wodurch eine Trennung zwischen den Netzfilamenten vorne und hinten verursacht wird [26]. Am hinteren Zellpol werden die lokalen FA gelöst und eine vorwärts gerichtete Bewegung des Aktin-Netzwerkes wird als Ganzes ermöglicht, obwohl F-Aktin selbst stationär am Substratum bleibt. Der gesamte Zellkortex wird damit nach vorne befördert und die Zellen schieben sich über die vorderen FA hinweg. Die hinteren FA werden schließlich in Vesikeln zum vorderen Zellpol transportiert, wo neue FA ausgebildet werden (Abb. 10d) [21,39].

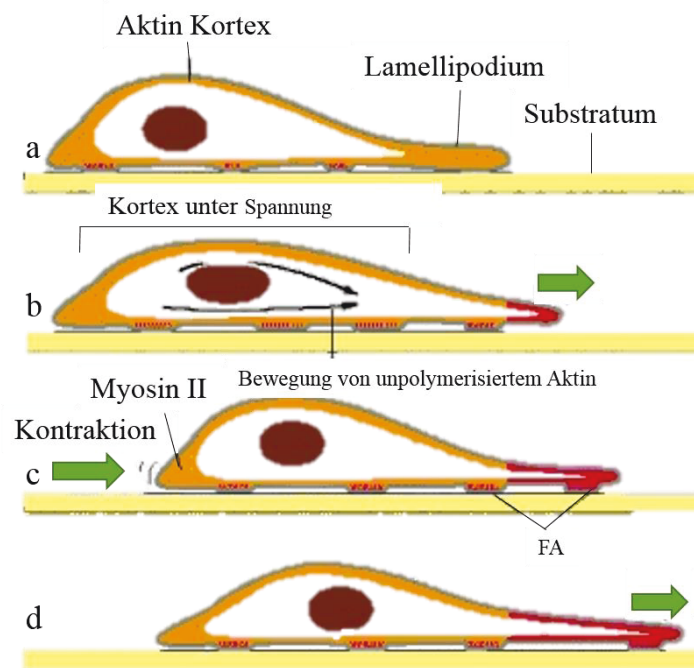


Abb. 10: Migration der Zelle. Die Bewegungsrichtung ist mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet, neu-polymerisiertes Aktin ist rot markiert. Verändert nach Alberts und Lewis et al. [39].

Der beschriebene Migrationszyklus wiederholt sich bis zum Endpunkt der Zellwanderung mehrmals. Dort ziehen sich die Lamellipodien zurück (Retraktion) und die meisten FA lösen sich wieder auf. Die übrigen FA vergrößern sich und reifen zu stabileren fokalen Adhäsionen heran. Der Abbau der FA kann entweder intrazellulär über das Zytoskelett oder extrazellulär über die Verbindung zum Liganden der EZM unterbrochen werden. Anschließend werden die Integrine zum Teil als Komplex mit dem Ligand internalisiert oder als Makroaggregate abgeschnürt und zurückgelassen. Diese Aggregate werden vermutet an der Richtungsweisung nachfolgender Zellen beteiligt zu sein [20,39].

Bei der kollektiven Migration der Keratinozyten sind zusätzlich zu den Zell-Matrix-, die Zell-Zell-Verbindungen von großer Bedeutung. Diese lateralen Kontakte benachbarter Zellen sind

an der kontinuierlichen, retrograden Bewegung der führenden Zellen entlang der lateralen Seite beteiligt und Aktin-abhängig gesteuert. Cadherine werden an der Zell-Rückseite internalisiert und am führenden Rand der lateralen Zell-Zell-Kontakte wieder in neugeformte AJ integriert. Cadherin-vermittelte AJ von führenden Zellen kontrollieren und beeinflussen dabei vermutlich die Richtung und die Geschwindigkeit der Fortbewegung [25]. Weitere Faktoren, die bei der Migration von Keratinozyten *in vitro* und *in vivo* beteiligt sind, sind die Rho-Proteine [20] sowie der Urokinase-type Plasminogen activated Rezeptor (uPAR) [43]. Für eine funktionierende Zellmigration sind intakte TJ, AJ sowie die Umstrukturierung des F-Aktins in Lamellipodien und Filopodien essentiell. Während der Migration werden zwar zuerst die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte gelockert, damit die Zellen wandern können, anschließend wird jedoch die Adhäsion am Zielort der Zellen wieder erhöht [25].

2.2.3 Chronische Wunden

Chronische Wunden sind über einen längeren Zeitraum nicht heilende, offene Wunden. Die Definition dieser Zeitspanne variiert zwischen 2-3 Wochen [4] und bis zu 2 Monaten [3,44,45]. Bei chronischen Wunden ist der natürliche Heilungsprozess gestört, sodass keine Epithalisierung auftritt und der Heilungsverlauf in der Granulationsphase stagniert [44]. Meist sind Wunden die direkte Folge von Operationen, Brandwunden oder Ulzera. Dabei treten Druck- oder venöse Ulzera sowie das diabetische Fußsyndrom am häufigsten auf. Zusätzlich haben die betroffenen Patienten oft ein hohes Alter, eine geringere Blutversorgung oder eine verminderte körpereigene Immunantwort [4]. Chronische Wunden können mit einer veränderten Blutgerinnung, Entzündungs- oder Reepithalisierungsphase zusammenhängen. In jedem Fall verhindert eine gestörte Adhäsion, Migration und Proliferation der Zellen eine Wundschließung.

Chronische Wunden unterscheiden sich nicht nur im Heilungsverlauf von akuten Wunden, sondern auch in ihrer Morphologie sowie der Menge und der Zusammensetzung des Wundsekrets. Anstatt eines flachverlaufenden Wundrandes, fällt ein eher runder und fibrotischer Rand auf. Kommt es trotzdem zur Wundheilung, ist meist eine exzessive, eigenartige Narbenbildung die Folge [46]. Das abweichende, häufig vermehrt gebildete Wundexsudat unterscheidet sich in Farbe, Konsistenz und in den einzelnen Inhaltsstoffen teilweise beträchtlich von dem normalen Wundsekret, das meist honigfarben und wässrig ist. In Folge einer Infektion kann das Sekret aber auch blutig oder eitrig und hochviskos vorkommen. Außerdem enthält es deutlich mehr Proteasen und eine veränderte Zahl und Zusammensetzung an Zytokinen und

Wachstumsfaktoren [35]. Das gestörte Verhältnis von Proteasen zu TIMPs beschreibt eine zu hohe Konzentration an Elastasen und MMPs und eine zu geringe TIMP-Konzentration. Bei chronischen Wunden steigt im Vergleich zur akuten Wundheilung die Menge der Proteasen auf einen bis zu 30-fach höheren Wert an und bleibt über einen längeren Zeitraum konstant. Dieses Ungleichgewicht ist vermutlich das Ergebnis einer gestörten Inhibition der Protease-Expression [36]. Die Folgen sind ein vermehrter Abbau der Bestandteile der EZM, wie Fn, Kollagen und Elastin [35]. Durch die erhöhte Zahl an Proteasen kommt es zudem zur Degradierung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen Proteinen, wodurch die Migration der Keratinozyten verhindert wird. Ein Rückgang dieses abnormalen Wundsekrets ist meist ein Indiz für die fortschreitende Wundheilung. Neben der exzessiven Exsudatbildung, können chronische Wunden auch Folge einer zu geringen Exsudation sein. Ein zu trockenes Wundmilieu verhindert eine ausreichende Wundreinigung, dadurch besteht eine erhöhte Infektionsgefahr und eine verminderte Heilungsfähigkeit [47].

2.2.4 Wundinfektionen

Eine der häufigsten und gefährlichsten Folgen von chronischen Wunden ist eine Infektion der Wunde. Auch akute Wunden sind mit einer Vielzahl an Bakterien kolonisiert, allerdings entsprechen die in ihrer Art und Anzahl meist der normalen Hautflora [4]. Ein Grenzwert zur Infektionsauslösung wurde bisher noch nicht einheitlich definiert (European Wound Management), daher wird eine vorliegende Infektion anhand der klinischen Symptomatik des Wundstatus klassifiziert [48]. Die Ausbildung der Infektion hängt neben der Anzahl und der Art der Bakterien auch von dem immunologischen Status des Patienten ab [3,48]. Chronische Wunden sind fast immer mit einer hohen Zahl verschiedener Bakterienarten kolonisiert, so wurden in über der Hälfte der chronischen Ulzera mindestens 5 oder 6 verschiedene Spezies nachgewiesen [5].

Die in Wunden vorkommenden Bakterien gehören größtenteils zur Gattung *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Corynebacterium*, *Enterobacter* oder *Proteus* [5,6,9,49,50]. Die studienübergreifend am häufigsten vorkommenden Keime in Wunden sind *Staphylococcus aureus* und *P. aeruginosa* [5,6,9,50-52]. Die Zahl der gramnegativen Keime, wie *P. aeruginosa*, nahm in den vergangenen Jahren immer weiter zu [6]. *P. aeruginosa* ist nicht nur eines der am meisten vorkommenden Bakterien, sondern auch einer der häufigsten Verursacher schwerwiegender Infektionen [5,51].

Für das Auftreten und den Grad einer Infektion ist hauptsächlich die Virulenz des Bakteriums verantwortlich. Zur Virulenz gehören die Produktion und die Freisetzung von Toxinen sowie bakterielle Synergien, z.B. in Form eines Biofilms. Die Biofilmbildung ist bei chronischen Wunden, im Vergleich zu akuten Wunden, um den Faktor 10 erhöht [53]. Die größte Gefahr von biofilmbildenden Bakterien, wie *P. aeruginosa* sind ein schneller Aufbau der Antibiotikaresistenz, eine geringe Sensitivität zur Immunabwehr des Wirts und eine erhöhte Virulenz [54]. Die Antibiotikatoleranz ist im Vergleich zu planktonischen Bakterien um das 10-1000-fache erhöht [4]. Vor allem *S. aureus* und *P. aeruginosa* sind deshalb die häufigsten antibiotikaresistenten Bakterien und kommen ebenfalls multiresistent vor, was die therapeutischen Möglichkeiten erheblich einschränkt und mit einem besonders hohen Risiko einer Sepsis einhergeht [4,5,9,50].

2.3. Infektionen mit *P. aeruginosa*

Das gramnegative, fakultativ anaerobe und ubiquitär vorkommende Bakterium *P. aeruginosa* kann lebensbedrohliche Infektionen hervorrufen. *P. aeruginosa* ist weltweit für 10-15% aller nosokomialen Infektionen verantwortlich [10] und eines der wichtigsten humanpathogenen Keime mit zunehmender Bedeutung [6,55]. Immunsuppressive Patienten der Zystischen Fibrose, AIDS oder Diabetes mellitus sowie ältere Menschen sind besonders häufig von *P. aeruginosa* Infektionen betroffen, die nicht selten über eine Sepsis zum raschen Tod führt [9,10]. Charakteristisch für *P. aeruginosa* ist seine hohe Anpassungsfähigkeit. Diese ermöglicht es dem Keim unterschiedlichste Habitats und Nahrungsquellen zu nutzen, es können ebenso Infektionen des respiratorischen Systems, wie des Harntraktes oder der Hornhaut, auftreten [10,56]. *P. aeruginosa* ist nach *S. aureus* das häufigste Bakterium in chronischen Wunden und führt im Vergleich zu anderen Bakterien zu einer signifikanten Wundvergrößerung [5,6,50,52].

Eine Vergleichsuntersuchung von kolonisierten Ulcus cruris Wunden zeigte, dass die Zahl der MRSA Keime in den letzten Jahren zurückging, aber die Summe der gramnegativen Erreger signifikant zunahm [6]. Eine mögliche Ursache für die große und schnelle Verbreitung dieser Bakterien ist die entstehende „gramnegative Lücke“ von lokal anwendbaren Antiseptika, wie z.B. das häufig verwendete Triclosan [57]. Aus Wunden isolierte *P. aeruginosa* zeigen sich in 70% bis über 90% antibiotikaresistent, weshalb die Behandlungsmöglichkeiten stark eingeschränkt und die Heilungsaussichten schlecht sind [5,9]. Seine Fähigkeit nahezu alle Gewebe-

arten zu befallen und schwerwiegende Infektionen auszulösen, liegt neben der niedrigen Antibiotikasensitivität und der hohen Anpassungsfähigkeit, vor allem an den vielen, breit gestreuten Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* [58].

2.3.1 Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*

Für das Auftreten und die Schwere einer Infektion sind hauptsächlich die Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* verantwortlich. Die Infektion verläuft in den folgenden drei Schritten ab:

1. Adhäsion
2. Invasion und Intoxikation
3. Popularisation

Die Adhäsion inkludiert die zelluläre Anheftung und die erste Kolonisation der Bakterien. Das gelingt *P. aeruginosa* über seine zellassozierten Virulenzfaktoren, wie Haftpili, Alginate- oder Glykokalyx-Schleim oder kohlenhydratbindende Proteine, wie Lektine. Die Kolonisation ist oftmals mit einer ersten Intoxikation durch verschiedene Virulenzfaktoren, wie den Exotoxinen der Sekretionssysteme verbunden. An der darauffolgenden Invasion sind hauptsächlich Exoenzyme und Proteasen beteiligt, die in der Lage sind, die körpereigenen Barrieren zu zerstören. Die anschließende Entwicklung zur systemischen Infektion sowie die einzelnen toxischen Wirkmechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt [10,55,59].

Die an der Invasion und Intoxikation beteiligten Exotoxine und Exoenzyme werden über diverse Sekretionssysteme (Typ 1-6) in das umgebende Medium oder direkt in die Wirtszelle abgeben. Zu letzterem zählt das Typ 3 Sekretionssystem (T3SS), das die Exoenzyme S (ExoS) und ExoT sowie ExoU und ExoY direkt in die Wirtszelle injiziert [10]. Dabei wirken ExoS und ExoT als GAP-Aktivatoren und aktivieren die drei Hauptklassen der Rho-GTPasen, wodurch eine Störung des F-Aktins und der FA initiiert wird [41]. ExoS steht im Zusammenhang mit der Hemmung der eukaryotischen DNA-Synthese. ExoT ist dem ExoS in seiner Struktur und Wirkung sehr ähnlich, entsprechend bedingen beide einen direkten Zelltod. ExoU ist das toxischste dieser T3SS-Toxine und greift vermutlich direkt die Plasmamembran an. Die meisten Stämme tragen entweder Gene für ExoS oder ExoU in sich [10].

Die Komponenten des Typ2SS sind extrazelluläre Proteine, insbesondere Proteasen, wie Pseudolysin, Pseudomonas Elastase (PE) genannt oder die Serinprotease Staphylolysin, als Elastase A bezeichnet. Zusätzlich werden Protease IV, Exotoxin A und weitere Enzyme, die den Metabolismus von Lipiden beeinträchtigen, über T2SS freigesetzt. Exotoxin A wirkt nekrotisch und ist an der Kolonisierung, Invasion und Immunsuppression beteiligt, jedoch sind die einzelnen

Wirkmechanismen noch unklar. Fest steht, dass es die Proteinbiosynthese hemmt und Exotoxin A Antikörper im Blut von Patienten eine höhere Überlebenschance bewirken [10]. Die proteolytischen Enzyme wie PE, Staphylolysin oder die Alkaline Protease (AprA) des T1SS sind vor allem an der Auflösung der Wirtsbarriere und damit an der Invasion des Bakteriums beteiligt [10,55]. Die Rolle von AprA ist noch ungewiss, es wird aber vermutet an der Degradierung der Komponenten der Basallamina, wie Kollagen und Laminin beteiligt zu sein [60]. PE und Staphylolysin haben elastolytische Eigenschaften [61], dabei verstärkt Staphylolysin nur die Aktivität von PE, indem es die Glycin-Glycin-Verbindung im Elastin spaltet und damit Elastin für andere Proteasen, wie PE sensitiver wird [10]. Elastin ist einer der Hauptbestandteile von Blutgefäßen und sämtlichen Gewebestrukturen und wird direkt von PE zerstört. Dementsprechend spielt PE die vermeintlich größte Rolle bei der Invasion und Verbreitung von *P. aeruginosa* im Wirt (siehe 2.3.2). Darüber hinaus verursacht PE hämolytische Nekrosen, verringert das Zellwachstum und greift das Immunsystem an [62-64]. Intrazellulär hängt PE mit dem von der Zelldichte abhängigen Kommunikationsmechanismus, Quorum Sensing (QS) zusammen [65], allerdings sind weder die extra-, noch die intrazellulären Funktionsmechanismen von PE komplett aufgeklärt.

Der QS-Signalweg ist in die Synthese einer Vielzahl an Virulenzfaktoren und insbesondere in die Ausbildung von Biofilmen und damit in die Popularisation der Bakterien involviert. Der QS-Mechanismus dient der Kommunikation der Bakterien untereinander und dem Verhalten der Population allgemein und zielt auf die Expression spezifischer Gene ab. Gesteuert wird QS über den die bakterielle Dichte empfindenden Autoinducer (AI), der bei niedriger Bakteriendichte in geringerer Menge produziert wird. Ab einem bestimmten Schwellenwert bindet AI an einem spezifischen Protein, dieser Komplex haftet an einer bestimmten DNA-Sequenz und verstärkt damit ihre Transkription. Eine besondere Bedeutung bekommt QS bei der Biofilmbildung, die erst ab einer gewissen Populationsgröße auftritt. Biofilme von *P. aeruginosa* können auf einer Vielzahl an Oberflächen wachsen, wie medizinischen Instrumenten, Implantaten, etc., aber ebenso in bestimmten Körperregionen, wie der Lunge oder in einer Wunde. Der Biofilm schützt das Bakterium vor den Abwehrmechanismen des Wirts und bedingt eine stark erhöhte Antibiotikaresistenz [10,65].

P. aeruginosa besitzt zwei verschiedene QS-Systeme: las und rhl. Las ist unter anderem für die Produktion von PE, Staphylolysin und Exotoxin A verantwortlich und rhl bestimmt z.B. die Synthese von ExoS, AprA und Rhamnolipid. Rhamnolipid kann Phospholipide aus Zellmembranen lösen, wirkt nekrotisch und zerstört Lipide und Lecithin. Die beschriebenen QS-

Systeme sind eingespannt in ein kompliziertes, regulatorisches Netzwerk [10]. Auch das Pigment Pyocyanin, das für die signifikant blau-grüne Farbe bei *P. aeruginosa* Infektionen verantwortlich ist, ist z.B. QS-gesteuert [55]. All diese Faktoren der QS-Toxine (PE, Staphylolysin, Exotoxin A, AprA, Pyocyanin, Rhamnolipid) sind an der Invasion, der Verbreitung und der systemischen Infektion bzw. Entzündungsantwort beteiligt [59]. Darüber hinaus verfügt *P. aeruginosa* noch über weitere Virulenzfaktoren [10], die hier nicht alle beschrieben werden.

2.3.2 *P. aeruginosa* Elastase (PE)

Die M4-MP Pseudolysin (EC 3.4.24.26), auch unter dem Namen Elastase B (lasB) oder Pseudomonas Elastase (PE) bekannt, ist die Hauptprotease von *P. aeruginosa* und erfüllt eine Schlüsselfunktion als Virulenzfaktor [66]. Isoliert, charakterisiert und kristallisiert wurde diese toxische Protease zum ersten Mal 1965 und der Klasse der hydrolytisch spaltenden Peptidasen zugeordnet (Abb. 11) [67].

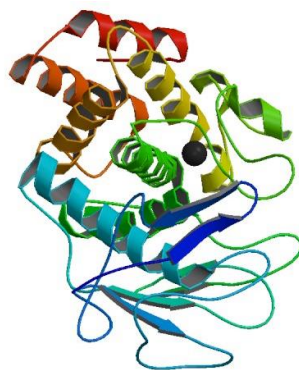


Abb. 11: 3-dimensionale Struktur von Pseudolysin (PE). Das Zink-Ion in der Mitte ist als schwarze Kugel dargestellt. Die Abb. wurde von RCSB Protein Data Bank (1EZM), mit Genehmigung von Thayer et al [68], übernommen.

Diese Proteasen katalysieren über einen nukleophilen Angriff eines Wasserstoffmoleküls und unter Koordination eines Metallions die Spaltung von Peptidgruppen [7]. Ein Zinkion (Zn^{2+}) dient dabei über eine Erhöhung der Nukleophilie des Wassermoleküls der Aktivierung der Katalyse sowie der Stabilisierung des Übergangszustandes. Strukturell ist das Zn^{2+} vierflächig über drei Aminosäuren und das Hydroxidion im aktiven Zentrum stabilisiert. Zu den Liganden zählen zwei Histidine und ein Glutamin, womit sich eine Sequenz von HEXXH ergibt [66,69].

Der exakte katalytische Spaltmechanismus wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Eine Hypothese beschreibt, dass die AS Glutamin zunächst als Protonenakzeptor fungiert und ein Proton des Wassers bindet. Das ermöglicht dem metallgebundenen Hydroxidion die Peptidbindung

nukleophil anzugreifen, wodurch ein Übergangszustand entsteht, der über weitere AS im aktiven Zentrum und das Zn^{2+} stabilisiert. Im nächsten Schritt agiert Glutamin als Säurekatalysator und gibt das Proton an das Amin der gespaltenen Peptidbindung ab. Nach der Spaltung verlassen die Spaltprodukte das aktive Zentrum und ein Wassermolekül wird erneut vom Zn^{2+} gebunden, sodass eine neue Spaltung katalysiert werden kann (Abb. 12) [66,69].

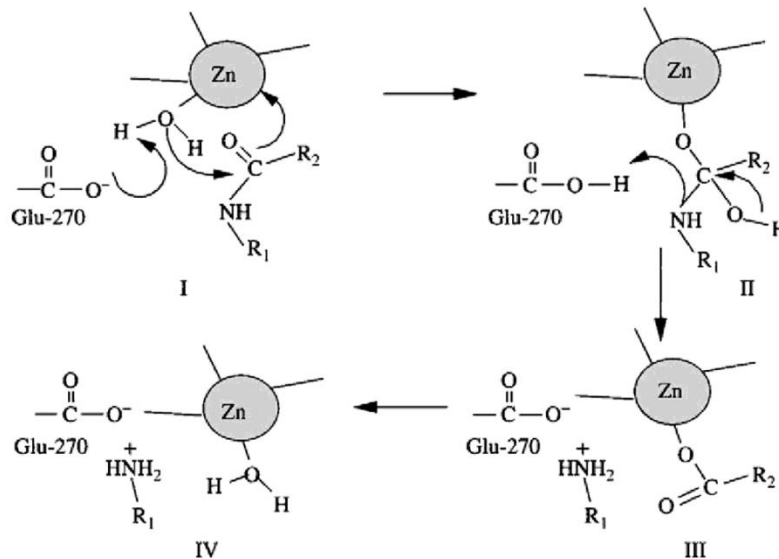


Abb. 12: Möglicher Katalysemechanismus einer Carboxypeptidase A. mit Genehmigung aus dem „Handbook of proteolytic enzymes“ von Barrett, Woessner und Rawlings [66].

PE wirkt auf drei unterschiedlichen Ebenen virulent. Es schädigt das Wirtsgewebe, verhindert die Immunabwehrmechanismen und führt intrazellulär zur Ausbildung von Biofilmen. PE ist hauptverantwortlich an der Intoxikation, der Invasion und der Verbreitung von *P. aeruginosa* im Wirt beteiligt und trägt entscheidend zur Entwicklung aus einer lokalen Wundkolonisation über eine chronische Infektion der Wunde bis hin zur systemischen Sepsis bei [10,70]. Dem Bakterium dient PE in erster Linie zur Akquirierung von Nährstoffen, indem es unterschiedliche Proteine spaltet und damit das bakterielle Wachstum unterstützt [55]. PE spaltet eine Vielzahl an humanbiologisch bedeutsamen Proteinen, was eine breit gestreute Virulenz verursacht [59]. In einer Studie an Mäusen führte ein Defekt im Gen zur Synthese von PE dazu, dass sich *P. aeruginosa* nicht im Wirt verteilen konnte. Im Vergleich zu den harmlosen *P. aeruginosa* Stämmen ohne PE-Gen, bei denen eine systemische Infektion wesentlich seltener auftrat, kam es bei intaktem PE-Gen zu viel gravierenderen Infektionen [12]. Eine weitere Studie hat bei nicht-letalen *Pseudomonas*-Stämmen gezeigt, dass diese in Kombination mit PE dennoch Mortalität auslösen [13].

PE-produzierende Stämme sind in der Lage Proteine aus Wundexsudat und humanen Haut-Biopsien zu degradieren und so Gewebe direkt zu schädigen [63]. Die Wirkmechanismen, die zum Abbau der Proteine der EZM und zu einer erhöhten Permeabilität des Gewebes beitragen, sind noch nicht umfassend geklärt. PE baut verschiedene Kollagene, Elastin und Fibrin ab und wirkt unter anderem gegen Hämoglobin, Fibrinogen und Laminin aktiv [70-72]. Aufgrund dieser nekrotischen Wirkung stört PE den Wundheilungsprozess massiv. Zudem degradiert PE die an der Zellanheftung involvierten Proteoglykane Fn, Vn und Decorin [73,74]. Diese Schädigung verursacht in Zellkulturen das Auftreten einer Anoikis, einem durch Ablösung bedingten Zelltod [73,75-77]. PE-defiziente Stämme zeigten keine oder nur eine geringe Zellablösung [75]. PE wurde an verschiedenen Epithel- und Endothelzellen das Verursachen einer erhöhten Permeabilität nachgewiesen, die durch die Auflösung von Zellkontakten, wie TJ und AJ, entsteht. Dies lässt eine Beteiligung von PE an der systemischen Verteilung von *P. aeruginosa* im Wirt vermuten [78-81]. Die gerüstbauenden Bestandteile der TJ und AJ organisieren und kontrollieren ebenfalls die Lokalisation anderer TJ-Komponente und die Verbindung zum Aktin-Zytoskelett. PE ist folglich als Virulenzfaktor für die Permeabilitätssteigerung und die Zellablösung hauptverantwortlich [23].

Die verringerte Zelladhärenz, damit die erhöhte Permeabilität aufgrund von zerstörten Zellkontakten lassen sich auf eine erniedrigte Anzahl an interendothelialen Verbindungsproteinen, wie Cadherin, Occludin [76], Claudin, Tricellulin [78] und ZO-1-3 [82-84] durch PE-Zugabe in Zellkulturen zurückführen. Die dafür ursächlichen Mechanismen sind noch nicht vollkommen aufgeklärt. PE beeinflusst verschiedene Signalwege der Zelle, allen voran den MAPK-Signalweg [85]. Das zeigt sich unter anderem an den veränderten Konzentrationen des nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) [78], des Epidermal Growth Faktor Rezeptors (EGFR) [82], der extrazellulär Signal-regulierten Kinase 1 und 2 (ERK) [85] und der Proteinkinase C (PKC) [82] sowie der Rezeptoren uPAR [73] und Proteinase aktivierender Rezeptor-2 (PAR-2) [78]. Damit werden fundamentale Prozesse, wie Zellwachstum, Proliferation und Apoptose beeinträchtigt [63]. Die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Signalwegen und den Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel sind größtenteils noch unbekannt.

Der von PE gespaltene Rezeptor uPAR interagiert mit Integrinen und reguliert die Expression von TJ-Proteinen. Folglich ist uPAR ebenfalls an der Adhärenz, der Permeabilität und der Migration der Zellen beteiligt und gilt als Hauptzelladhäsions- und Überlebensrezeptor. Er bindet nicht nur direkt Proteine der EZM, sondern ist ebenfalls in die Regulation anti-apoptotischer und anti-Anoikis Signalwege involviert. PE spaltet uPAR an zwei Stellen, was die Fähigkeit der

Zellen Urokinase zu binden drastisch reduziert und ein potentieller Auslöser für die mit PE einhergehende Zellablösung und -tod darstellt [73,75]. Es wurde nachgewiesen, dass PE die PAR-2 Expression erniedrigt. PAR-2 ist an der Zelladhärenz und der intrinsischen Interaktion mit Vn und Integrin beteiligt [78].

PE hemmt die PKC, was vermutlich eine Verlagerung der TJ-Proteine ZO-1 und Occludin auslöst und eine Restrukturierung des Zytoskeletts induziert [82]. Damit wird die Auflösung der Zellkontakte und gleichzeitig eine Umstrukturierung des F-Aktins bedingt, die sich in morphologischen Veränderungen, in Form von komprimierten Aktin-Brennpunkten am Zellkortex, Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien als auch in einer geringere Anzahl an F-Aktin-Fasern äußert [82,86].

Weitere Studien fanden heraus, dass PE, den EGFR phosphoryliert und darüber den nachgelagerten ERK-1/-2 Arm der MAPK-Kaskade aktiviert [87]. Eine mögliche Ursache ist die proteolytische Spaltung von PARs. Der MAPK-Weg kontrolliert fundamentale Prozesse der Zelle, wie Wachstum, Proliferation und Differenzierung [88] sowie Migration [89] und Apoptose [90]. Mit dem Eingriff in die MAPK hat PE einen großen Einfluss auf den gesamten Zellstoffwechsel. Über die von PE aktivierte EGFR/MAPK wurde die Phosphorylierung von RhoA-GTPasen beobachtet, die morphologischen Veränderungen des F-Aktins auslösten [86]. Das lässt vermuten, dass der MAPK Stoffwechselweg an der PE-induzierten TJ-Zerstörung und zytoskelettalen Umstrukturierung beteiligt ist und dieser auch die Ursache der Delokalisation von ZO-1 von der inneren Membran zum Zytosol zusammenhängt [86]

Darüber hinaus hat PE Auswirkungen auf das Immunsystem, die genauso mit der Stimulation des EGFR/ERK-Signalwegs in Verbindung stehen. Die Phosphorylierung von ERK/MAPK stimuliert die Transkription verschiedener Zytokin-Gene über die Aktivierung des Transkriptionsregulators NF- κ B. PE bedingt damit einer erhöhte IL-8-Konzentration [85]. Außerdem steigert PE die Immunzell-Konzentration [64] und schädigt Immunglobuline, Komplementfaktoren und Zytokine, wie gamma Interferon (IFN- γ) und TNF- α [61,64,91]. Darüber hinaus ist PE in der Lage die Proliferation von Lymphozyten [14] und die Fortbewegung von Monozyten zu hemmen [55] und kann Lysozym [92] sowie die Immunglobuline G und A inaktivieren [93]. Damit kann PE einen destruktiven Entzündungskreislauf in Gang setzen, der die Elimination des Bakteriums verhindert [64].

Zusätzlich zu diesen extrazellulären Effekten des sekretierten PE, agiert es auch innerhalb der Bakterienzelle, um intrazelluläre Signalwege zu triggern [94]. Wie bereits erwähnt (2.3.1) ist es

in QS-Stoffwechselwege involviert, was die Ausbildung von Biofilmen und eine damit verbundene Antibiotikaresistenzen nach sich zieht [10,11].

Die Wirkmechanismen von PE sind vielfältig und die Zusammenhänge zu großen Teilen noch unklar. Fest steht, PE ist eine der gefährlichsten bakteriellen Proteasen, die sich unterschiedlich auf die Zelle auswirkt [14]. Entsprechend gelten potente Wirkstoffe gegen PE als vielversprechende therapeutische Alternative die hohe Erkrankungs- und Sterberate von *P. aeruginosa* Infektionen zu reduzieren [7].

2.4. PE-Inhibitoren

Das Konzept der Abschwächung von Virulenzmechanismen ist ein aktuell potentes Forschungsfeld bei der Behandlung von Infektionen unter Umgehung der klassischen Therapie mit Antibiotika [7]. Die dabei genutzten Inhibitoren von Virulenzfaktoren haben ein hohes Wirkpotenzial, ohne dabei eine bakterizide Wirkung zu entwickeln. Ein direkter selektiver Druck wird vermieden und die Gefahr der Resistenzbildung reduziert [95].

Insbesondere MP stellen aufgrund der hohen Pathogenität ein häufiges und wichtiges Zielmolekül dieser Wirkstoffdesigns dar [7]. Vorrangig PE-Inhibitoren gelten durch die Schlüsselfunktion bei Infektionen als vielversprechend [7,63,69,96,97]. Es sind unterschiedliche Arten von PE-Inhibitoren bekannt, die als natürliche, peptid-basierte oder nicht-peptidöse Inhibitoren klassifiziert werden.

Zu den natürlichen Inhibitoren zählen das oft verwendete Phosphoramidon (PA) aus *Streptomyces tanashiensis*, der Streptomyces metalloproteinase inhibitor (SMPI) aus *Streptomyces nigrescens* oder IMPI aus der Larve der *Galleria melonella* [69].

Die synthetisierten Peptid-Inhibitoren sind meist phosphor-, thiol-, oder hydroxamatbasiert. Die häufig als Dipeptid vorkommende Inhibitoren agieren als Übergangszustandsanaloga, indem sie über ihre Thiocarbonyl-, Carboxylat-, Hydroxamat- oder Phosphoramidat-Gruppe an das Zn^{2+} binden und das Wassermolekül im aktiven Zentrum ersetzen. Dadurch stellen sie ein strukturelles Analogon des tetrahedralen Zwischenproduktes dar, das während der Katalyse gebildet wird [69,98,99]. Die relevantesten PE-Inhibitoren, wie das natürliche phosphorylbasierte PA [100] oder Galaradin, fungieren ebenfalls nach diesem Mechanismus [99]. Mit PA verwandte Inhibitoren sind das Phosphoryl-Leu-Trp oder das Phosphoryl-Leu-Phe [101]. Sie inhibieren effektiv, binden stark an die Protease und werden dabei, wie die meisten Protease-Inhibitoren, nicht gespalten [98].

Bei den nicht-Peptid-Inhibitoren handelt es sich meist um metallkomplexbildende Substanzen. Diese sind z.B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), 10-phenanthroline und tetraethylene-Pentamin [7] sowie Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) [102]. Außerdem kommen kleine, metallkomplexbildende, nicht-peptidöse Inhibitoren, wie 3-Hydroxy-1-alkyl-2-methylpyridine-4(1H)-thiones (3,4-HOPTO) vor und diverse kleine hydroxamatbasierte, nicht-peptidöse Inhibitoren [103].

Die Wirkung der PE-Inhibitoren wurde bereits in biochemischen Aktivitätstests und teilweise in Zellkulturen untersucht. Auf Endothelzellen konnte der schädigende Einfluss von PE zu einem Großteil durch die Applikation von PA verhindert werden [76]. Andere Dipeptid-Inhibitoren wurden bereits erfolgreich bei der Therapie von Hornhautentzündungen im Hasenmodell eingesetzt, wo sie eine Perforation der Hornhaut komplett verhinderten [101,104]. Außerdem verringerten einige Inhibitoren die Biofilmbildung und die Antibiotikaresistenz von *P. aeruginosa* Bakterien [96,102,105]. Trotz dieser vielversprechenden Wirkung sind die meisten Inhibitoren aufgrund ihrer niedrigen Spezifität für einen pharmazeutischen Einsatz ungeeignet. Der ideale Inhibitor ist möglichst spezifisch, effizient und stabil. Außerdem sollte er nicht toxisch sein und eine schnelle Resistenzentwicklung verhindern. Die meisten PE-Inhibitoren wirken über den gleichen beschriebenen Mechanismus der Bindung des Zn^{2+} im aktiven Zentrum [7]. Damit sind sie wenig selektiv und können verschiedene MPs, unter anderem MMPs, hemmen, wie z.B. Galaradin oder PA, der unspezifisch M4-MP und M13-MP hemmt [7,106]. Dementsprechend werden für diese Inhibitoren mögliche Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen. PA hat eine Wirkung gegen die MP Thermolysin, Bacillolysin, PE und weitere bakterielle Proteasen sowie gegen die humanen MP Nephilysin-2 [107], Endothelin-konvertierende Enzyme (ECE) [108] und Angiotensin-konvertierende-Enzyme (ACE) des Blutgefäßsystems [109]. Obwohl zytotoxische Untersuchungen keinen Hinweis auf etwaige Nebenwirkungen der verschiedenen Inhibitoren zeigten [76,102,105], können diese trotzdem im Organismus auftreten. Bei der Behandlung von Wundinfektionen besteht insbesondere die Gefahr einer Störung des empfindlichen Gleichgewichts von MPs zu TIMPs. Derzeit sind noch keine spezifischen PE-oder M4-MP-Inhibitoren bekannt. Ein potenzieller neuer Inhibitor mit einem abweichenden Wirkmechanismus ist der insektenbasierte M4-MP-Inhibitor IMPI [7].

2.4.1 Der Insekten-Metalloprotease-Inhibitor (IMPI)

IMPI (Abb. 13) wurde in der Hämolymphe der Larve der Allgemeinen Wachsmotte *Galleria mellonella* entdeckt. IMPI wird während der humoralen Immunantwort unspezifisch synthetisiert [110]. Es repräsentiert den ersten natürlichen MP-Inhibitoren, der keinerlei Sequenzanalogie mit bereits bekannten Inhibitoren, wie TIMPs oder den oben erwähnten Inhibitoren (2.4), aufweist [111].

Das Peptid IMPI besteht aus 2 Hauptketten mit einem Molekulargewicht von 8,36 kDa und einem pI von 6,06. Die schwere (H)-Kette (4,694 kDa) und die leichtere L-Kette (3,681 kDa) sind über 5 Disulfidbrücken miteinander verbunden. Dadurch erhält IMPI seine stabile, hitze- und säurefeste Struktur [111,112]. Der Inhibitor konkurriert zunächst mit Substraten der MPs um die Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms, nach der Bindung wird IMPI nur sehr langsam gespalten und wirkt als hoch potentes Substratanaloga [113].

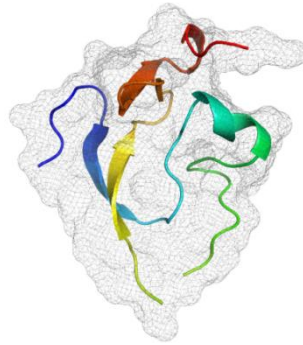


Abb. 13: Der Insekten-Metalloprotease-Inhibitor IMPI. unveröffentlichte Abbildung mit Genehmigung von Mark Salzig und Andreas Vilcinskas vom Fraunhofer IME Gießen.

IMPI gehört durch seine Ähnlichkeit zu Trypsin (Trypsin ähnlicher Inhibitor (TIL)) zur Familie der I8-Inhibitoren [106] und folgt dem „Standard-Mechanismus“ der Enzym-Inhibition [114]. Es bindet eng an die Protease und fungiert dabei als „Pseudosubstrat“, indem es ein Peptidsubstrat nachahmt. Der gebundene Loop von IMPI wird sehr langsam über Hydrolyse gespalten (Abb. 14), allerdings bleiben die Disulfidbrücken von IMPI über die Spaltung hinweg bestehen, wodurch das geteilte Peptid wie ein Keil in dem aktiven Zentrum der Peptidase eingeklemmt bleibt. Die jeweiligen Reste des gespaltenen Inhibitors können wiedervereinigt werden, das impliziert jedoch eine Peptidylsynthaseaktivität von Thermolysin bei gefalteten Proteinsubstraten. Diese Bindungs-Spaltungs-Reaktion erfolgt reversibel nach Formel 1. Dementsprechend resultiert nach Trennung des Enzym-Inhibitor-Komplexes entweder die gespaltene oder die intakte Inhibitor-Form [110,113].

FORMEL 1: $E + I \rightleftharpoons EI \rightleftharpoons EI^* \rightleftharpoons E + I^*$

E: Enzym

I: Inhibitor

I*: gespaltenen Inhibitor

Der beschriebene Hemmmechanismus erzeugte eine effiziente Wirkung gegen Thermolysin und PE, aber auch gegen Vibriolysin und Bacillolysin [15,112]. IMPI wirkt gegen bakterielle M4-MP der Thermolysin-Familie, ist aber nicht aktiv gegen andere Proteasen, wie Trypsin oder Papain sowie die bisher untersuchten MMPs, wodurch die Gefahr von schädigenden Nebenwirkungen äußerst gering ist [111]. Außerdem wurde bereits durch einen AS-Austausch in der Sequenz von IMPI ein noch effizienteres und spezifischeres Molekül mit einem auf PE ausgerichteten Wirkspektrum designt [115]. IMPI ist ein Protein aus einem natürlichen Immunsystem, womit sich die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzausbildung verringert [115,116].

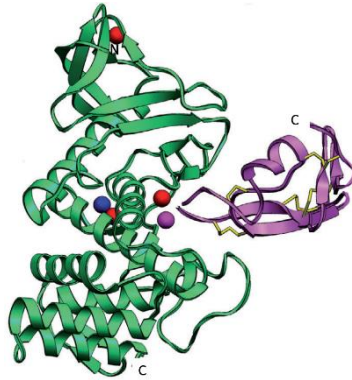


Abb. 14: Struktur des Thermolysin-IMPI-Komplexes. IMPI ist in lila und Thermolysin in grün dargestellt. Mit freundlicher Genehmigung von Arolas et al. [113].

2.5. Therapie von Wunden

Die Anforderungen an eine Wundtherapie sind aufgrund der Komplexität des Wundheilungsprozesses sehr hoch. Der Einsatz der jeweiligen Behandlungsmethode ist davon abhängig, ob es sich um eine akute oder chronische und infizierte oder nicht-infizierte Wunde handelt [3]. Besondere Anforderungen an die Wundbehandlung ergeben sich, wenn die betroffenen Wunden infiziert sind. Um sie mit geeigneten Antibiotika zu therapieren, ist die Identifikation der Mikroorganismen essentiell [4]. Bis ein Resistogramm vorliegt, wird der Einsatz eines Breitbandantibiotikums empfohlen. Systemisch applizierte Antibiotika kommen aufgrund der meist schlechten Durchblutung nur schwer an ihren Wirkungsort. Lokal aufgetragene Antibiotika führen häufig zu Resistenzen, die oftmals in der Ausbildung eines Biofilms begründet liegt [3,54,117]. Daher wird die lokale Anwendung eines Antiseptikums empfohlen [3]. Die meisten

Antiseptika sind jedoch nur begrenzt gegen gramnegative Bakterien wirksam [6] und hemmen zusätzlich die Zellproliferation, die Resynthese von Ersatzgewebe und die Immunantwort [3]. Beim Auftreten von Biofilmen oder schweren Infektionen mit tiefen Nekrosen oder Ulzera werden häufig Wunddebridements durchgeführt. Dabei werden bakterizide Beläge und das nicht funktionsfähige, nekrotische Gewebe abgetragen und so die Wunde gereinigt. Anschließend soll ein physiologisches Wundmilieu zum Neuaufbau des Gewebes beitragen. Die unterschiedlichen Debridements werden in chirurgische, mechanische, autolytische und enzymatische Formen unterteilt [3,4].

Das klassische Debridement mit chirurgischen Instrumenten ist meist sehr effektiv, jedoch kommt es dabei zu Blutungen, Schmerzen und vor allem zum Entfernen von gesundem Gewebe. Außerdem ist es mit hohen Kosten und großem Aufwand verbunden [3,4].

Die mechanischen Methoden sind vielseitig, dabei kann z.B. mit Hilfe von H₂O₂, der Applikation von Sand sowie Wasserstrahl, Ultraschall oder Laser das Gewebe abgetragen werden [3,118]. Obwohl dadurch lebende Zellen zerstört werden können, sind die mechanischen Formen häufig weniger effizient. Die Vorteile liegen in einer meist einfachen Anwendung, günstigere Kosten und z.B. H₂O₂ wirkt zusätzlich antimikrobiell [3,4].

Eine Sonderform des Debridements stellt die biochirurgische Methode der Madentherapie dar [45]. Dabei wird das nekrotische Gewebe schonend und schmerzfrei unter Bewahrung des gesunden Gewebes abgetragen. Jedoch ist dieses Verfahren relativ teuer, zeitintensiv und die Akzeptanz der Patienten gering. Darüber hinaus fehlen fundierte Beweise an großen Patientengruppen [119].

Beim autolytischen Debridement bedingt ein feucht warmes Wundmilieu die körpereigene Fähigkeit die Wunde zu reinigen [4,45]. Häufig kommt es dabei zur Anwendung von Hydrogelen. Es ist zwar zeitintensiv, aber äußerst schonend und kann unter Umständen sehr effektiv sein. Teilweise werden Wirkstoffe und antimikrobielle Substanzen, wie z.B. Silber oder wie beim enzymatischen Debridement Hydrogele versetzt mit Proteasen angewendet [3,4].

Neben den bei der Wundbehandlung am häufigsten eingesetzten antibakteriellen Wirkstoffen [4], werden auch Wachstumsfaktoren oder Ergänzungspräparate, wie Vitamine oder Mineralien eingesetzt [45]. Zur Auflösung von Biofilmen tragen Stoffe wie Salizylsäure, Xylitol oder Erythritol bei [54], die häufig mit einem Antibiotika kombiniert werden [4]. Ein weiterer, neuer Therapieansatz bei ausgebildeten Biofilmen ist die Behandlung mit QS-Inhibitoren wie Furanone bei *P. aeruginosa* [4]. Außerdem befindet sich die erwähnte Inhibitor-Therapie (siehe

2.4) in der Entwicklung und zählt zu einem der erfolgversprechendsten Ansätze [7]. Jeder eingesetzte Wirkstoff muss in einer geeigneten Formulierung appliziert werden, um eine Wirkung überhaupt zu ermöglichen.

2.5.1 Anforderungen an eine Wundformulierung

Nur in einer geeigneten Formulierung können Wirkstoffe ihre Funktion erfüllen. An die jeweiligen Formulierungen werden bestimmte Anforderungen im Hinblick auf die Therapie, den Wirkstoff und die Applikationsform gestellt. Bei der Anwendung auf Wunden ist in erster Linie eine Toxin- und Allergenfreiheit sowie Biokompatibilität gefordert. Außerdem werden eine schmerzfreie Applikation, die Erzeugung einer feuchten Wundumgebung sowie okklusive Eigenschaften postuliert [3,120].

Bereits in den 60er Jahren wurde bewiesen, dass das Prinzip der feuchten Wundbehandlung die Heilung verbessert [3,45,121]. Ein feuchtes Wundmilieu fördert die Granulation und die Epithalisierung, verhindert die Austrocknung und eine erneute Gewebeschädigung. Okklusive bzw. halbokklusive Formulierungen schützen zusätzlich vor weiteren Schädigungen und Neuinfektionen [3,4,45]. Diese Erkenntnisse haben zur Entwicklung verschiedener Wundformulierungen und -auflagen geführt. Interaktive Wundauflagen beschleunigen die Wundheilung, indem sie ein physiologisches Milieu schaffen sowie überschüssiges Sekret aufsaugen und einschließen. Außerdem ermöglichen sie meist einen Gasaustausch von O₂, CO₂ und Wasserdampf, bilden eine Barriere gegen Mikroorganismen und dienen der Wärmeisolation. Darüber hinaus ist ein atraumatischer Verbandswechsels mit einfacher Handhabung und niedrigen Kosten möglich. Im Vergleich zu inaktiven Wundauflagen, wie Gaze oder Saugvlies, führen interaktive Wundauflagen zu einer signifikanten Verbesserung der Wundheilung. Klassifiziert werden sie in Hydrokolloide, Alginate und Hydrogele [3,45].

Der Prototyp eines Hydrokolloidverbandes ist eine selbstklebende hydrophobe Matrix mit quellbaren Partikeln [3]. Typische Bestandteile sind Cellulosen, Gelatine und Pektine. Die Matrix ist auf der wundabgewandten Seite mit einer semiokklusiven Folie überzogen, die idealerweise einen Gasaustausch ermöglicht, aber vor dem Befall von Mikroorganismen schützt. Ein Nachteil von faserhaltigen Gelen ist, dass sie beim Verbandswechsel in der Wunde hängen bleiben können [45]. Alginat-Formulierungen kommen entweder als Schaum oder als flexible Fasern vor [45]. Sie dienen primär als absorbierende Matrix und weniger als Feuchthaltemittel. Auch Hydrogele sind interaktive Wundauflagen. Sie erfüllen alle, oben genannten Anforderungen und haben somit optimale Eigenschaften zur Wundbehandlung [45,122,123]. Diverse Wirkstoffe

können zwar über interaktiven Wundaufgaben appliziert werden, werden jedoch meist in Form von Salbenkompressen aufgetragen. Salben ermöglichen einen schmerzfreien Verbandswechsel, nehmen aber kein überschüssiges Sekret auf und wirken nur partiell okklusiv [3,45].

Bei der Applikation von Wirkstoffen, speziell von Proteinen, in der Wunde werden weitere Anforderungen an die Formulierung gestellt. Generell sind Proteine schwieriger zu handhaben als kleine synthetische Moleküle. Aufgrund ihres hohen Molekulargewichts, ihrer komplexen Struktur und dem Abbau durch ubiquitär vorkommende Proteasen müssen sie über die Formulierung geschützt werden. Die Wirkstoffe dürfen nicht durch diverse Umwelteinflüsse denaturiert werden, sondern müssen in ausreichender Konzentration zu ihrem Wirkungsort gelangen. Vorteilhaft bei der Applikation in chronischen Wunden ist eine verzögerte Wirkstofffreisetzung über einen längeren Zeitraum, um häufige Verbandswechsel zu umgehen [122]. Insbesondere Hydrogele erfüllen die Anforderung bei infizierten Wunden anwendbar zu sein und den Peptidwirkstoff schützen zu können [45].

2.5.2 Hydrogele

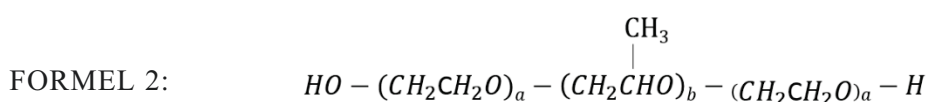
Hydrogele sind quer-vernetzte Polymer-Matrizen, die in Wasser quellen, ohne sich dabei aufzulösen. Aufgrund ihres hohen Wassergehaltes können Hydrogele die Wunde feucht halten und dennoch überschüssiges Wundsekret aufzunehmen. Sie wirken gleichzeitig okklusiv, adhäsiv und sind hoch biokompatibel. Damit haften sie gut an der Wunde und bewahren vor Neuinfektionen. Weitere Vorteile sind eine einfache und schmerzfreie Applikation, eine kühlende Wirkung und als mögliches Depotsystem für Wirkstoffe zu dienen. Aufgrund ihres hohen Wassergehaltes haben sie jedoch ein besonders hohes Risiko für einen mikrobiellen Befall und eine erhöhte Gefahr über Verdunstung auf der Wunde auszutrocknen [45,120,122,123] [124].

Unterschiedliche Gelbildner kommen bei der Herstellung von Wundgelen zum Einsatz, wie z.B. Hyaluronsäure (HA) [125], Polyethylenglykol (PEG) [126] und Chitosan [127]. Hydrogele werden meist mit Zellulose-Derivaten [127] oder Poloxameren gebildet [128-130]. Das Poloxamer 407 (P407) ist dafür bekannt, thermosensitive Hydrogele auszubilden. Thermosensitiv bedeutet in diesem Zusammenhang eine starke Viskositätszunahme unter Temperaturerhöhung. Hydrogele sind zum einen gut untersuchte und häufig verwendete Formulierungen zur Behandlung von Wunden und zum anderen als Trägermaterial für Wirkstoffe anerkannt [131]. Ein thermosensitives Hydrogel mit dem Gelbildner P407 ist bereits zur Behandlung von kleineren

Wunden erhältlich (Linola® Wundgel) und der Einsatz bei großen, nicht heilenden, postoperativen Wunden, Verbrennungen oder Ulzera wurde bereits beschrieben [123]. P407 hat nachweislich wundheilungsfördernde Eigenschaften [132]. Hydrogele sind bekannte Drug Delivery Systeme für Proteine und können als Depotsystem fungieren [122,133-135]. Durch ihre gute Fließfähigkeit bei Raumtemperatur ergeben sich Vorteile in der Herstellung, der Präparation und der Abfüllung der Gele sowie bei der späteren Applikation auf die Wunde.

2.5.3 Poloxamer 407

Poloxamere werden in der pharmazeutischen Industrie vor allem als Benetzungsmittel, Lösungsvermittler und Emulgatoren eingesetzt. Sie sind organische, oberflächenaktive, nichtionische Tenside in der Struktur eines Triblock-Copolymers aus einer zentralen hydrophoben Kette eines Polypropylenoxids (PPO) und zwei lateralen, hydrophilen Polyethylenoxiden (PEO) [128,136].



Der Gelbildner Poloxamer 407 ist unter Pluronic F127 oder Lutrol 127 bekannt und hat ein Molekulargewicht von 12,6 kDa. Der pharmazeutische Inhaltsstoff ist von der FDA genehmigt und in der US und Europäischen Pharmakopoe gelistet. Es ist relativ inert, nicht toxisch und nicht immunogen [128,130,136].

Funktionell ist P407 ein etabliertes thermosensitives Material, dessen Viskosität sich bei thermischer Stimulation zuerst erhöht, bis die Lösung ab einer bestimmten Temperatur geliert. Dieser charakteristische Wert des Gel-Sol-Übergangspunktes wird als Gelierungstemperatur (T_{Gel}) bezeichnet. Unterhalb dieser Temperatur ist die Poloxamer-Lösung flüssig, oberhalb davon liegt eine ausgebildete Gelstruktur vor. Für die thermische Gelierung sind eine steigende Desolvatisierung des Polymers und die Instabilität der Wasserstoffbrückenbindungen ursächlich. Dieser thermosensitive Prozess ist reversibel und kann nach mehreren Kühlungs- und Erwärmungsschritten wiederholt stattfinden [129,136].

In wässriger Lösung ist P407 bei niedrigen Temperaturen von einer Hydrathülle umgeben. Die hydrophilen PEO-Ketten bilden zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen aus. Bei steigender Temperatur dehydratisieren die PPO-Ketten, die Wasserstoffbrücken der PEO-Ketten brechen auf und desolvatisieren. Damit steigen die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den PPO-Einheiten der Polymere und es kommt zur Bildung von Mizellen, in denen die dehydratisierten PPOs, umringt von PEO-Blöcken vorliegen. Diese Mizellisierung tritt bei Überschreiten der

kritischen Mizelltemperatur oder der kritischen Mizellkonzentration durch eine erhöhte Poloxamer-Konzentration bei Temperaturen zwischen 10-40° C auf. Bei weiterer Zunahme der Temperatur oder Polymerkonzentration bilden sich zunächst kubische und schließlich hexagonale, gitterartige Strukturen aus (Abb. 15). Die immer stärkere Verknüpfung der Molekülketten führt schließlich die Ausbildung einer Gelstruktur (Abb. 15) [128,136].

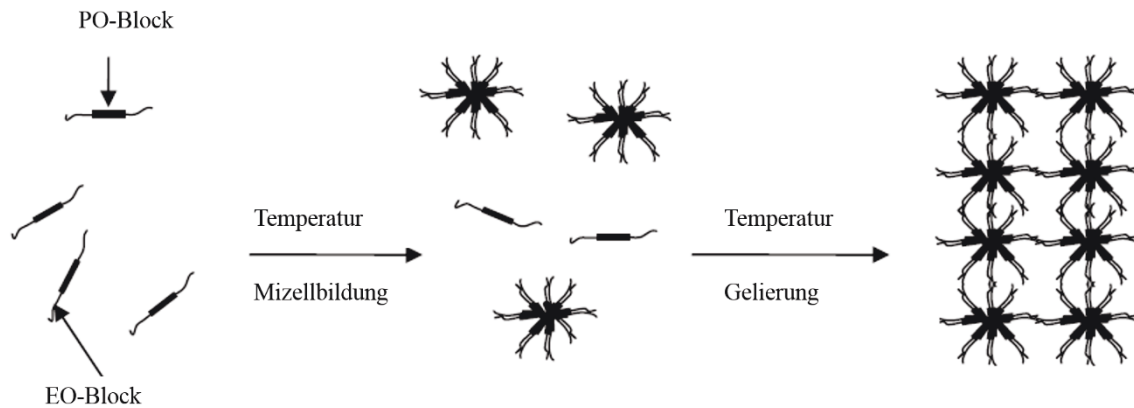


Abb. 15: Schematische Darstellung des Gelierungsmechanismus von Poloxamer 407. Erstellt nach Dumortier et al. [128].

Die treibende Kraft des Gelierungsprozesses ist der Energieeintrag durch Wärmezufuhr und die damit verbundene Entropie [137]. Die Schwingungsenergie der Moleküle steigt an und führt zu einer verminderten Lebensdauer der Wasserstoffbrücken, bis diese nahezu ungebunden vorliegen. Bezogen auf das thermodynamische Modell der Hydrathülle, existiert eine lokal höhere Ordnung der Wassermoleküle um die hydrophoben Einheiten des Polymers und es kommt zum so genannten „hydrophoben Effekt“ [138]. Mit dem Energieeintrag steigen die hydrophoben Wechselwirkungen und die Entropie der PPO-Ketten erniedrigt sich. Das führt dazu, dass die Polymere das geordnete Wasser der Hydrathülle in die Lösung niedrigerer Ordnung drücken und eine Zunahme der Entropie der Wassermoleküle hervorrufen. Das Ergebnis ist ein Anstieg der Gesamtentropie, die die treibende Kraft für die Gelierung darstellt (Abb. 16). Somit wird die Gelausbildung der Poloxamer-Lösung durch hydrophobe Interaktionen über die endothermischen Wärmeänderungen verursacht [134].

P407 Gele sind viskoelastische Materialien, deren Speichermodul (G') für elastisches Verhalten und deren Verlustmodul (G'') für viskoses Verhalten charakteristisch ist. Diese rheologisch bestimmbaren Modi verändern sich in Abhängigkeit der Temperatur. Dabei wird der Schnittpunkt von G' mit G'' häufig als Sol-Gel-Übergangspunkt beschrieben. Dieser Gel-Punkt ist jedoch nach Winter [139] frequenzabhängig.

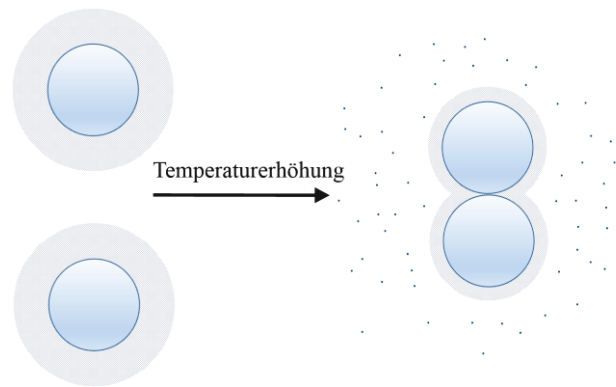


Abb. 16: Schematische Darstellung hydrophober Interaktionen. Erstellt in Anlehnung an Eriksson und Below [140].

Durch das thermosensitive Verhalten eignen sich P407-Gele besonders als Wundgele. Sie können im zunächst flüssigen Zustand appliziert werden und verfestigen sich erst bei Kontakt mit der Haut bzw. der Wunde. Die in dem Gel eingebundenen Wirkstoffe werden geschützt und die Wunde verschlossen. Gleichzeitig ist eine schmerzfreie Applikation möglich und durch den kühlenden Effekt insbesondere für Brandwunden geeignet [132]. Signifikant positive Ergebnisse in Bezug auf die Wundheilungsgeschwindigkeit wurden bereits im Modell am Schwein nachgewiesen [132].

3 Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1 Chemikalien, Proteine und Reagenzien

Tab. 1: Alle verwendeten Chemikalien, Proteine und Reagenzien.

Produkt	Spezifikation	Lieferant
4,6-Diamidino-phenylindol dihydrochlorid(DAPI)	≥98%; Art.-Nr.: 6335	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Aceton	Technical Grade; Art.-Nr.: 211007	AppliChem GmbH, Darmstadt
Acetonitril (AcN)	≥99,9% für HPLC, Art.-Nr.: 34998	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Alexa Flour®555 phalloidin	Invitrogen™; Art.-Nr.: A34055	Thermo Fischer Scientific Inc., Dreieich
Aprotinin	BioChemica BC aus Rinderlunge >90%; Art.-Nr.: A2132	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bradford Reagenz	für die Proteinbestimmung Art.-Nr.: A6932	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bovine Serum Albumin	Fraktion V, ≥98% pulv.. Art.-Nr.: 8076.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zitronensäure (wasserfrei)	mikrobiologisch produziert Art.-Nr.: 10941-0011	Fagron GmbH & Co. KG, Bars- büttel
Desinfektionsmittel	Sterillium classic pure; Art.-Nr.: EH72.4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	sterilfiltriert, Art.-Nr.: D2438	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
di-Natriumhydrogenphosphat	≥99% Art.-Nr.: P030.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Me- dium (DMEM)	3,7 g/l NaHCO ₃ , 1,0 g/l D-Glu- cose, w stable glutamine; low en- dotoxin; Art.-Nr.: FG0415	Biochrom AG, Berlin
Einschlussmedium	Roti®-Histokitt II, Art.-Nr.: T160.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eosin B	für die Mikroskopie; 4'.5'- Dibrom-2',7'-dinitroflorescein- Dinatriumsalz; Art.-Nr.: 0306.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	Art.-Nr.: 3738.5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	≥99,5% reinst Ph.Eur. Art.-Nr.: 5054.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	EU-zertifiziert; Art.-Nr.: S0615	Biochrom AG, Berlin
fluorescein isothiocyanate-la- beled Casein (FITC-Casein)	Art.-Nr.: 23267	Thermo Fischer Scientific Inc., Dreieich
Fluorogenic Peptide Substrate Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH	Art.-Nr.: ES005	R&D Systems, Wiesbaden
Glycerin (85%)	GMP conditioned, Art.-Nr.: 151690-0001	Fagron GmbH & Co. KG, Bars- büttel
Hämalaunlösung nach Meyer	sauer für die Mikroskopie, Art.-Nr.: T865.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hyaluronsäure (HA)	HyaCare® (800 kDa)	Evonik Industries AG, Essen

MATERIAL UND METHODEN

Produkt	Spezifikation	Lieferant
Kaliumchlorid	≥99%; Art.-Nr.: P017.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumsorbitat	ROTICHROM®, Art.-Nr.: NC09.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lysozym	BioChemica E.C. 3.2.1.17 22.770 U/mg; Art.-Nr.: A3711	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methyl-4-hydroxybenzoat	Art.-Nr.: 2419	Caelo & Loretz GmbH, Hilden
Natriumchlorid (NaCl)	>99,8% Art.-Nr.: 9265.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Reinst ≥95%, pure PH.Eur. Art.-Nr.: A4259	AppliChem GmbH, Darmstadt
Paraffin	Paraplast® für die Histologie; Art.-Nr.: X880.1	Leica Biosystems GmbH, Nuss- loch
Polyethylenglycol 300	PEG 300, bzw. Macrogol 300 Art.-Nr.: 200221	Euro OTC Pharma, Bönen
Polyethylenglycol 400	PEG 400, bzw. Macrogol 400 Art.-Nr.: 200222	Fagron GmbH & Co. KG, Bars- büttel
Penicillin / Streptomycin (P/S)	10.000 U/ml / 10.000 µg/ml; Art.-Nr.: A 2213	Biochrom AG, Berlin
Phenoxyethanol	CAS-Nr.: 122-99-6	Th. Geyer, Höxter-Stahle
Phosphate buffered saline (PBS)	Dulbecco´s phosphate buffered saline mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺ ; pH 7,4 Art.-Nr.: L1815	Biochrom AG, Berlin
PBS ohne Calcium und Magne- sium (PBS w/o)	Dulbecco´s phosphate buffered saline w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ ; pH 7,4 Art.-Nr.: L1825	Biochrom AG, Berlin
phosphatgepufferte Formaldehyd- lösung 4%	Roti®Hitofix 4%; säurefrei (pH 7); Art.-Nr.: P087.4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phosphoramidon (PA)	N-[α-Rhamnopyranosyloxyhy- droxy-phosphinyl]-Leu Art.-Nr.: EI006	R&D Systems, Wiesbaden
Poloxamer 188 (P188)	Koliphor®P 188, Lutrol®F68; Art.-Nr.: 15759	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Poloxamer 407 (P407)	Pluronic® F 127; Lutrol® F 127; Art.-Nr.: 701082-0002	Fagron GmbH & Co. KG, Bars- büttel
Propyl-4-hydroxybenzoat	Art.-Nr.: 2556	Caelo & Loretz GmbH, Hilden
Propylenglykol	Art.-Nr.: 200749	Fagron GmbH & Co. KG, Bars- büttel
Pseudolysin (PE) aus <i>Pseudomo- nas aeruginosa</i> PAO1	EC 3.4.24.26; 260 U/mg Art.-Nr.: PE 961	Elastin products Company, Ownsville, USA
Salzsäure, HCl	1 M, endotoxinarm; Art.-Nr.: 480592	Merck, Darmstadt
Thermolysin aus <i>Bacillus thermo- proteolyticus</i> rokko	EC 3.4.24.27; 40 U/mg Art.-Nr.: 88303	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trifluoressigsäure (TFA)	≥99% Art.-Nr.: 302031-10X 1ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris-(hydroxymethyl-aminome- than (TRIS))	TRIS-Pufferan® ≥ 99,9% Art.-Nr.: 4855.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton®-X-100	Art.-Nr.: 3051	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Trypanblau	0,4% steril-filtriert, Art.-Nr.: T8154	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin; 0,02% EDTA in PBS; Art.-Nr.: L 2143	Biochrom AG, Berlin
WST-1-Reagenz	Cell Proliferation Reagent Art.-Nr.: 11644807001	Roche Diagnostics, Mannheim

Produkt	Spezifikation	Lieferant
Xylol-Ersatzmedium	RotiClear® Art.-Nr.: A538.5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Spezifikation	Hersteller/Lieferant
96-Well platte, weiß	nunc™, Art.-Nr.: 236105	Thermo Fischer Scientific Inc., Dreieich
Cell culture Inserts	Art.-Nr.: 80209	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
Cellulose-Ester-Membran	ME 24 Whatman™ Membran Filter; Porengöße: 0,2 µm; Ø: 25 mm	GE Healthcare, München
Einbettkassetten	Rotilabo®, POM	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Gaze (Gazin® Mullkompressen)	10x20 cm steril; Art.-Nr.: 13 623	Lobmann + Rauscher, Neuwied
Gewebekulturflaschen 25 mm ² / 75 mm ²	Schräghals mit Belüftungskappe Art.-Nr.: 83.1810.002/ Art.-Nr.: 83.1813.002	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
HPLC-Säule	RP C18; 250 mmx4 mm LiChro- CART®125-4 Phenomenex® Inc.	VWR®, Darmstadt
Mikrotom Klingen	DB80 LX microtome blades low profile; Art.-Nr.: 113443 270	Leica Biosystems GmbH, Nuss- loch
Objektträger	Super Frost Color Art.-Nr.: VO-9-21202	Vogel GmbH & Co. KG, Gießen
Pasteurpipetten	Kurz und lang	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Petrischalen für <i>ex vivo</i> Modell	sterilisiert, Ø: 35 mm; h: 10 mm; Art.-Nr.: 82.1135.500	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Reaktionsgefäße Low binding	1.5 ml; Art.-Nr.: 72.706.600	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Skalpell	Surgical Disposable Scalpel # 21	Braun, Melsungen
Software Datenanalyse	OriginPro 8.5®	OriginLab, Northampton, USA
Serologische Pipetten	Steril, diverse Größen	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Sterilfilter	Spritzenvorsatzfilter; 0,22 µm	Merck, Darmstadt
Zellkultur Mikroplatte (12-Loch)	für adhärenente Zellen, Art.-Nr.: 734-2324	VWR®, Darmstadt
Zellkultur Mikroplatte (96-Loch)	Flat Bottom with lid, cell culture treated; Art.-Nr.:83.1835.300	Corning, USA
Zellkultur Mikroplatte (96- Loch), für die Fluoreszenz- Mikroskopie	polymer coverslip, tissue culture treated, sterilized, schwarz; Art.-Nr.: 89626	Ibidi GmbH, Martinsried

3.1.3 Geräte

Tab. 3: Alle verwendeten Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	ABS 120-4	Kern, Balingen
Ausbettstation		PSI, Basel, Schweiz
Biopsie-Punch	Ø 4 mm; Art.-Nr.: 12L19	Stiefel, München
Brutschrank für <i>ex vivo</i> Modell	Lamin Air, Model 1,2	Heto-Holten A/S, Allerod, Dänemark
Brutschrank Zellkultur	CO ₂ -Cell 170 Standard	MMM Group, München

MATERIAL UND METHODEN

Gerät	Typ	Hersteller
Durchlichtmikroskop: Kamera Software Objektiv 5x Objektiv 10x	DM IL LED Typ 090-135.001; MC 170 HD LAS V3.6 0.22 PH1 0.12 PH0	Leica Microsystems, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop: Kamera Objektiv 10x Objektiv 63x Öl-Immersion Software	DMI 6000 DFC 360 Fx NA 0.3 NA 0.9 LAS AF Lite	Leica Microsystems, Wetzlar
Franz-Diffusionszelle	Oberfläche: 1,76 cm ² Rezeptor- volumen: 12 ml	Gauer Glas, Püttlingen
Hautschere	Modell Turmspitze; Wepa	Apoline
Haarschneider	Precise Select 2570.0	WIK, Essen
Hautstanzen	Ø 10 mm	
Heizblock mit Magnetrührer	VARIOMAG® Poly	Thermo Fischer Scientific Inc., Dreieich
Heizplatte mit Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwab- ach
HPLC Anlage: Autosampler Dioden Array Detektor Pumpe Säulenofen HPLC-Software	L-2200 L-2455 L-2130 L-2300 EZChrome EliteClient	VWR®-Hitachi, Darmstadt Agilent Technology, Santa Clara, USA
Inkubator	Environment shaker-incubator, ES-20	MAGV, Rabenau-Londorf
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop: Objektiv 10x Objektiv 63x Software	TCS SP5 NA0.3 NA1.2 LAS AF Lite	Leica Microsystems, Wetzlar
Laborwaage	PCB	Kern, Balingen
Mikroskop-Kamera	CytoSMART™ Lab assistant	Cytomate Technologies BV, Eindhoven, Niederlande
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM 2135	Leica Biosystems GmbH, Nuss- loch
Neubauer Zählkammer	100 mm Tiefe; 0,0025 mm ²	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
pH-Meter	pH 1000 L, pHenomenal™	VWR®, Darmstadt
Plattenreader: Filterset 1 Filterset 2 Platte Software	Synergy HT Extinktion: 485/20 Emission: 528/20 Excitation 320/20 Emission: 405/20 Take3-Microspot Gen5™	BioTek, Bad Friedrichshall
Paraffin Einbettungsautomat	TP 1020	Leica Biosystems GmbH, Nuss- loch
Rheometer Software Wasserbadpumpe Wasserbad	Rheostress RS300 HAAKE Rheo Win Version 4.30.0030 HAAKE DC30 Thermo Haake K 10	Thermo Haake, Karlsruhe
Rüttler	Microplate Shaker	VWR, Darmstadt

Gerät	Typ	Hersteller
Sicherheitswerkbank <i>ex vivo</i> Modelle	Holten Lamin Air Typ S-2010 1.2;	Heto-Holten A/S, Allerød, Dänemark
Sicherheitswerkbank Zellkultur	Classic II, BSC Infinity FC2- 4A1	Esco® Technologies, Hartboro, USA
Vakuumpumpe	Vacuboy 155 500	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Vortexer	Lab Dancer	VWR, Darmstadt
Wasserbad	WNB-7	Memmert GmbH & Co. KG; Schwabach
Weitfeldmikroskop Kamera: Software:	DMI 6000 DFC 360 Fx LAS AF Lite	Leica Microsystems, Wetzlar
Zentrifuge 1	Compact Centrifuge 2-5	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Zentrifuge 2	MEGA STAR 600R	VWR, Darmstadt

3.1.4 Medien und Puffer

Wachstumsmedium (für die Zellkultur, Lagerung bei 4° C):

FKS	10%
DMEM	90%

Ex-vivo-Medium (für das Schweinehaut-Wundmodell; Lagerung bei 4° C):

P/S	5%
FKS	10%
DMEM	85%

TBS-Puffer (Lagerung bei 4° C):

TRIS	25 mM
EDTA	150 mM
Aqua purificata	ad 100 ml
pH	7,2 mit HCl

Rekonstitutionspuffer (Lagerung bei Raumtemperatur (RT)):

Glycerin	42 mg
NaOH	40 mg
TRITON-X-100	0,005 mg
Aqua purificata	ad 100 ml

PHLC-Puffer A (Lagerung bei RT):

TFA	0,1%
Aqua purificata	ad 100

HPLC-Puffer B (Lagerung bei RT):

TFA	0,1%
AcN	ad 100

3.2. Methoden

3.2.1 Herstellungsprotokolle

Herstellung von IMPI-GST

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protein IMPI-GST (IMPI gekoppelt an einen Glutathion-S-Transferase (GST)-Tag) produzierte die Arbeitsgruppe von Prof. Czermak am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen. Im Laufe der Anfertigung dieser Arbeit optimierten sie die Produktions- und Aufreinigungsprozesse stetig. Damit sind die Herstellungsprotokolle der einzelnen Chargen nicht immer einheitlich. Aus diesem Grund wurde vor der Verwendung einer Produktionscharge die Quantität und Qualität von IMPI-GST mittels UV-Absorption und proteolytischem Aktivitätstest überprüft.

IMPI-GST wurde in einem Fermentationsprozess mit *E. Coli* Rosetta-Gami 2 (DE3) pLysS (Novagen, Merck) mit dem Plasmid p41a(+) IMPI α oder dem Plasmid pCS13GG IMPI hergestellt. Produziert wurde in einem Bioreaktor mit 3 l Medium versetzt mit Glukose, Chloramphenicol und Kanamycin. Der Reaktor wurde mit einer Vorkultur angeimpft, inkubiert und anschließend durch Zugabe von einer Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)-Lösung die rekombinante Proteinproduktion induziert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet. Für den Zellaufbruch wurde das Zellpellet in Waschpuffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert, indem nach der Zugabe von Benzonase die Suspension homogenisiert wurde. Für die darauf folgende Proteinextraktion zentrifugierte das Homogenat, um die lösliche IMPI-GST-Fraktion von den unlöslichen Bestandteilen zu trennen. Die Aufreinigung erfolgte anfangs in GST-Spin-Säulen (Thermo Scientific Pierce GST spin purification protocol). Später wurde die lösliche Fraktion zunächst mit einen Polyethersulfone Bottle-Top-Filter gefiltert und IMPI-GST in einem Fast-Protein-Liquid-Chromatografie-System (FPLC) mit Glutathion-Affinitäts-Säule aufgereinigt. Um nachfolgend das zur Elution verwendete Glutathion aus dem Eluat zu eliminieren, wurde ein Pufferaustausch mit TBS mittels Centricon® Filtereinheit in Diafiltrationscups (Sartorius) zentrifugiert. Das aufgereinigte IMPI-GST lagerte bei 4° C in TBS-Puffer bis zu 6 Monate.

Herstellung des *Pseudomonas aeruginosa* Sekretoms

Das Sekretom des *P. aeruginosa* (PAO 1 Stamm 19880, DSMZ, Braunschweig), isoliert aus einer humanen infizierten Wunde, wurde in Zusammenarbeit mit Anne Pöppel am Fraunhofer

IME hergestellt. Eine Bakterienkultur wurde mit 3 ml einer 0,3% (w/v) Beef-Extrakt-Lösung (BD Biosciences, Heidelberg) mit 0,5% Casein Pepton (Merck) in Wasser über Nacht bei 37° C kultiviert. Kryostocks wurden durch Zugabe von 20% (v/v) Glycerin hergestellt und in 50 µl Aliquotes bei -80° C bis zur Verwendung gelagert. Anschließend wurden 50 ml Wasser mit 0,8% BBL™ Beef Extract Puder in mit einem *P. aeruginosa* Aliquot angeimpft und mindestens 24 h und bis zu 96 h bei 28° C bis zu einer $OD_{600}=1$ (entspricht $4,6 \pm 1,8 \cdot 10^8$ Koloniebildende Einheiten (KBE)/ml) kultiviert. Die bakterielle Zellsuspension wurde mit $4500 \times g$ über 15 min zentrifugiert und sterilfiltriert (0,22 µm Filter). Der Überstand wurde in Low-Binding-Gefäßen (1,5 ml) bei -20° C gelagert. Die experimentellen Verdünnungen des Sekretoms sind in Prozent (% (v/v)) des Endvolumens angegeben.

3.2.2 Analytik

Quantitative IMPI-GST Analyse

Die quantitative Analyse von IMPI-GST (35 kDa) wurde über die Absorption bei 280 nm in der Take3- Platte im Plattenreader mit einem spezifischen Extinktionsskoeffizienten von $51.185 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($14,62 \text{ g}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die quantitative Analyse von IMPI-GST aus der Freisetzungsstudie des Hydrogels (3.2.5) wurde in einer HPLC-Anlage (siehe 3.1.3) durchgeführt.

Vergleich von IMPI-GST mit IMPI

Der Vergleich der inhibitorischen Aktivität von IMPI mit IMPI-GST wurde von der Abteilung Bioressourcen des Fraunhofer Instituts für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (IME) in Gießen durchgeführt

Proteolytischer Aktivitätstest

Die proteolytische Aktivität wurde in Protease-Assays im Förster-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Modus in Mikroplatten-Format bestimmt. Die an das Protokoll des Herstellers angelehnte Methode erfolgte im kinetischen Modus. Alle Inhaltsstoffe wurden in TBS gelöst. Bevor die Messung automatisch nach Zugabe des Substrats in dem Plattenreader startete, wurde die Protease mit dem Inhibitor 5 min prä-inkubiert. Der jeweilige Mittelwert (MW) der Geschwindigkeiten des Fluoreszenzsignals/min von einer Probe wurde mit der Software Gen 5™ berechnet und von einem Blank abgezogen, der außer der Protease die gleichen Inhaltsstoffe enthielt. Für die Datenanalyse wurden Sigmoidale mit der Software OriginPro 8.5® gefittet und anhand der Wendepunkte der Kurven die IC_{50} -Werte berechnet. Mit dieser Software wurden auch Signifikanzen mittels one-way ANOVA und Bonferroni-Test ($p \leq 0,05$) ermittelt.

Folgende Messparameter wurden für die unterschiedlichen Bestimmungen verwendet:

Überprüfung von IMPI mit IMPI-GST (von Fraunhofer IME bestimmt):

Substrat: FITC-Casein (1 µg/ml)
 Protease: Thermolysin (1 nM)
 Inhibitor: IMPI (20,7 pM - 20,7 mM)
 IMPI-GST (20,7 pM - 20,7 mM)
 Filterset: 1
 Dauer: 10 min mit 1 Messpunkt/min.
 Temperatur: 30° C

Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von IMPI-GST und PA:

Substrat: FITC-Casein (1 µg/ml)
 Protease: Thermolysin (9 nM)
 Pseudolysin (20 nM)
 Inhibitor: IMPI-GST (0,5 pM – 6,8 mM)
 PA (0,1 pM – 100 mM)
 Filterset: 1
 Dauer: 30 min mit 1 Messpunkt/min gemessen.
 Temperatur: 30° C

Bestimmung der Aktivität von IMPI-GST im Hydrogel:

Substrat: FITC-Casein (1 µg/ml)
 Protease: Thermolysin (9 nM)
 Inhibitor: 110 nM PA in Aqua purificata pro Well (200 µl);
 10 µl IMPI-GST in Puffer (675 nM/Well);
 10 µl IMPI-GST in Hydrogel (675 nM/Well)
 Filterset: 1
 Dauer: 20 min mit 1 Messpunkt/2 min
 Temperatur: 30° C

Bestimmung der proteolytischen Aktivität des Sekretoms und dessen Hemmung:

Substrat: FITC-Casein (1 µg/ml)
 Protease: Sekretom (0,033% - 17%)
 Inhibitor: IMPI-GST (15,7 pM – 66,2 mM)
 PA (0,58 pM - 200 mM)
 FKS und Wachstumsmedium (1,6% - 25%)
 Filterset: 1
 Dauer: 15 min mit 1 Messpunkt/min
 Temperatur: 30° C

Korrelation der PE-Konzentration zur Sekretom-Aktivität:

Substrat: Fluorogenic Peptide Substrate (Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH) (10 µM)
 Protease: PE (0,029–1,88 nM/Well)
 Sekretom (0,0078-0,125% /Well)
 Filterset: 2
 Dauer: 10 min mit 1 Messpunkt/min
 Temperatur: 33° C

3.2.3 Zellbasierte Methoden

Kultivierung von HaCaTs

Die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT wurde freundlicherweise von dem Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in den Passagen P49-60 kultiviert. Dafür wurde die in P46 eingefrorenen Zellen schnell aufgetaut und zunächst in einer 25 cm³ Zellkulturflasche mit Wachstumsmedium kultiviert (5% CO₂; 37° C). Nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz, wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen und mittels Inkubation (13 min) mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Die Reaktion wurde mit Wachstumsmedium gestoppt und die erhaltene Zellsuspension 5 min bei 500 rpm zentrifugiert und anschließend mit Wachstumsmedium resuspendiert. Mit 2,5 – 5,0 · 10⁵ Zellen wurde eine 75 cm³ Zellkulturflaschen mit 15 ml Wachstumsmedium angeimpft. Nach 24 h Inkubation wurde das alte Medium durch 15 ml frisches Wachstumsmedium ersetzt. Vor der Zugabe erfolgte ein Waschschriff der Zellen mit PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺. Alle 2-3 Tage fand ein Mediumwechsel statt, bis bei einer Konfluenz von 80-90% die Zellen wieder passagiert wurden. Für die Experimente wurden stets Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase angeimpft, die durch das Aufnehmen einer Wachstumskurve vorher bestimmt wurde (siehe Anhang).

Zellviabilitätstest

Die Viabilität der Zellen wurde mit wasserlöslichem Tetrazolium (WST-1) -Reagenz in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers bestimmt. Grundlage dieser Methode ist die Umwandlung des wasserunlöslichen, nahezu farblosen Tetrazoliumsalzes (4-3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) in wasserlösliches, orange-rotes Formazan. Diese Reduktion geschieht innerhalb von lebenden, stoffwechselaktiven Zellen in Abhängigkeit von den reduzierten Pyridinnukleotiden NADH und NADPH und zellulären Enzymen der Atmungskette (mitochondriale Succinatdehydrogenase). Der anschließend photometrisch zu bestimmende Wert bei einer Wellenlänge von 450 nm korreliert direkt zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen in der Kultur. Zur Durchführung des Tests wurden 10⁴ Zellen/Well einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen HaCaT-Kultur in eine 96-Wellplatte mit 100 µl Wachstumsmedium angeimpft und 48 h bis zur Konfluenz kultiviert (5% CO₂, 37° C). Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gespült und das Medium gewechselt. Vor der Applikation der Proben (Sekretom mit/ohne IMPI-GST oder PA) wurden diese 5 min prä-inkubiert. Die Verdünnungen der Probe wurden in PBS angesetzt und für die Applikation auf die Zellen 1:1 mit

Wachstumsmedium gemischt. Davon wurden 200 µl/Well auf die Zellen appliziert und über 24 h inkubiert. Bei der Überprüfung der Auswirkungen von FKS auf die Zellviabilität, variierten die FKS-Konzentrationen im Wachstumsmedium und sind im jeweiligen Ergebnis pro Well angegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 100 µl einer 5% (v/v) WST-1-Lösung in Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben und 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Optische Dichte (OD) bei 450 nm sowie 630 nm im Plattenreader bestimmt. Die Referenzwerte (630 nm) und der Blank (pure WST-1-Lösung) wurden von den Messwerten abgezogen und die Viabilitätswerte relativ zur unbehandelten Kontrolle berechnet. Die Analyse der Daten wurde mit der OriginPro 8.5® Software durchgeführt.

Immunhistologische Färbungen

Zur Visualisierung der mit Sekretom behandelten Zellen in An- und Abwesenheit von IMPI-GST, wurden die Zellen immunhistologisch gefärbt. Dabei konnten morphologische Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch die Markierung von F-Aktin mit Alexa-Fluor® 555 Phalloidin detektiert werden. 10⁴ HaCaTs/Well wurden in 96-Well-Zellkulturplatten für die Fluoreszenzmikroskopie ausgesät und behandelt, wie oben (Zellviabilitätstest) beschrieben. Nach der Inkubation der Proben wurden die Zellen mit eiskaltem Aceton (>99,7%) für 10 min bei -20° C fixiert und mit 1% (w/v) BSA in PBS für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1,25% (v/v) ALEXA-Fluor® 555 Phalloidin in PBS für 20 min im Dunkeln gefärbt. Daraufhin folgte eine Gegenfärbung der Zellen mit 1 µg/ml DAPI in 0,1% Triton X-100-Lösung für 10 min im Dunkeln. Zwischen jedem Schritt lagen zwei Waschschrir mit PBS. Die Fluoreszenz-Färbung wurde in fünf unabhängigen Experimenten wiederholt. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop mit dem 10x und dem 63x Objektiv sowie mit dem Fluoreszenzmikroskop in gleichen Einstellungen für jedes Bild mit den 10x und 63x Objektiven aufgenommen.

Zellmigrationstest

Die Migration von Keratinozyten ist ein essentieller Vorgang des Wundheilungsprozesses. Grundlage für die Bestimmung der Migration ist die Wanderung von adhärennten Zellen in einer vordefinierten zellfreien Fläche. Dazu wurden die allgemein gültige Methode des „Scratch-Assays“ und der abgewandelten Test mit „Cell Culture Inserts“ der Firma Ibidi® genutzt werden. In dieser Arbeit wurde zunächst in Voruntersuchungen ermittelt, dass das Ibidi®-Testsystem eine leichtere Handhabung und niedrigere Standardabweichung (SD) als der klassische Scratch-

Assay aufweist (siehe Anhang). Daher wurden alle in dieser Arbeit dargestellten Versuche zur Zellmigration mit den „Cell Culture Inserts“ durchgeführt (Abb. 17).



Abb. 17: ibidi® Zellmigrationstestsystem. Petrischale mit Insert definiert zwei zellbedeckte Flächen in einem zellfreien Abstand von 500 μm voneinander entfernt. Das Bild darf mit freundlicher Genehmigung der ibidi GmbH verwendet werden.

Ein Insert begrenzt eine Fläche von zwei mal 0,22 cm^2 mit einem definierten Spalt von 500 μm \pm 50 μm zwischen den beiden Wachstumsflächen. Das Insert wurde mit einer sterilen Pinzette in, für adhärentes Zellwachstum und Mikroskopie geeignete, Petrischalen fixiert und 70 μl einer HaCaT-Suspension mit $6,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in Wachstumsmedium in jede Vertiefung des Inserts gegeben. Im Inkubator bei 37° C und 5% CO_2 erreichte der Zellrasens nach etwa 24 h Konfluenz. Dann wurden die Inserts mit einer sterilen Pinzette vorsichtig entfernt und das Medium abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 500 μl PBS erfolgte die Applikation der Proben. Die Testsubstanzen beinhalteten unterschiedliche Sekretom-Konzentrationen (% (v/v)) in 500 μl Wachstumsmedium mit und ohne Zugabe von verschiedenen IMPI-GST-Konzentrationen (angegeben in nM). Zur Bestimmung der Zellmigration wurden vor Probenzugabe sowie nach 22 h Inkubation mikroskopische Bilder am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Auswertung der zugewachsenen Flächen erfolgte unter Verwendung der Software Las AF Lite. Nach manueller Markierung der Flächen wurden die Flächeninhalte vor und nach der Inkubation automatisch berechnet und aus der Grundfläche am Anfang und am Ende der Probeninkubation wurde die prozentuale Zellmigration nach Formel 3 berechnet:

$$\text{Formel 3: Zellmigration [\%]} = \frac{\text{Fläche}_{\text{Anfang}} - \text{Fläche}_{\text{Ende}}}{\text{Fläche}_{\text{Anfang}}} \times 100\%$$

Die Experimente wurden jeweils in Doppelbestimmung mit drei individuellen Wiederholungen durchgeführt und sind als MW jeweils relativ zur Kontrolle dargestellt.

3.2.4 Schweinehaut-Wundmodell

Das Schweinehaut-Wundmodell wurde verwendet, um den Einfluss des Sekretoms in An- und Abwesenheit von IMPI-GST auf die *ex vivo* Wundheilung zu untersuchen. Schweinehaut wird als pharmakologisches Modell für menschliche Haut weitreichend eingesetzt. Die hier verwendeten Schweine gehörten alle der Deutschen Landrasse an, waren bei Schlachtung im Alter von etwa 6 Monaten und litten an keinen beeinträchtigenden Vorerkrankungen. Das *ex vivo* Wundmodell wurde in Anlehnung an das Patent (DE10317400) von Brandner et al. entwickelt [141]. Die Schweineohren wurden freundlicherweise von der Metzgerei Manz aus Hüttenberg zur Verfügung gestellt.

Herstellung und Bearbeitung des Schweinehaut-Wundmodells

Die Schweineohren wurden direkt nach der Schlachtung mit einem Messer abgetrennt und in sterile physiologische Kochsalzlösung (9 g/L) gelegt. Die Ohren wurden gekühlt und steril zum Labor transportiert, wo sie zunächst durch Waschen mit Leitungswasser von Schmutz befreit und mit Gaze abgetrocknet wurden. Die Borsten wurden mit dem Haarschneidegerät auf 3-5 mm gekürzt, ohne die Haut dabei zu beschädigen. Um dabei eine mögliche Schädigung auszuschließen, wurden anfangs vor und nach der Borstenentfernung die transepidermalen Wasserungsverlust- (TEWL)-Werte kontrolliert. Diese lagen mit 70-98% des Wertes vor der Rasur im geringen Schädigungsbereich. Nach einem erneuten Waschen wurden die Ohren zur Reduktion der Keimzahl zunächst 2 min mit Desinfektionsmittel und anschließend weitere 10 min mit in Desinfektionsmittel getränkter Gaze inkubiert. Dann wurden die Ohren mit steriler physiologischer Kochsalzlösung abgespült und bis zu ihrer Verwendung darin gelagert. Die Kutis der Rückseite der sauberen und möglichst keimfreien Ohren wurde an unverletzten Stellen mit einem Skalpell von dem darunterliegenden Fettgewebe gelöst (Abb. 18).

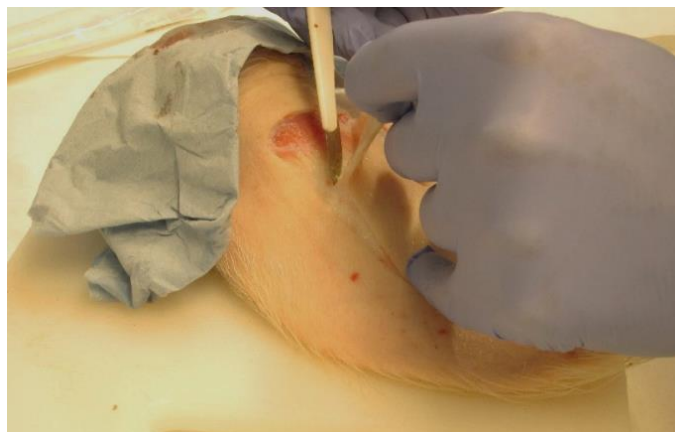


Abb. 18: Ablösen der Haut vom Schweineohr.

Alle verwendeten Geräte und Materialien wurden vor ihrer Benutzung desinfiziert oder sterilisiert. Bei der Wundherzeugung wurden verschiedene Werkzeuge, unter anderem eine Kürette, zwei unterschiedliche Dremel, mit zylindrischem und kegelförmigem Aufsatz, ein Skalpell und ein Biopsie-Punch mit 4 mm Durchmesser getestet. Der Biopsie-Punch zeigte die gleichmäßigste und einfachste Handhabung und wurde anschließend immer für die Verwundung eingesetzt. Der Punch wurde sanft etwa 1 mm tief in die Haut eingedrückt (Abb. 19) und das so markierte, teilweise gelöste Hautstück mit einer Pinzette angehoben und mit der Hautschere im oberen Teil der Dermis abgeschnitten.



Abb. 19: Wundherzeugung mit Biopsie-Punch.

Je ein Hautstück mit Wunde wurde durch eine 10 mm Hautstanze separiert, sodass die Wunde optimaler Weise im Zentrum der Biopsie lag. Mit einer Pinzette wurden die Biopsien in einer Petrischale gegeben und mit 2 ml sterilem Medium für das *ex vivo* Modell geschwenkt. Die weitere Bearbeitung erfolgte steril in der Werkbank. Dort wurden die Gewebeproben zunächst in 12-Wellplatten auf 1 cm² steriler Gaze in Air-Liquid-Kultur überführt (Abb. 20) und mit 700 µl *Ex-vivo*-Medium versorgt und die Oberfläche leicht mit steriler Gaze abgetupft.

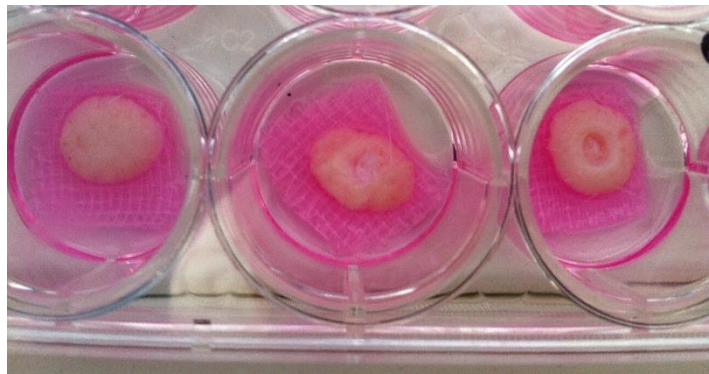


Abb. 20: Ex vivo Wundmodelle in Air-Liquid-Kultur.

Die Gewebestanden wurden 14 Tage bei 37° C und 10% CO₂ kultiviert und das Medium an 6 Tagen/Woche durch 600 µl frisches Medium ersetzt. Nach jedem Mediumswechsel wurden 5 µl der Testsubstanz pro Modell in die Mitte der Wunde appliziert. Die Testsubstanzen beinhalteten verschiedene Sekretom-Konzentrationen, angegeben in % (v/v), in An- oder Abwesenheit von 1,5 µM IMPI-GST in PBS. Zur Kontrolle wurden 5 µl pures PBS in die Wunde pipettiert. Nach der Kultivierung wurden die Gewebeprobe mit einem Stereomikroskop fotografiert (Abb. 21) und für die darauffolgende Anfertigung der histologischen Schnitte in 70%igem Ethanol in Einbettkassetten mind. 12 h inkubiert.



Abb. 21: Stereomikroskop-Aufnahme eines ex vivo Schweineohrhaut-Wundmodells.

Herstellung von Paraffinschnitten

Zur visuellen Auswertung des Wundmodells wurden paraffinierte, histologische Gewebeschnitte erstellt. Dafür wurden die Einbettkassetten mit den in 90° aufgestellten Gewebeprobe in einem Einbettautomaten nach Protokoll (Tab. 4) entwässert. Über mehrere Schritte wurde dabei das restliche Gewebewasser durch Paraffin ersetzt. Nach der Einbettung wurden die Wundmodelle an der Ausbettstation in Paraffinblöcke gegossen und zum schnelleren Erstarren des Paraffins auf Eis gelagert. Die Gewebeprobe wurden zunächst bis zur Wunde vorgeschnitten. Daraufhin wurden sie mit dem Mikrotom im 5° Winkel mit einer Dicke von 25 µm angeschnitten, um schließlich in der Mitte der Wunde 5 µm dicke, transdermale Schnitte anfertigen zu können.

Tab. 4: Einbettungsschritte der Gewebeproben im Einbettautomat.

Dauer	Reagenz
1,5 h	Ethanol 70%
1,5 h	Ethanol 70%
1,5 h	Ethanol 80%
1,5 h	Ethanol 80%
1,5 h	Ethanol 90%
1,5 h	Ethanol 90%
1,5 h	Ethanol 96%
1,5 h	Ethanol 96%
1,5 h	Ethanol 100%
1,5 h	Ethanol 100%
1,5 h	Xylol-Ersatz
1,5 h	Xylol-Ersatz
2,0 h	Paraffin (60° C)
2,0 h	Paraffin (60° C)

Die Gewebeschnitte wurden im 30° C warmen Wasserbad 30 s lang gestreckt und auf Objektträger gezogen. Anschließend erfolgten die Sichtkontrolle unter dem Lichtmikroskop und die Trocknung auf einer Heizplatte bei 40° C.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Paraffinschnitte der Wundmodelle wurden zur Visualisierung des Gewebes und damit zur Beurteilung der morphologischen Struktur mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Bei dieser Standardmethode der Histologie wird Hämatoxylin über mehrere Schritte zu Hämalan oxidiert, um sich an die negativen Gruppen der Nukleinsäuren anzulagern und eine violette bis blaue Färbung der Zellkerne auszulösen. Zur Gegenfärbung wurde das saure Eosin B genutzt, das basische (eosinophile) Bestandteile wie Erythrozyten, Keratin, Kollagen und Zytoplasma rot anfärbt. Um die Gewebeschnitte einzufärben, wurden sie zunächst nach Tab. 5 entparaffiniert und dann getrocknet.

Tab. 5: Arbeitsschritte zur Entparaffinierung

Dauer	Reagenz
10 min	Xylol-Ersatzmedium
5 min	Xylol-Ersatzmedium
5 min	100% Ethanol
5 min	96% Ethanol
2 min	70% Ethanol
2 min	Aqua purificata

Für die anschließende Färbung wurde die Hämalanlösung nach Meyer filtriert und die Eosin B-Färbelösungen nach Tab. 6 hergestellt.

Tab. 6: Eosin B-Färbelösung

Reagenz	Menge
Eosin B	312,4 mg
Eisessig	1 Tropfen
Aqua purificata	ad 100 ml

Alle Reagenzien wurden bis zu einer maximalen Füllhöhe von 75%, kurz oberhalb der Objektträgerensätze, in die Färbetröge gefüllt und die Gewebeschnitte nach Tab. 7 gefärbt.

Tab. 7: Arbeitsschritte zur Hämalau/Eosin-Färbung

Dauer	Schritte
5 min	Fixierung der Objektträger in 4% Formalin in Aqua purificata
30 s	Vorsichtiges Spülen in Aqua purificata
5 min	Färbung in Meyer's Hämalau
15 min	Spülen unter Leitungswasser
30 s	Färbung mit Eosin
2 min	96% Ethanol
2 min	96% Ethanol
2 min	100% Ethanol
2 min	100% Ethanol
2 min	Xylol-Ersatzmedium
2 min	Xylol-Ersatzmedium

Nach dem Trocknen wurden die Gewebepreparate mit einem Tropfen Einschlussmedium konserviert und mit einem Deckgläschen bedeckt. Aufbewahrt wurden die Proben in einem Objektträgerkasten bei Raumtemperatur. Zur Beurteilung der Wunden wurden die Gewebeproben mit dem Lichtmikroskop mit 10x Objektiv fotografiert.

Auswertung des *ex vivo* Wundmodells

Zur Auswertung der Wunden wurden die geschnittenen und gefärbten Gewebeproben mit einem Lichtmikroskop aufgenommen (Abb. 22). Anhand der Morphologie und Histologie der Hautschichten, der Anzahl der Keratinozyten und der Ausbildung der Wundzunge, wurden die Wundmodelle visuell ausgewertet.

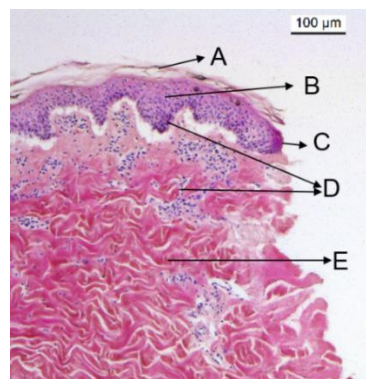


Abb. 22: Aufnahme eines gefärbten Gewebeschnitts des Wundmodells. Gezeigt ist ein Schnitt durch eine unbehandelte Wunde. A: *Stratum corneum*; B: Epidermis; C: Wundzunge; D: Keratinozyten; E: Dermis.

3.2.5 Design der Formulierung

Herstellung der Poloxamer Hydrogele

Zur Entwicklung einer geeigneten Formulierung für das potenzielle Wirkstoffprotein IMPI-GST wurden thermosensitive Hydrogele mit dem Hauptgelbildner P407 und unterschiedlichen Additiven hergestellt. Die Konzentration der Inhaltsstoffe ist in % (w/w) angegeben. Alle Gele wurden nach der „Kalt-Methode“ von Schmolka et al. [129] angefertigt. Zunächst wurden alle Bestandteile, außer P407, unter Rühren in Aqua purificata gelöst und auf 4° C abgekühlt. Dann erst wurde P407 nach und nach unter ständigem Rühren zu der kalten Lösung gegeben und mind. 12-24 h im Kühlschrank aufbewahrt, bis sich eine klare Flüssigkeit bildete. Die Gele wurden bei 4° C in verschlossenen Glas-Vials gelagert. Die Zusammensetzung der Formulierung ist im jeweiligen Ergebnisteil angegeben. Die Zusammensetzung der finalen Placebo-Formulierung ist in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Zusammensetzung des finalen Hydrogels

Reagenz	Prozentualer Anteil
Kaliumsorbat	0,2%
Zitronensäure	0,1%
Glycerin	3%
P188	15%
P407	16%
Aqua purificata	ad 100%

Charakterisierung der Gele:

Die hergestellten Gele wurden nach einem Tag Lagerzeit in Bezug auf ihre rheologischen Eigenschaften mit dem Rotationsrheometer oder der Tube-Inversions-Methode charakterisiert.

Rheologische Bestimmung:

Mit dem Rheometer wurde T_{Gel} über den Schnittpunkt des Elastischen Moduls G' mit dem Viskosen Modul G'' in oszillatorischen Temperatur-Sweep-Messungen bestimmt, der mit einem Phasenverschiebungswinkel von 45° definiert ist. Folgende Formeln beschreiben die Zusammenhänge der in den oszillatorischen Messungen bestimmten Parameter.

Formel 4: $\tau = G^* \cdot \gamma$

Formel 5: $\tan\delta = \frac{G''}{G'}$

Formel 6: $\eta' = \frac{G'}{\omega}$

Formel 7: $\eta'' = \frac{G''}{\omega}$

Formel 8: $\eta^* = \frac{\tau^*}{\gamma^*} = \eta' + i \cdot \eta''$

Formel 9: $|\eta^*| = \sqrt{\left(\frac{G''}{\omega}\right)^2 + \left(\frac{G'}{\omega}\right)^2}$

τ : Schubspannung

G^* : Komplexes Schubmodul

γ : Deformation bzw. Schergeschwindigkeit

δ : Phasenverschiebungswinkel

G'' : Verlustmodul

G' : Speichermodul

Für alle rheologischen Messungen wurde die Kegel-Platte-Geometrie mit einem Durchmesser von 35 mm und einem Kegelöffnungswinkel von 2° verwendet. Es wurde 1 ml Gel in die Mitte der Platte pipettiert. Der Spalt zum Kegel betrug 0,1 mm. Alle Daten wurden im Controlled-Stress (CS) -Modus aufgenommen.

Bestimmung des linear-viskoelastischen (LVE) Bereichs:

Als Voraussetzung für die Bestimmung von G' und G'' wurde zuerst der LVE-Bereich von einem 16% P407-Gel ermittelt. Folglich wurde zunächst ein Amplituden-Sweep mit zunehmender Schubspannung τ von 0,5-1000 Pa und einer Frequenz von $\omega=0,5$ Hz sowie einer kontrollierten, jeweils variierenden Temperatur zwischen 20° C und 38° C durchgeführt. Anschließend wurde das Gel bei gewählter Schubspannung τ von 60 Pa in einem Frequenz-Sweep mit $\omega=0,1-100$ Hz im CS-Modus aufgenommen (siehe Anhang).

Messungen im Temperatur-Sweep:

Aus diesen Daten wurden zur Bestimmung der Gel-Sol-Übergangstemperatur (T_{Gel}) der jeweiligen Zubereitung Temperatur-Sweep-Messungen mit $\tau=50$ Pa und $\omega=1$ Hz im Temperaturrampe-Modus zwischen 10° C und 40° C mit einer Rate von 1,0° C/min durchgeführt. Dabei wurden G' und G'' bestimmt sowie T_{Gel} über die crossover-Funktion $G'=G''$ der Software des Rheometers identifiziert. Die Messungen wurden mit drei identisch hergestellten Gelen in Doppelbestimmung wiederholt. Im Ergebnisteil sind T_{Gel} und das Elastische Modul bei 32,5° C ($G'_{32,5^\circ C}$) als Gelstärke bei Hautoberflächentemperatur von unterschiedlichen Gelzusammensetzungen im $MW \pm SD$ dargestellt.

Tube-Inversions-Methode:

Die Tube-Inversions-Methode [142] diente nur dem Vergleich der Gel-Sol-Übergangstemperaturen (T_{Gel}) mit den im Rheometer gemessenen Daten. Dabei wurden die Gele mit einer definierten Menge von 0,5 g in 4 ml Glas-Vials gegeben und in dem Inkubator auf 25° C temperiert.

Schrittweise wurde die Temperatur in Intervallen von 0,5° C pro min auf 40° C erhöht. Nach jedem Intervall wurden die Vials umgedreht und die Fleißfähigkeit des Gels beobachtet. Sobald das Gel über 30 s am Glasboden haften blieb, wurde die vorgelagerte Temperatur als T_{Gel} bezeichnet.

Keimbelastungstest

Der Keimbelastungstest wurde von dem chemischen und mikrobiologischen Institut UEG GmbH in Wetzlar durchgeführt. Es war zu überprüfen, ob die Hydrogele das mikrobielle Wachstum nach Europäischer Pharmakopöe (6.0 (1) 2008) ausreichend hemmen. Die unterschiedlichen Hydrogele wurden folgendermaßen zusammengesetzt, wobei das Wasser anteilig durch das jeweilige Konservierungsmittel ersetzt wurde:

- a) Hydrogel nach Tab. 8;
- b) Hydrogel nach Tab. 8 ohne Kaliumsorbat und Zitronensäure, mit 20% Propylenglykol;
- c) Hydrogel nach Tab. 8 ohne Kaliumsorbat und Zitronensäure mit 0,2% Parabene (0,15% Methyl-4-hydroxybenzoat; 0,05% Propyl-4-hydroxybenzoat; 0,5% Phenoxyethanol).

Zu den getesteten Mikroorganismen gehörten das grampositive Bakterium *S. aureus* (ATCC 6538) und die gramnegativen Stämme *E. coli* (ATCC 8739) und *P. aeruginosa* (ATCC 9027) sowie die Hefe *Candida albicans* (ATCC10231) und der Schimmelpilz *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Jeweils 10 ml der oben angegebenen Hydrogele a-c wurden mit 10^5 - 10^7 KBE/ml Bakterien, mit 10^4 - 10^5 KBE/ml der Schimmelpilze angeimpft. Die mikrobiellen Verunreinigungen wurden direkt nach der Inokulation, nach einer, zwei, drei und vier Wochen Inkubation bei $25^\circ \pm 1^\circ$ C in serieller Verdünnung auf Casein-Sojamehlpepton (CASO)-Agar mit Enthemmer für das Bakterien- und Hefewachstum sowie auf Malzagar für das Pilzwachstum bestimmt. Der Keimbelastungstest wurde als bestanden betrachtet, wenn das bakterielle Wachstum innerhalb von 28 Tagen um mehr als 99,9% und das Pilzwachstum um mehr als 99,0% reduziert wurden.

Freisetzungsstudien

Zur Bestimmung der Freisetzung von IMPI-GST aus dem Hydrogel wurden Experimente in Franz-Diffusions-Zellen (Abb. 23) mit einer Oberfläche von 1,76 cm² und 12 ml Rezeptorvolumen mit eingespannter Cellulose-Ester-Membran durchgeführt. Eine vorher in dem Akzeptormedium PBS äquilibrierte Cellulose-Ester-Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm und einem Durchmesser von 25 mm wurde zwischen Donor- und Akzeptorkammer eingespannt.

Das Akzeptormedium wurde auf dem Heizblock konstant auf 32,5° C temperiert und mit einem Magnetrührer bei 500 rpm durchmischt. Nach 30 min Vorinkubation zur Temperierung wurde eine Nullprobe gezogen, indem 500 µl Akzeptormedium entnommen wurden und frisches PBS bis zum Eichstrich wieder ergänzt wurde. Nach der Applikation von 500 µl Hydrogel (Tab. 8) mit 13,5 µM IMPI-GST auf die Oberseite der Membran, erfolgte nach 30 min und anschließend über einen Gesamtzeitraum von 10 h jede Stunde eine Probeentnahme. Dafür wurden 500 µl nach der Durchmischung über mehrfaches Aufziehen und Entleeren der Entnahmespritze abgenommen. Der freigesetzte IMPI-GST-Gehalt wurde dann quantitativ mittels HPLC bestimmt.

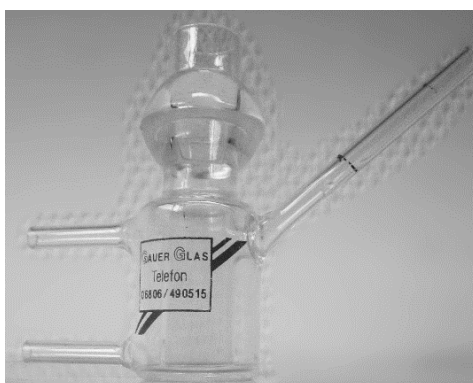


Abb. 23: Franz-Diffusions-Zelle.

HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von IMPI-GST:

Es wurde ein Gradient von 65% Puffer A/35% Puffer B (siehe 3.1.3) zu 45% Puffer A / 55% Puffer B innerhalb von 17,5 min mit einem Fluss von 1,2 ml/min bei 40° C eingestellt. Zum Entfernen von Proberesten auf der RP-C18-Säule, wurde die Anlage vor Beginn einer Messung mit Fließmittel gespült und 50 µl Fließmittel injiziert. In einer vorherigen Analyse von IMPI-GST in Puffer wurden die Retentionszeit und die Nachweisgrenze bestimmt sowie eine Kalibrierfunktion aufgenommen (siehe Anhang). Das Injektionsvolumen betrug jeweils 50 µl. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 214 nm im DAAD. Über die Integration des Peaks mit der EzChrome EliteClient Software wurde über die lineare Regression der Peak-Flächen und der jeweiligen Konzentration mit Hilfe einer Kalibriergeraden (siehe Anhang) die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß $R^2=0,997$ sowie die SD von $n=3$ Messungen berechnet. Über die Kalibrierfunktion wurde schließlich der IMPI-GST-Gehalt aus den Proben der Freisetzung ermittelt. Das Experiment wurde mit 6 Replikaten durchgeführt und die Ergebnisse sind als $MW \pm SD$ dargestellt.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil wurde die Wirkung von IMPI-GST molekularbiologisch, *in vitro* und *ex vivo* überprüft. Im zweiten Teil wurde die Entwicklung einer geeigneten Formulierung für die Anwendung dieses potentiellen Protein-Wirkstoffs beschrieben.

4.1. Präklinische Untersuchung

Zunächst stand die Überprüfung der Wirksamkeit von IMPI-GST im Vordergrund. Dazu wurde die potenzielle Wirkung auf molekularbiologischer Ebene in Protease-Assays, auf Zellkulturen einer immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie und in einem *ex vivo* Schweinehaut-Wundmodell untersucht.

4.1.1 Inhibitorische Aktivität von IMPI-GST

IMPI ist ein hochspezifischer Inhibitor für bakterielle M4-MP, wie Thermolysin oder Pseudolysin [15]. Hier wurde der verwendete Inhibitor IMPI rekombinant in *E. coli* produziert und zur Aufreinigung an den GST-Tag gekoppelt. Diese Arbeit wurde mit dem Fusionsprotein IMPI-GST anstatt IMPI angefertigt, da aufgereinigtes IMPI noch nicht in ausreichender Menge produziert werden konnte.

Vergleich von IMPI-GST mit IMPI

Um einen Einfluss des GST-Tags auf die Wirkung von IMPI auszuschließen, wurde die inhibitorischen Aktivität dieses Fusionsproteins mit IMPI verglichen (Abb. 24). Insbesondere die beträchtliche Molekülgröße des über eine Enterokinase-Schnittstelle an IMPI gekoppelten, GST-Tags von 35 kDa übersteigt die Größe von IMPI (7,8 kDa) um ein Vielfaches und könnte eine veränderte Funktion von IMPI bewirken. Beide Inhibitoren wurden gegen die M4-MP Thermolysin getestet. Das Ergebnis war ein mit steigenden Hemmstoff-Konzentrationen verringertes Fluoreszenzsignal, das von dem gespaltenen FITC-Casein im FRET ausgesendet wurde. Ab etwa 100 nM IMPI, bzw. IMPI-GST wurde keine proteolytische Aktivität von Thermolysin mehr detektiert und eine totale Hemmung der Protease herbeigeführt. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von IMPI und IMPI-GST unterschieden sich dabei im relevanten Messbereich nicht voneinander. Zwischen 0,2 nM und 100 nM hatte der GST-Tag somit keinen signifikanten

Einfluss ($p < 0.05$) auf die proteolytische Aktivität. Dieses Ergebnis wurde anhand der nicht signifikanten Unterschiede in den IC_{50} -Werten von IMPI mit $10,2 \pm 1,1$ nM und IMPI-GST mit $13,5 \pm 1,1$ nM bestätigt und erlaubte es, die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse bezüglich der inhibitorischen Wirkung von IMPI-GST auf IMPI zu übertragen.

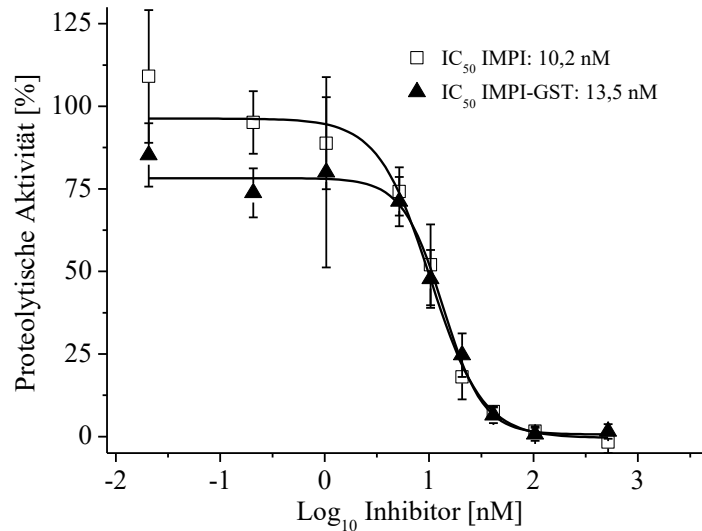


Abb. 24: Vergleich der inhibitorischen Aktivität von IMPI-GST mit IMPI. Dargestellt sind die Fits des Sigmoids der Inhibitor-Konzentration zur proteolytischen Aktivität von Thermolysin (1 nM) in % der Kontrolle (ohne Inhibitor) MW \pm SD von $n=9$ Messungen und einem bereinigten Bestimmtheitsmaß $R^2=0,993$ für IMPI und $R^2=0,991$ für IMPI-GST.

Qualität und Stabilität von IMPI-GST

IMPI-GST wurde rekombinant in *E. coli* produziert, wobei sich der Herstellungsprozess während der Anfertigung dieser Arbeit stetig veränderte. Um trotzdem eine gleichbleibende Qualität zu gewährleisten, wurde vor der Verwendung jeder Produktionscharge die inhibitorische Wirkung in einem proteolytischen Aktivitätstest mit Thermolysin kontrolliert (Abb. 25).

Die Verläufe der sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Beziehungen der Chargen 1 und 2 waren nicht zu unterscheiden. Die Kurve der Charge 3 war etwas nach links verschoben. Das deutete darauf hin, dass die inhibitorische Aktivität dieser IMPI-GST-Probe etwas größer war und sie noch effizienter wirkte. Die IC_{50} -Werte unterschieden sich jeweils im Vergleich zur Charge 1 nicht signifikant und alle Chargen lagen innerhalb der gleichen Log-Stufe im Bereich von 1-2. Die Differenz zwischen Charge 2 und 3 war für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht ausschlaggebend.

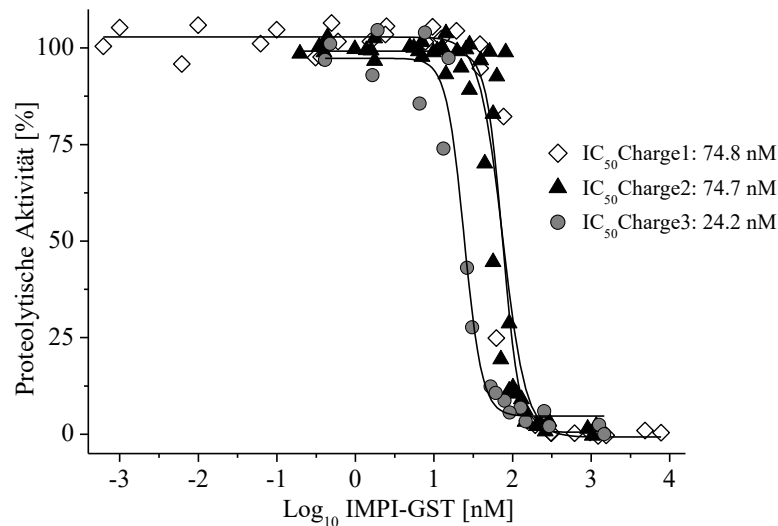


Abb. 25: Inhibitorische Aktivität unterschiedlicher IMPI-GST Charges. Dargestellt sind die Fits des Sigmoids der Inhibitor-Konzentration zur proteolytischen Aktivität von Thermolysin (9 nM) in % der Kontrolle (ohne Inhibitor) von 3 IMPI-GST-Produktionschargen (1.Charge: n=3; bereinigtes R²=0,951; 2. Charge n=4; bereinigtes R²=0,910; 3. Charge: n=1; bereinigtes R²:0,975).

Stabilitätskontrollen von IMPI-GST wurden durchgeführt, um eine verminderte Wirksamkeit aufgrund der Lagerung auszuschließen. Das Ergebnis zeigte eine konstante inhibitorische Kapazität einer IMPI-GST-Charge über einen Lagerungszeitraum von mindestens 3 Monaten bei 4° C (Abb. 26). Bei einer weiteren Charge wurde nach einer Lagerung von 7 Monaten keine Abnahme in der inhibitorischen Aktivität nachgewiesen (IC₅₀: 24,8 nM; siehe Anhang). Infolgedessen wurde IMPI-GST bis zu 6 Monaten nach seiner Produktion eingesetzt.

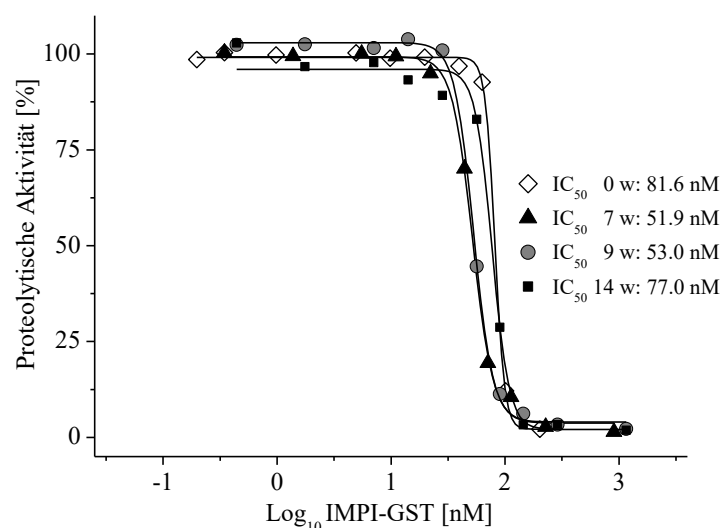


Abb. 26: Stabilitätskontrolle der inhibitorischen Aktivität von IMPI-GST. Dargestellt sind die Fits des Sigmoids der proteolytischen Aktivität von Thermolysin (9 nM) über der IMPI-GST-Konzentration nach unterschiedlichen Lagerungszeiträumen (W: Wochen) bei 4° C (bereinigtes R²_{0w}: 0,9990; bereinigtes R²_{7w}: 0,9967; bereinigtes R²_{9w}: 0,9989; bereinigtes R²_{14w}: 0,9913).

Vergleich der inhibitorischen Aktivität von IMPI-GST mit PA

Um die Wirkung von IMPI-GST besser einordnen zu können, wurde die inhibitorische Aktivität gegen die Standardprotease der M4-MP Thermolysin mit dem chemischen Referenzinhibitor PA verglichen (Abb. 27). Das Ergebnis war eine ähnliche Konzentrations-Effekt-Kurve mit jedoch signifikant niedrigerem IC_{50} -Wert von 60,7 nM für IMPI-GST im Vergleich zu PA (IC_{50} -Wert: 127,7 nM). Außerdem fiel die Konzentrations-Effekt-Kurve von IMPI-GST steiler ab, was auf ein engeres Wirkfenster von IMPI-GST hinwies.

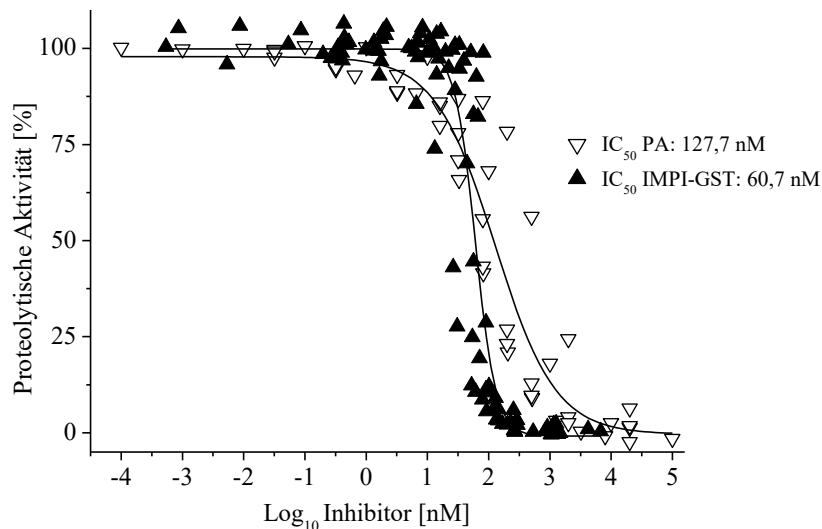


Abb. 27: Vergleich der inhibitorische Aktivität von IMPI-GST und PA gegen Thermolysin. Dargestellt sind die Fits des Sigmoids der Inhibitor-Konzentration zur proteolytischen Aktivität von Thermolysin (9 nM) in % der Kontrolle (ohne Inhibitor) (IMPI-GST: n=10 unabhängige Messungen von 3 verschiedene Chargen, bereinigtes $R^2=0,873$; PA: n=5 unabhängige Messungen, bereinigtes $R^2=0,914$).

Hemmung von Pseudolysin (PE)

Der Hauptvirulenzfaktor von *P. aeruginosa* ist PE, weshalb mögliche PE-Hemmstoffe als potenzielle Wirkstoffe bei der Bekämpfung von *P. aeruginosa* Infektionen gelten. Clermont et al. haben gezeigt, dass IMPI diese M4-MP hemmt [15]. Demzufolge wurde erwartet, dass auch IMPI-GST die proteolytische Aktivität dieses Virulenzfaktors ebenfalls inhibiert. Diese Annahme wurde in dem dargestellten Aktivitätstest belegt (Abb. 28).

Durch die steigenden Konzentrationen an IMPI-GST oder PA verringerte sich das durch Spaltung des Substrats hervorgerufene Fluoreszenzsignal stetig. Die resultierende Konzentrations-Effekt-Kurve von IMPI-GST ist im Vergleich zum Sigmoid von PA nach links verschoben. Das bedeutet, eine geringere IMPI-GST-Konzentration löste den gleichen Effekt aus, wie eine höhere PA-Konzentration. Diese höhere Effizienz in der Hemmung des Virulenzfaktors PE zeigte sich auch in dem niedrigeren IC_{50} -Wert von IMPI-GST gegenüber dem etablierten Referenzinhibitor PA.

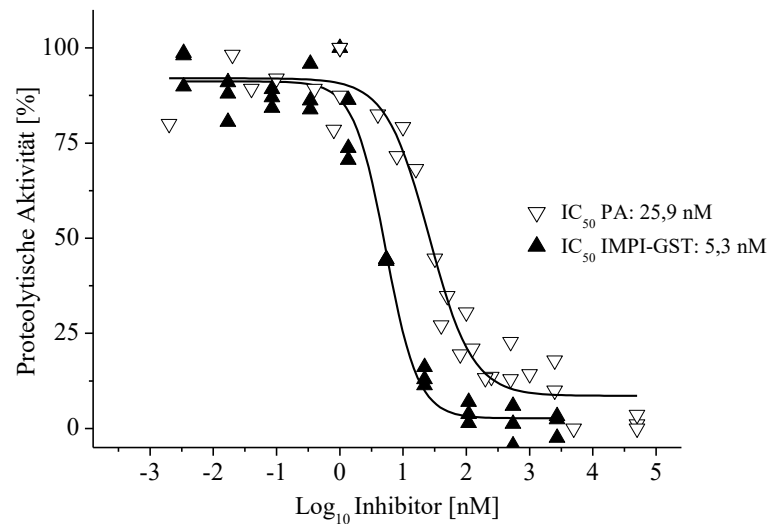


Abb. 28: Vergleich der inhibitorischen Aktivität von IMPI-GST und PA gegen PE. Dargestellt sind die Fits des Sigmoids der proteolytischen Aktivität von PE (20 nM) in % der Kontrolle (ohne Inhibitor) über der Inhibitor-Konzentration (IMPI-GST: n=3, bereinigtes R²=0,972; PA: n=3, bereinigtes R²=0,960).

Proteolytischen Aktivität des *P. aeruginosa*-Sekretoms

Nach dem Beweis der totalen und effektiven Hemmung des reinen, kommerziell erworbenen PE in Abb. 28 wurde eine therapeutische Wirkung von IMPI-GST bei Infektionen mit *P. aeruginosa* vermutet. Deshalb wurde weiter getestet, ob die proteolytische Aktivität eines Sekretoms von *P. aeruginosa* ebenfalls inhibiert werden kann. Zusätzlich wurde dabei ermittelt, welche Rolle weitere von dem Bakterium freigesetzte Proteasen spielen und ob das Protein IMPI-GST in natürlicher Umgebung von PE wirksam ist. Für die Herstellung des Sekretoms wurde der aus einer humanen Wundinfektion isolierte Stamm DSMZ 19880 verwendet und zunächst seine Kultivierungsbedingungen festgelegt. In Voruntersuchungen des Fraunhofer IME wurde ermittelt, dass die proteolytische Aktivität bei Verwendung von Beef-Extrakt im Vergleich zum Standard LB-Medium anstieg. Zur Bestimmung der Kultivierungsdauer wurde daher die proteolytische Aktivität des Sekretoms im FITC-Casein-Assay nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bestimmt (Abb. 29). Die Über-Nacht-Kultur hatte eine vernachlässigbare Protease-Aktivität, nach 24 h wurde die höchste proteolytische Aktivität erreicht und mit steigender Inkubationsdauer von bis zu 96 h veränderte sie sich nicht mehr signifikant. Allerdings verringerten sich die Standardabweichungen der Proben und die Werte wiesen geringere Schwankungen auf. Die Bakteriendichte blieb zwischen 24 h und 96 h konstant bei einer OD₆₀₀ von 1,0, äquivalent zu $4,6 \pm 1,9 \cdot 10^8$ KBE/ml.

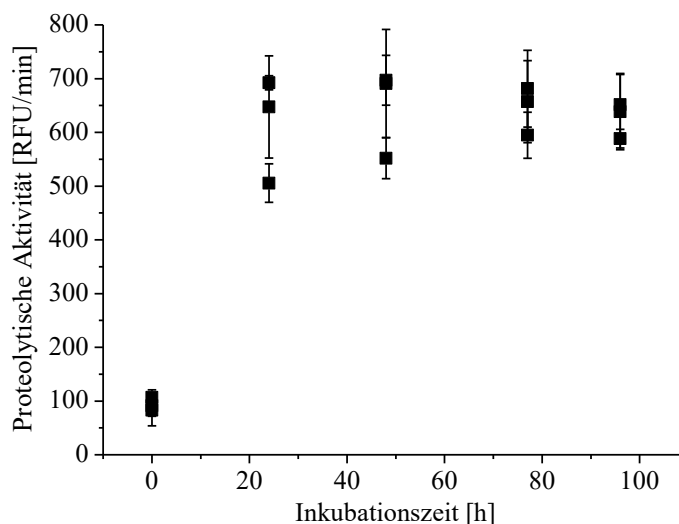


Abb. 29: Proteolytische Aktivität des Sekretoms in Abhängigkeit der Inkubationszeit. *P. aeruginosa* Über-Nacht-Kulturen wurden für bis zu 96 h weiter kultiviert und an unterschiedlichen Zeitpunkten die proteolytische Aktivität mit FITC-Casein bestimmt und ist angegeben im veränderten Fluoreszenzsignal pro min (RFU/min). Die dargestellten Ergebnisse sind MW \pm SD von n=9 Messungen aus 3 unterschiedlichen Kulturen.

Generell wird vermutet, dass PE die einzige relevante Protease in dem Sekretom ist [73]. Demzufolge wurde die in diesem Test bestimmte, proteolytische Aktivität mit der PE-Konzentration gleichgesetzt. Es konnte belegt werden, dass die sekretierte PE-Konzentration während einer Inkubationszeit zwischen 24 h und 96 h hier unverändert blieb. Für alle Folge-Experimente wurde ein Sekretom von *P. aeruginosa* Stämmen nach mindestens 24 h Kultivierung in Beef-Extrakt-Medium verwendet.

Zur Bestimmung der im Sekretom enthaltenen Menge an PE wurde die proteolytische Aktivität gegen das im Vergleich zu FITC-Casein für MPs der Thermolysin-Familie sensitivere Fluorogenic Peptide Substrate Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH gemessen. [66,143]. Dafür wurde zunächst eine Kalibriergerade mit reinem, kommerziell erworbenem PE und dem Substrat im linearen Bereich (0.4715 nM – 0,0295 nM) aufgenommen (siehe Anhang) und die proteolytische Aktivität des Sekretoms zur PE-Konzentration korreliert (Abb. 30). Die berechnete PE-Konzentration entsprach 944 ± 68 nM im Sekretom.

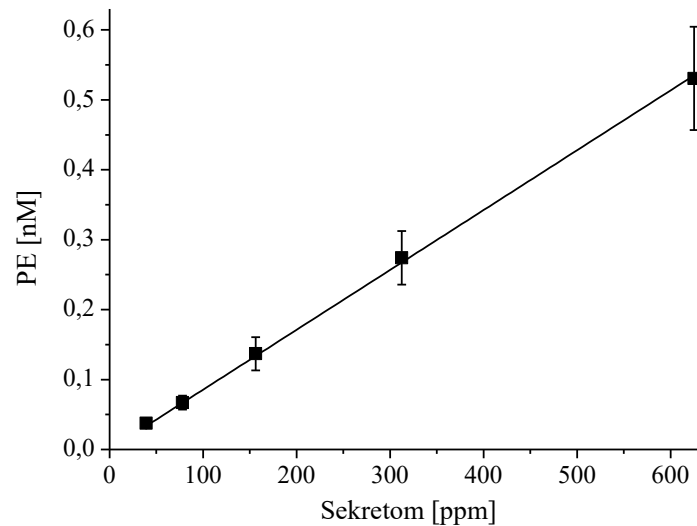


Abb. 30: PE-Konzentration in *P. aeruginosa* Sekretom. Dargestellt ist die Korrelation des Sekretoms zur PE-Konzentration über die proteolytische Aktivität gegen das Fluorogenic Peptide Substrate Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH. Die Ergebnisse zeigen MW \pm SD, von n=9 Messungen von 3 unterschiedlichen Kulturen, verbunden über eine lineare Ausgleichsgerade mit einer Steigung: $8,56 \pm 0,07 \cdot 10^{-4}$ RFU min⁻¹ nM⁻¹ und R²=0,9998.

Hemmung des *P. aeruginosa* Sekretoms

Zur weiteren Überprüfung eines möglichen therapeutischen Einsatzes von IMPI-GST bei Infektionen mit *P. aeruginosa* wurden die Inhibitoren IMPI-GST und PA gegen die proteolytische Aktivität des Sekretoms untersucht. Dafür wurden PA und IMPI-GST zu unterschiedliche Sekretom-Konzentration gegeben und ihre IC₅₀-Kurven im FITC-Casein-Assay aufgenommen (Abb. 31). Die proteolytische Aktivität des Sekretoms nahm durch die Zugabe beider Inhibitoren rapide ab. Beim Einsatz höherer Sekretom-Konzentration zeigten sich die Sigmoide nach links verschoben. Das bedeutet, je mehr Sekretom eingesetzt wurde, desto höhere war die zur Hemmung benötigte Inhibitor-Konzentration. Im Vergleich der Inhibitoren untereinander fiel an den Werten der am höchsten eingesetzten Konzentration auf, dass durch Zugabe von IMPI-GST (Abb. 31a) eine totale Hemmung aller getesteten Sekretom-Konzentrationen erreicht wurde.

Bei Einsatz von 17% Sekretom und dem Referenzinhibitor PA wurde noch eine Restaktivität von etwa 20% gemessen (Abb. 31b). Außerdem waren alle sigmoiden Kurven von IMPI-GST im Vergleich zu PA nach links verschoben, was auf eine effizientere Wirkung hinwies. Dieses Resultat wurde anhand der IC₅₀-Werte bestätigt, so waren bei den Sekretom-Konzentrationen von 0,033% und 1,1% die Werte von IMPI-GST signifikant niedriger als bei PA. Im Vergleich zeigte IMPI-GST weiterhin in jedem dieser Graphen einen steileren Abfall. Diese Erkenntnisse einer effizienteren Wirkung von IMPI-GST zu PA entsprechen den vorherigen Ergebnissen der Hemmung der M4-MP (Abb. 28 und Abb. 29).

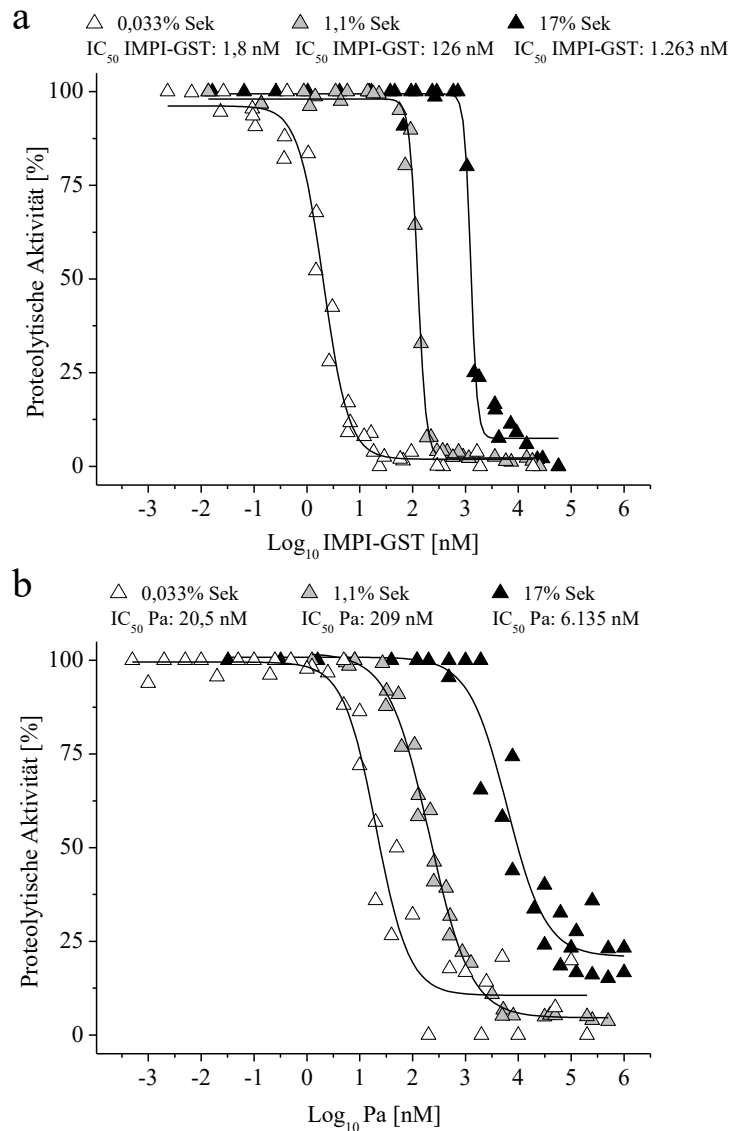


Abb. 31: Hemmung der proteolytischen Aktivität des Sekretoms mit PA und IMPI-GST. Die proteolytischen Aktivitäten von drei unterschiedlichen Sekretom-Konzentrationen in PBS wurden in Fluoreszenz-Quenching-Tests mit FITC-Casein bestimmt und als Kontrolle (100%) definiert. In Anwesenheit der Inhibitoren IMPI-GST (a) und PA (b) wurden die jeweiligen IC_{50} -Werte bestimmt ($n=3$). Vor der Initiierung der Reaktion durch Substrat-Zugabe wurden die Inhibitoren für 5 min mit Sekretom inkubiert.

Zusammengefasst bewiesen die Ergebnisse der inhibitorischen Aktivität von IMPI-GST eine Wirkung gegen die M4-MP Thermolysin und Pseudolysin. Dieses wurde ebenso in natürlicher Umgebung des Bakteriums, dem Sekretom, gehemmt. Damit wurde ein höheres Potenzial des Einsatzes von IMPI-GST als Wirkstoffmolekül auf molekularer Ebene erreicht.

4.1.2 Zellviabilitätsstudien

Im Anschluss an die molekularbiologischen Experimente wurde IMPI-GST auch auf Zellebene in Bezug auf seine Toxizität und seine potentielle Wirkung bei Wundinfektionen mit *P. aeruginosa* erforscht. Um zunächst den Einfluss von PE und *P. aeruginosa* auf die Zellkulturen zu

untersuchen, wurden die Auswirkungen des Sekretoms auf eine humane Keratinozyten-Zelllinie bestimmt. Anschließend wurde die Wirkung von IMPI-GST auf mit Sekretom behandelte Zellen beobachtet.

Zytotoxizität des Sekretoms

Die Zytotoxizität des Sekretoms von *P. aeruginosa* wurde in WST1-Tests zur Viabilität einer konfluenten HaCaT Zelllinie nach Zugabe verschiedener Sekretom-Konzentrationen gemessen. Das Ergebnis war eine Dosis-Wirkungs-Kurve der Viabilität relativ zur unbehandelten Kontrolle über der Konzentration des Sekretoms (Abb. 32).

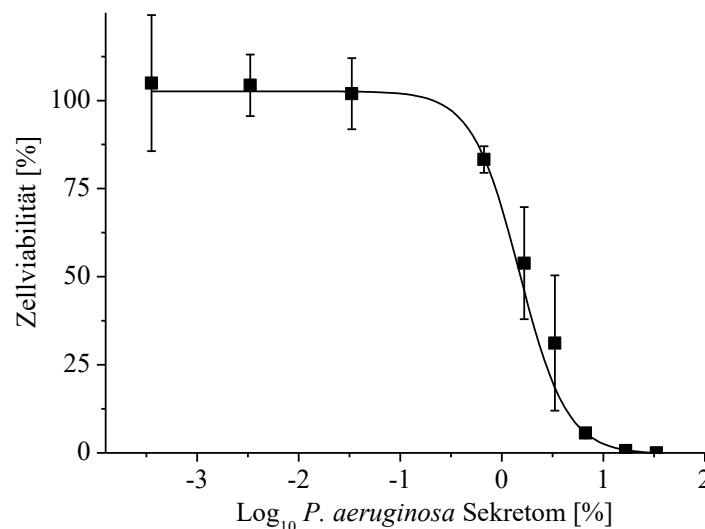


Abb. 32: Einfluss des *P. aeruginosa* Sekretom auf die Zellviabilität. Konfluente HaCaT-Kulturen wurden 24 h mit verschiedenen Sekretom-Konzentrationen inkubiert. Dargestellt sind MW ± SD von n=4 Messungen mit mindestens 3 Replikaten relativ zur unbehandelten Kontrolle. Der LD₅₀ wurde mit 1,5% Sekretom über den Fit der Dosis-Wirkungs-Kurve (bereinigtes R²=0,99986) berechnet.

Ab etwa 0,1% Sekretom verringerte sich die Zellviabilität stetig mit steigenden Sekretom-Konzentrationen, bis bei Einsatz von etwa 10% Sekretom ein totales Zellsterben auftrat. Der LD₅₀ wurde mit 1,5% im Fit der Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet. Das Resultat dieses Versuchs war eine starke zytotoxische Wirkung des *P. aeruginosa* Sekretoms auf eine immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie.

Einfluss von FKS auf die Zellviabilitätstests

Für eine optimale Versorgung der Zellen ist der Einsatz FKS im Medium essentiell. Gleichzeitig hat FKS einen Einfluss auf die proteolytische Aktivität des Sekretoms [74]. Die Auswirkungen von FKS auf die proteolytische Aktivität des Sekretoms wurden in einem Vor-Test mit FITC-Casein im FRET und unterschiedlichen Konzentrationen an FKS- und Wachstumsmedium untersucht. Das Wachstumsmedium (beinhaltet 10% FKS) reduzierte die proteolytische Aktivität

des Sekretoms um mehr als 80% (siehe Anhang). Diese Beobachtung wurde anschließend in Zellviabilitäts-Tests mit unterschiedlichen FKS-Konzentrationen im Medium überprüft (Abb. 33).

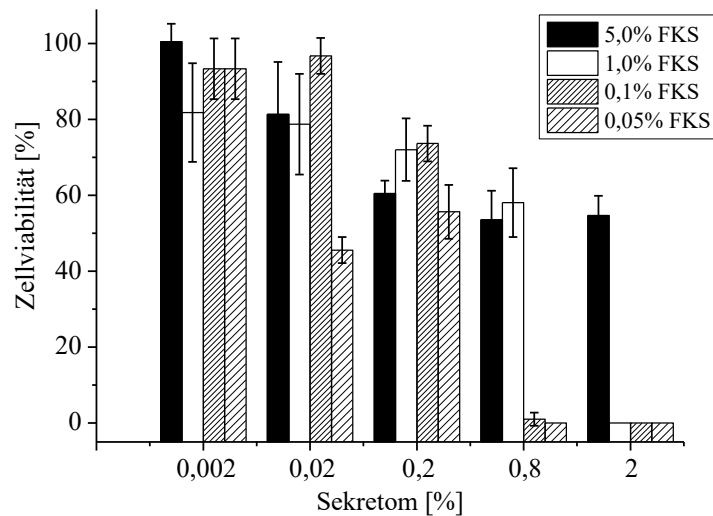


Abb. 33: Einfluss von FKS im Medium auf die Zytotoxizität des Sekretoms. Konfluente HaCaT-Kulturen wurden 24 h mit variierenden Sekretom-Konzentrationen inkubiert, dabei variierten die eingesetzten FKS-Konzentrationen. Dargestellt sind die MW \pm SD, bei unterschiedlichen Sekretom-Konzentrationen relativ zur unbehandelten Kontrolle (gleiche FKS-Konzentration ohne Sekretom) (n=2 Messungen mit 3 Replikaten).

Je höher diese FKS-Konzentration war, desto geringer fielen die toxischen Auswirkungen des Sekretoms auf die Zellviabilität ins Gewicht. Beim Einsatz von bis zu 0,1% FKS starben bereits mit 0,8% Sekretom alle Zellen ab, bei 1% FKS im Medium wurden bei 2% Sekretom eine totale Toxizität ausgelöst. Nach dieser Behandlung mit 2% Sekretom, aber einer FKS-Konzentration von 5% wurde lediglich eine eingeschränkte Viabilität festgestellt und zum Abtöten aller Zellen waren bei Verwendung des Wachstumsmediums mindestens 10% Sekretom, also die 10-fache Menge im Vergleich zur niedrigsten FKS-Konzentration notwendig. Damit wurde die Annahme bestätigt, dass FKS die Zytotoxizität des Sekretoms herabsetzte. In der vorliegenden Arbeit wurden alle folgenden Viabilitätsstudien mit 5% FKS/Well durchgeführt, um einen bestmöglichen Vitalitätszustands der Zellen sicherzustellen und konsistente Bedingungen zu simulieren. Beim Vergleich mit Literatur-Daten fällt auf, dass die FKS-Konzentration ein entscheidender Parameter ist, der nicht vernachlässigt werden kann.

Wirkung von IMPI-GST auf die Viabilität von mit Sekretom behandelten Zellen

Bevor die potenzielle Wirkung von IMPI-GST auf die zytotoxische Sekretombehandlung untersucht wurde, sollte zunächst geprüft werden, ob dieser Inhibitor selbst einen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Dazu wurden HaCaTs mit steigenden Konzentrationen an IMPI-GST oder dem Vergleichsinhibitor PA behandelt und WST-1-Tests durchgeführt (siehe Anhang). Weder

IMPI-GST (18 nM–53 μ M) noch PA (10 nM–1 mM) zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Damit wurde die Unbedenklichkeit einer IMPI-GST Anwendung an Keratinozyten belegt.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von IMPI-GST auf mit Sekretom behandelte Zellen wurden 17% Sekretom mit steigenden Konzentrationen an IMPI-GST und zum Vergleich mit PA versetzt und auf HaCaT-Zellen appliziert. Die Sekretom-Konzentration wurde vorher als absolut toxisch ermittelt (Abb. 32) und in diesem Versuch eingesetzt, um ohne den Einsatz eines Inhibitors einen kompletten, schnellen Zelltod zu garantieren. Nach 24-stündiger Inkubation der Sekretom-Inhibitor-Kombination wurde die Viabilität der Keratinozyten bestimmt. Durch Zugabe von IMPI-GST oder PA (Abb. 34) wurde ein asymptotischer Anstieg der Viabilität festgestellt.

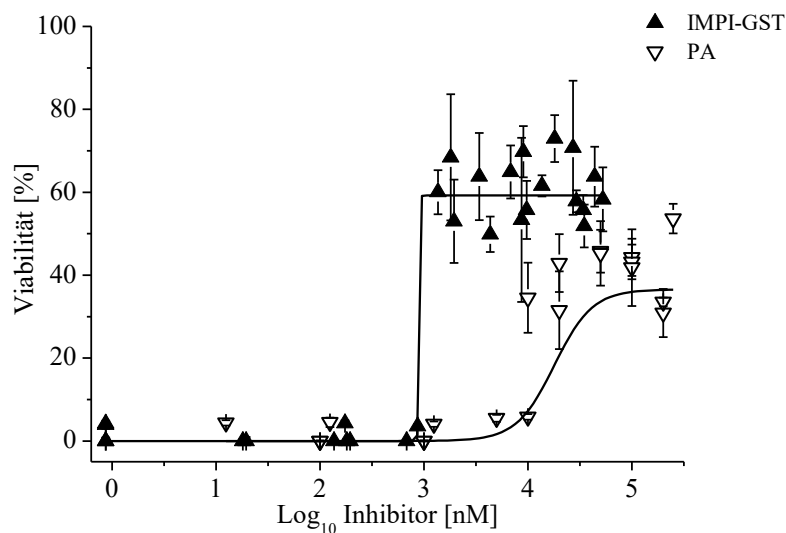


Abb. 34: Zellviabilität von HaCaTs behandelt mit Sekretom und IMPI-GST oder PA. Konfluente HaCaT-Kulturen wurden 24 h mit 17% Sekretom in Kombination mit steigenden Konzentrationen an IMPI-GST- oder PA inkubiert. Dargestellt sind die MW \pm SD, relativ zur unbehandelten Kontrolle (n=3; IMPI-GST: bereinigtes $R^2=0,90$; $IC_{50}=0,90 \mu$ M; PA: bereinigtes $R^2=0,88$; $IC_{50}=180 \mu$ M).

Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen unterschieden sich in ihrer Steigung und dem jeweiligen Endwert. Durch Zugabe einer IMPI-GST-Konzentration von 1,2 μ M erhöhte sich die Viabilität auf etwas über 60%. Im Vergleich dazu wurde der Maximalwert von PA erst bei Zugabe von als 20 μ M bei einer Viabilität von etwa 40% erreicht. Der EC_{50} -Wert lag bei 900 nM IMPI-GST oder 1,8 μ M PA. Beide Inhibitoren verhinderten die durch das Sekretom hervorgerufene Zytotoxizität, wobei IMPI-GST eine größere und effizientere Wirkung als der Referenzinhibitor PA hatte.

In keinem der Experimente wurde die toxische Wirkung von 17% Sekretom komplett verhindert und eine Viabilität vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle (100%) erreicht. Daher wurde

untersucht, ob sich die Zellen noch rehabilitieren können oder ob geringere Sekretom-Konzentrationen bei gleichem Einsatz der Inhibitoren zu einem totalen Schutz der Zellen führen können. Es wurde die mögliche Erholung der Zellen erforscht, indem sie nach der oben beschriebenen Behandlung mit Sekretom und Inhibitor weitere 24 h mit Wachstumsmedium inkubiert wurden. Die Zellen zeigten nach der Rehabilitation erhöhte Viabilitätswerte von über 70% (Abb. 35). Das Ergebnis war unabhängig von dem verwendeten Inhibitor, allerdings zeigte sich IMPI-GST anhand der nach links verschobenen asymptotischen Kurve weiterhin als effizienterer Inhibitor.

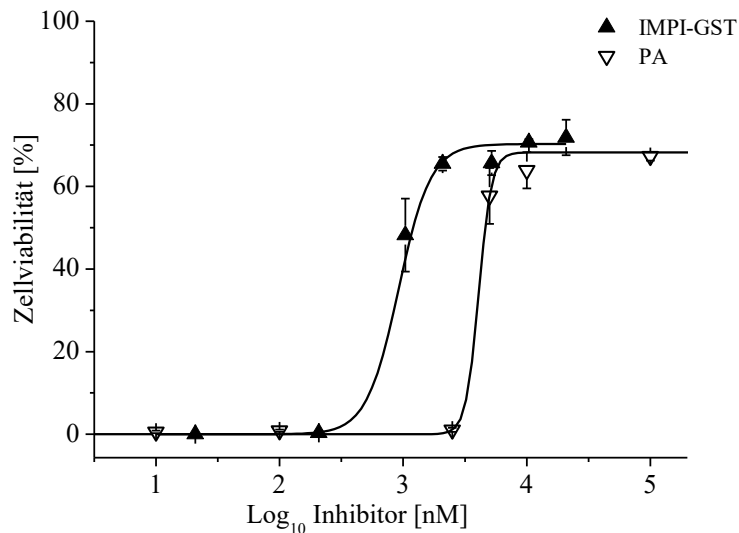


Abb. 35: Zellviabilität von HaCaTs 24 h nach der Behandlung mit Sekretom und Inhibitor. Konfluente HaCaT-Kulturen wurden 24 h mit 17% Sekretom in Kombination mit steigenden Konzentrationen an IMPI-GST- oder PA behandelt und weitere 24 h in Wachstumsmedium inkubiert. Die Ergebnisse zeigen die MW \pm SD, relativ zur unbehandelten Kontrolle (n=3; IMPI-GST: bereinigtes $R^2=0,9994$; berechneter $IC_{50}=0,92 \mu\text{M}$; PA: bereinigtes $R^2=0,994$; berechneter $IC_{50}=4,09 \mu\text{M}$).

Zur Untersuchung geringerer Sekretom-Konzentrationen wurden die Zellen mit 3% Sekretom und steigenden Inhibitor-Konzentrationen 24 h behandelt und anschließend ihre Viabilität bestimmt (Abb. 36). Ohne Inhibitor resultierte die Behandlung von 3% Sekretom in einem Viabilitätsverlust von etwa 30%. Durch Zugabe von IMPI-GST oder PA konnte die Wirkung des Sekretoms komplett aufgehoben werden und eine Viabilität von 100% wurde erreicht. In diesem Experiment stieg die Dosis-Wirkungs-Kurve von IMPI-GST im Vergleich zu PA bereits bei niedrigeren Konzentrationen, womit sich wieder eine effizientere Wirkung von IMPI-GST zeigte. Im Vergleich zu den Studien mit 17% Sekretom wurde in diesem Versuch bei geringeren Inhibitor-Konzentrationen, 100 nM IMPI-GST und 1,5 μM PA, eine signifikante Erhöhung der Viabilität gemessen.

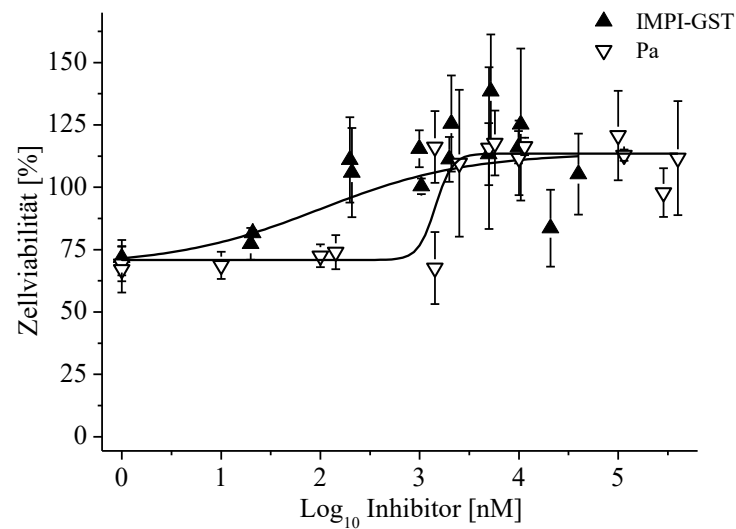


Abb. 36: Zellviabilität nach der Behandlung mit 3% Sekretom und IMPI-GST oder PA. Konfluente HaCaT-Kulturen wurden 24 h mit 3% Sekretom in Kombination mit steigenden IMPI-GST- oder PA-Konzentrationen 24 h inkubiert. Dargestellt sind die MW \pm SD, relativ zur unbehandelten Kontrolle (n=3; IMPI-GST: bereinigtes $R^2=0,85$; berechneter $IC_{50}=98,8$ nM; PA: bereinigtes $R^2=0,93$; berechneter $IC_{50}=1,44$ μ M).

Zusammengefasst bestätigten diese Zellviabilitätsstudien die Wirksamkeit von IMPI-GST gegen das zytotoxische Sekretom von *P. aeruginosa* auf Keratinozyten. Das Sekretom verursachte eine totale Zytotoxizität, die durch Zugabe von PE-Inhibitoren um bis zu 70% verhindert wurde. IMPI-GST war dabei immer der effizientere Inhibitor im Vergleich zu PA. In allen Versuchen war die Größenordnung der eingesetzten Inhibitor-Konzentration konsistent zu den vorher in proteolytischen Aktivitätstests ermittelten notwendigen Konzentrationen (Abb. 31).

4.1.3 Mikroskopie und Immunhistologie der behandelten Zellen

In den gezeigten Zellviabilitätsstudien löste das Sekretom ein totales Zellsterben aus. Zur Identifikation der hierfür ursächlichen Zusammenhänge wurden die mit Sekretom behandelten Zellen in An- und Abwesenheit von IMPI-GST mikroskopisch und über immunhistologische Färbungen des Zellkerns und des Zytoskeletts ausgewertet.

Auswirkung des Sekretoms auf Zellkulturen

Eine HaCaT-Zelllinie wurde mit einer absolut toxischen Konzentration von 10% Sekretom versetzt und über 24 h im Brutschrank beobachtet (Abb. 37).

Die Zugabe von 10% Sekretom führte nach etwa 3 h zu ersten sichtbaren Löchern in dem konfluenten Zellrasen, die sich im Laufe der Inkubationszeit stetig vergrößerten und schließlich nach 8 h das Ablösen des kompletten Zellrasens verursachte. Dieser Ablösevorgang begann an zellfreien Bereichen, Löchern oder vom Rand des Zellrasens. Insbesondere an den Aufnahmen

nach 7,5 h oder 8 h wurde an einer breiten, vermutlich übereinanderliegenden Zellschicht deutlich, dass sich der Zellrasen von diesen Rändern des Monolayers abrollte und schließlich als Zellaggregat losgelöst im Medium schwamm.

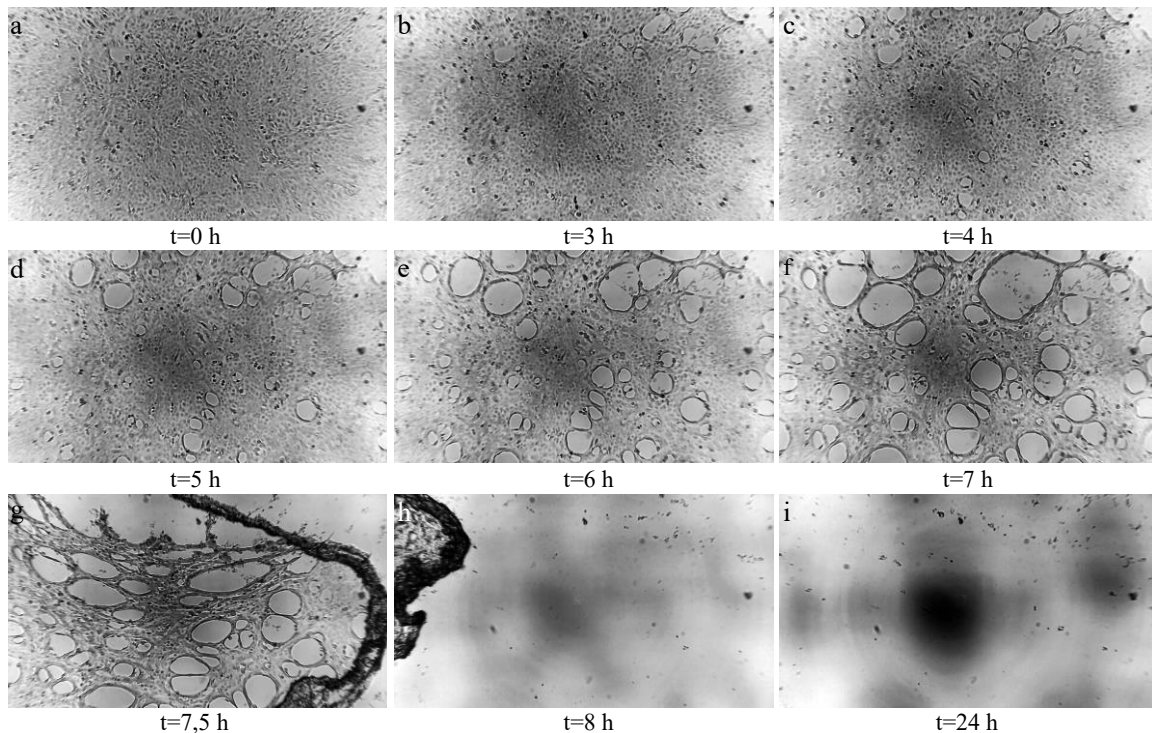


Abb. 37: Auswirkung des Sekretoms auf HaCaTs in Abhängigkeit der Inkubationsdauer. Eine konfluente HaCaT-Kultur wurde mit 10% Sekretom im Wachstumsmedium für 24 h inkubiert. Die repräsentativen Bilder aus fünf Experimenten wurden von einer Mikroskop-Kamera (CytoSMART Lab assistant) direkt im Brutschank zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommen.

Die Zellablösung war bedingt durch das Sekretom und sowohl zeit- (Abb. 37) als auch konzentrations-abhängig (Abb. 38). Mit zunehmender Inkubationszeit erhöhten sich die zellfreien Bereiche in dem Zellrasen ebenso wie mit steigender Sekretom-Konzentration. Unter Zugabe von 3% Sekretom traten nach 24 h teilweise kleine zellfreie Bereiche am Rand des Monolayers auf. In Anwesenheit von 6,5% Sekretom waren nach gleicher Dauer bereits große Löcher deutlich zu erkennen und nach der Behandlung mit 10% Sekretom wurden keine Zellen mehr detektiert.

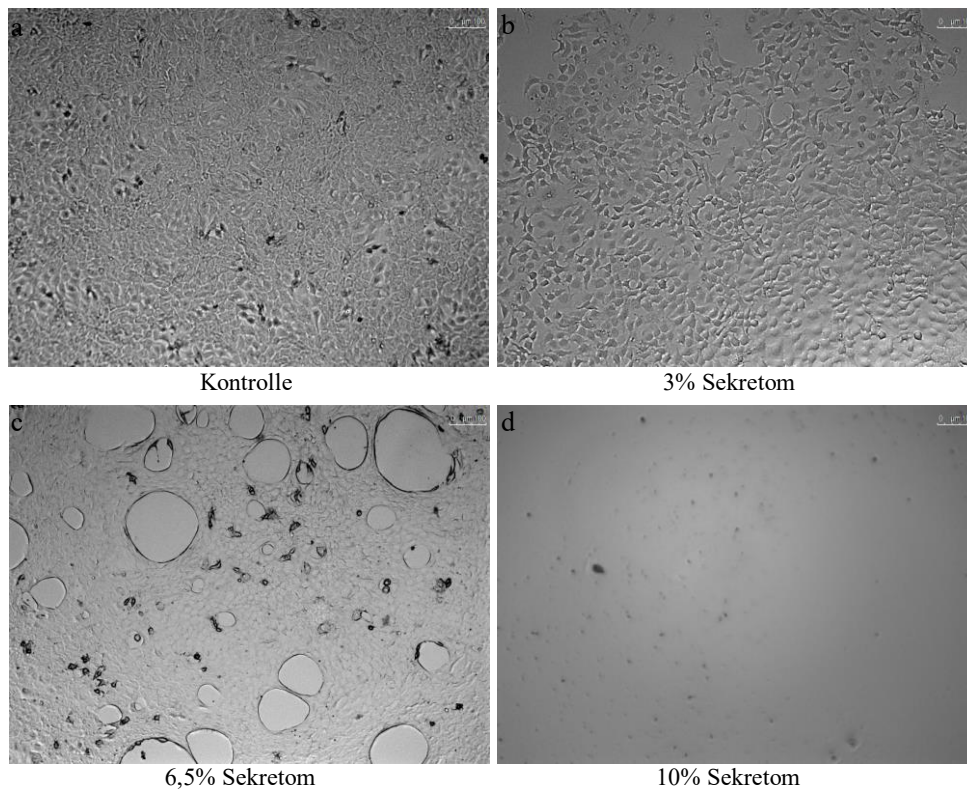


Abb. 38: Auswirkung der Sekretom-Konzentration auf HaCaTs. Eine konfluente HaCaT-Kultur wurde mit unterschiedlichen Sekretom-Konzentrationen im Wachstumsmedium für 24 h inkubiert und im Durchlichtmikroskop aufgenommen. Die Größenbalken entsprechen 100 μm . Die repräsentativen Bilder aus fünf Experimenten sind im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

In Abb. 37c-h und Abb. 38c wurde ein Abrollen der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturplatte erkennbar, das an den Rändern der zellfreien Bereiche begann. Dabei sind vermutlich Zell-Oberflächen- und Zell-Zell-Verbindungen beteiligt.

Zur besseren Visualisierung dieser Ablösevorgänge wurden F-Aktin und Zellkerne des porösen Zellrasens immunhistologisch angefärbt (Abb. 39). Die Abb. 39b-h bestätigen die Annahme, dass sich die Zellen an den Rändern des Zellrasens von der Oberfläche ablösen. Insbesondere an dem um 90° gedrehten Bild (Abb. 39g) ist das Überlagern der Zellen in die Z-Ebene deutlich zu erkennen. Diese Aufnahmen der Ränder des Zellrasens ließen vermuten, dass die Zellen zunächst ihre Verbindung zur Platte verloren, bevor sie komplett abgelöst waren. Darüber hinaus traten morphologisch veränderte F-Aktin-Strukturen auf, die Ähnlichkeiten mit Filopodien (in Abb. 39d, e und h) oder Stressfasern aufweisen (h).

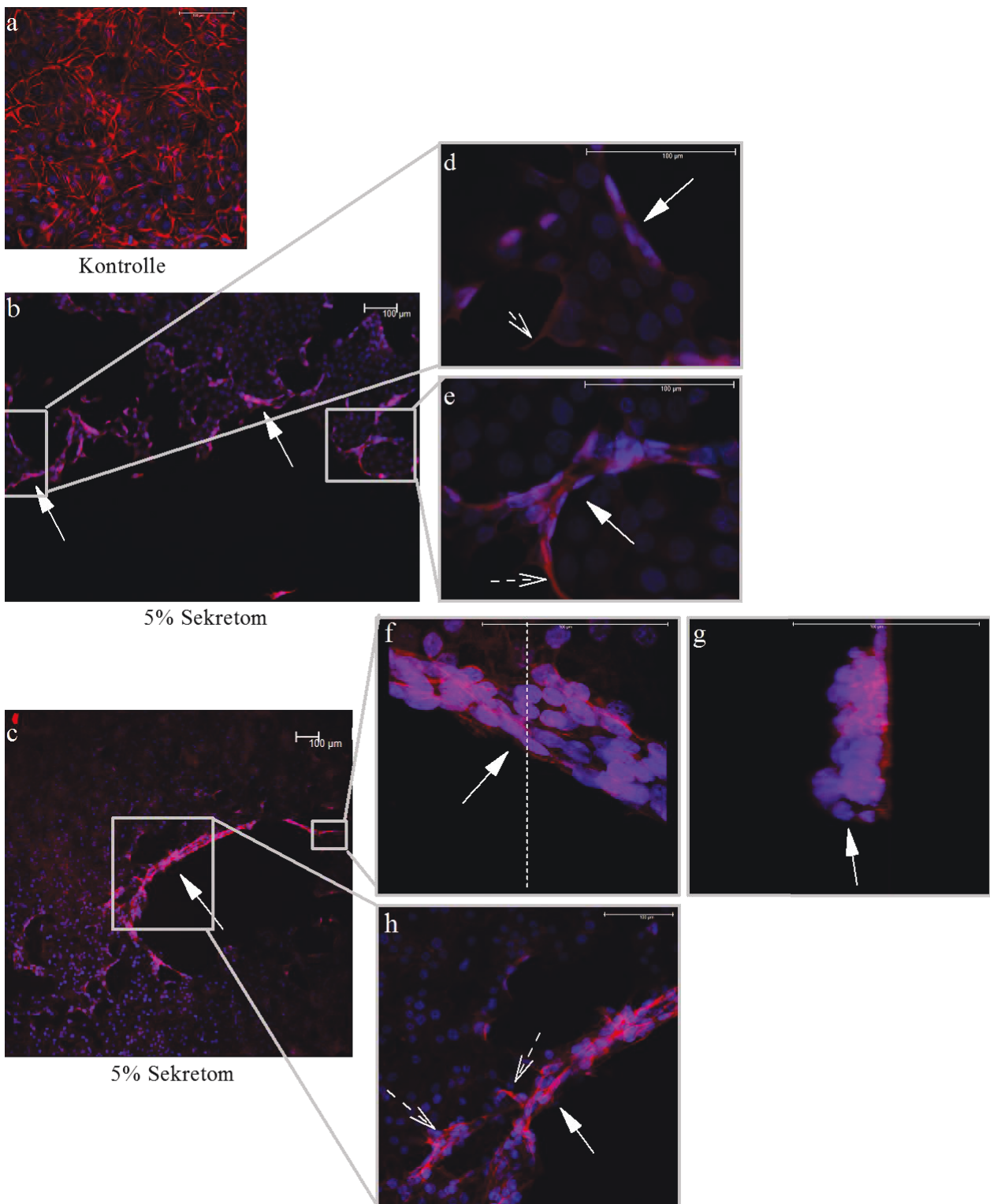


Abb. 39: Immunhistologische Färbung von mit 5% Sekretom behandelten HaCaTs. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus fünf Experimenten einer mit 5% Sekretom über 24 h inkubierten konfluenten HaCaT-Kultur im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (a) in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die F-Aktin-Fasern (rot) und die Zellkerne (blau) sind immunhistologisch gefärbt. Die Bilder b, d-e wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop, a, c, f-h mit dem konfokalem Lasermikroskop aufgenommen. Die Größenbalken entsprechen 100 μm. Bild g zeigt das an der gestrichelten Linie um 90° gedrehte Bild f. Die gefüllten Pfeilspitzen zeigen auf übereinander liegende Zellen, die gestrichelten Pfeile mit leeren Spitzen weisen auf abnormale F-Aktin Strukturen hin.

Die morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts traten ebenso an den Rändern des Monolayers, wie in konfluenten Bereichen des mit Sekretom behandelten Zellrasens auf (Abb. 40).

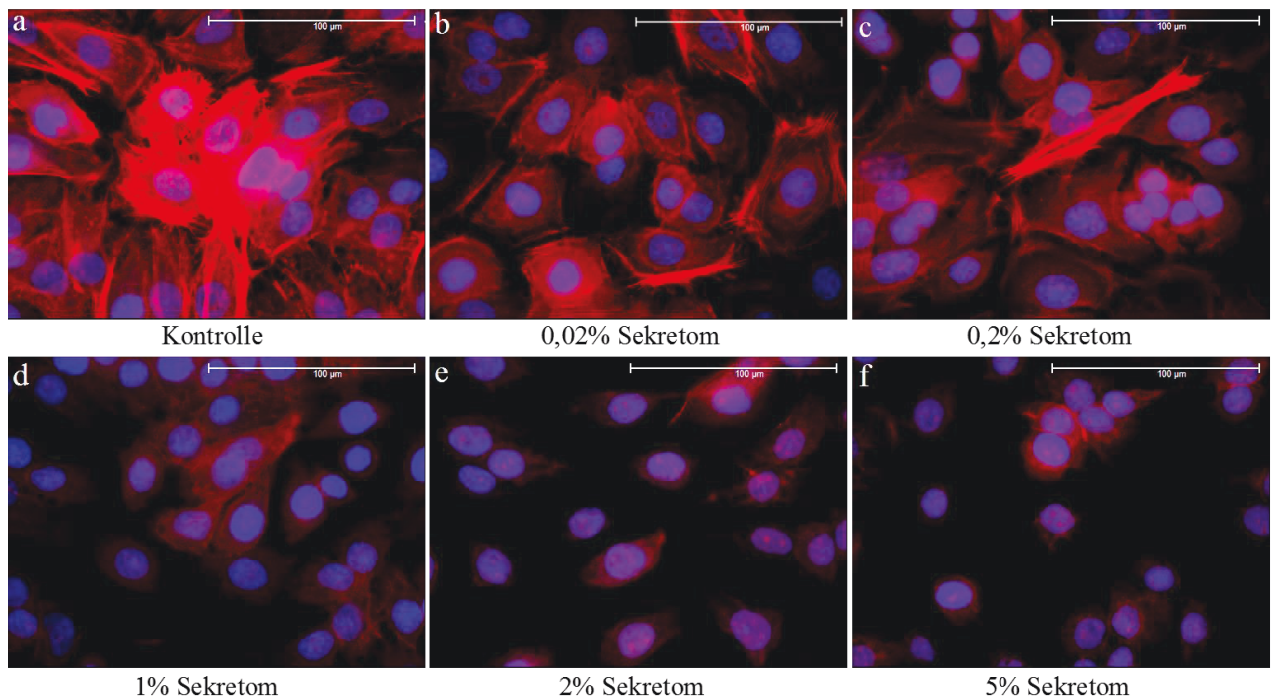


Abb. 40: Immunhistologische Färbungen von mit steigenden Sekretom-Konzentrationen behandelten HaCaTs. Konfluente HaCaT-Zellen wurden mit unterschiedlichen Sekretom-Konzentrationen (in %) für 24 h inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines immunhistologisch gefärbten Zellrasens aus vier Experimenten mit 0,02% (b); 0,2% (c); 1% (d); 2% (e) und 5% (f) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (a). Aufgenommen wurden die Bilder im Fluoreszenzmikroskop mit 63x Öl-Immersion-Objektiv. Die Größenbalken entsprechen 100 µm.

In der unbehandelten Kontrolle war der Zellkortex klar durch viele scharfe, rot gefärbte F-Aktin-Fasern zu erkennen. Verstärkte Aktin-Fasern traten entlang der Zellperipherie auf, teilweise sind interzelluläre Aktin-Verbindungen zu erkennen. Bereits ab 0,02% (Abb. 40b) Sekretom wurde weniger F-Aktin, insbesondere zwischen den Zellen, beobachtet, zusätzlich waren vereinzelt in Abb. 40b und c Stressfasern zu sehen. Durch die Behandlung mit 0,2% Sekretom sank die Intensität des F-Aktins weiter ab. Nach der Applikation von 1% Sekretom war das Zytoskelett nicht mehr um alle Zellkerne zu beobachten und das rot angefärbte Aktin wirkte diffus. Diese Retraktion der Fasern zum Zellkern setzte sich bei Anwesenheit von 2% und 5% Sekretom weiter fort. In Abb. 40e und f war kein Zytoskelett mehr zu erkennen, das F-Aktin war teilweise dünn und porös am Zellkern zu erahnen. Zusammenfassend verringerten sich mit steigender Sekretom-Konzentration die Schärfe und die Intensität der fluoreszenzgefärbten Aktin-Filamente bis in Anwesenheit von 10% Sekretom überhaupt keine zellulären Bestandteile mehr nachgewiesen wurden.

Einfluss von IMPI-GST auf mit Sekretom behandelte Zellkulturen

Das Sekretom von *P. aeruginosa* bewirkte die Anoikis von Keratinozyten (Abb. 38). Zur Überprüfung der Wirksamkeit von IMPI-GST wurde es gleichzeitig mit dem Sekretom auf die Zellen appliziert und die Auswirkungen mikroskopisch beobachtet (Abb. 41). In Abwesenheit des Proteaseinhibitors IMPI-GST ($0 \mu\text{M}$) wurden, wie in Abb. 38, keine Zellen detektiert (Abb. 41a).

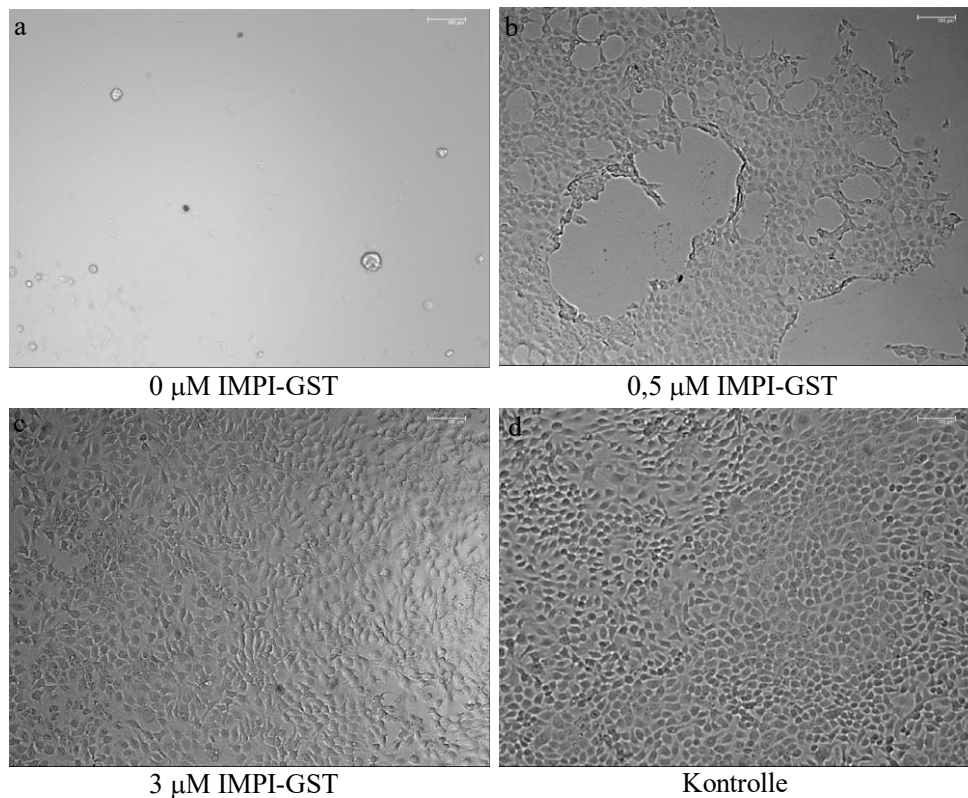


Abb. 41: Mikroskopische Aufnahmen von HaCaTs behandelt mit Sekretom und IMPI-GST. Konfluente HaCaT-Zellen wurden mit 10% Sekretom (a) und $0,5 \mu\text{M}$ (b) oder $3 \mu\text{M}$ (c) IMPI-GST für 24 h inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Bilder einer Zellschicht von fünf identischen Experimenten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (d). Die Größenbalken entsprechen $100 \mu\text{m}$.

Die gleichzeitige Applikation von $0,5 \mu\text{M}$ IMPI-GST (b) führte zu einem löchrigen Zellrasen. Die Zugabe von $3 \mu\text{M}$ IMPI-GST (c) resultierte in einer nahezu konfluente Zellschicht, die sich optisch nicht von der unbehandelten Kontrolle unterschied (Abb. 41d). Zur besseren Visualisierung der auftretenden Effekte wurden die Zellen immunhistologisch gefärbt (Abb. 42). Dabei wurden in Anwesenheit von 10% Sekretom und $0,5 \mu\text{M}$ IMPI-GST ähnliche poröse Zell-Monolayer beobachtet, wie nach Zugabe von 5% Sekretom ohne PE-Inhibitor (Abb. 39). Die Zellen waren teilweise von der Oberfläche abgelöst und überlagerten sich an den Rändern des löchrigen Zellrasens (gefüllte Pfeile). Außerdem wurden Veränderungen in der Struktur des Zytoskeletts beobachtet (Abb. 42b, c). Ähnlich der Abb. 39 traten Filopodien- und

Lamellipodien-artige Aktin-Strukturen auf, die insbesondere am abgelösten und “umgeklappten” Zellrasen vorkamen.

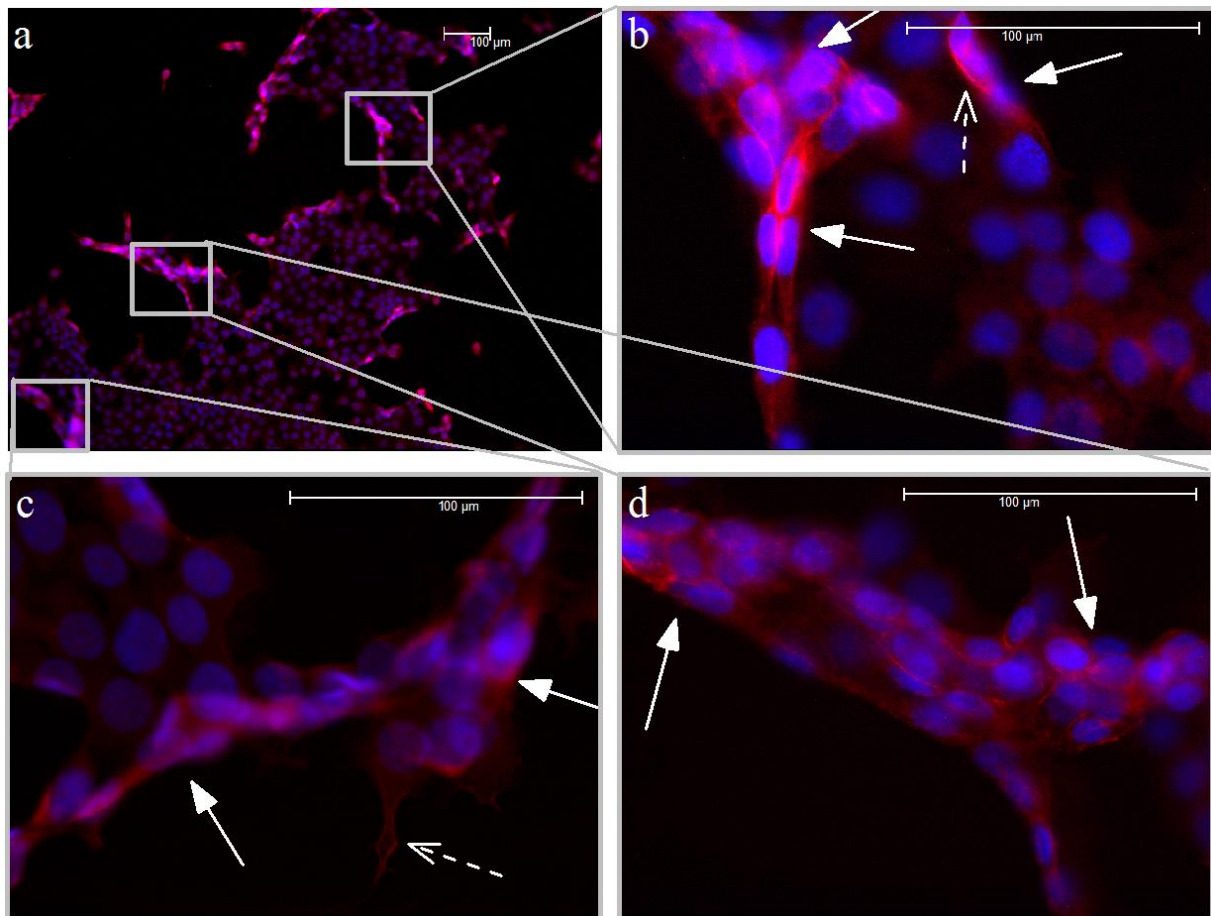


Abb. 42: Immunhistologisch gefärbte, mit 10% Sekretom und 0,5 µM IMPI-GST behandelte HaCaTs. Konfluente HaCaT-Zellen wurden mit 10% Sekretom und 0,5 µM IMPI-GST für 24 h inkubiert. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für fünf identische Experimente in unterschiedlichen Vergrößerungen im Fluoreszenzmikroskop. Die Größenbalken entsprechen 100 µm. Die gefüllten Pfeilspitzen zeigen auf übereinander liegende Zellen, die gestrichelten Pfeile mit leeren Spitzen weisen auf abnormale F-Aktin Strukturen hin.

Mit steigender IMPI-GST-Konzentration veränderten sich die mit 10% Sekretom vorbehandelten HaCaT-Zellkultur stetig (Abb. 43). Ohne IMPI-GST (Abb. 43b) lösten sich bei Zugabe von 10% Sekretom, wie bereits in Abb. 41a gezeigt, alle Zellen von der Oberfläche. Bei gleichzeitiger Behandlung mit IMPI-GST wurden adhärenente Zellen mit intaktem Zellkern, allerdings mit einem im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle veränderten Zytoskelett, detektiert. Generell war die Intensität des Aktins, bei gleichen Einstellungen im Fluoreszenz-Mikroskop, im Vergleich zur Kontrolle, reduziert. Das Zytoskelett wirkte unscharf und porös, teilweise wurde verändertes F-Aktin beobachtet. Die morphologisch abweichenden Aktin-Strukturen fielen insbesondere in Abb. 43c und d auf. In c waren Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien zu

erkennen und in der gleichen Zellkultur, an einer anderen Stelle traten (in Abb. 43d) diffuse, entspannte Fasern auf.

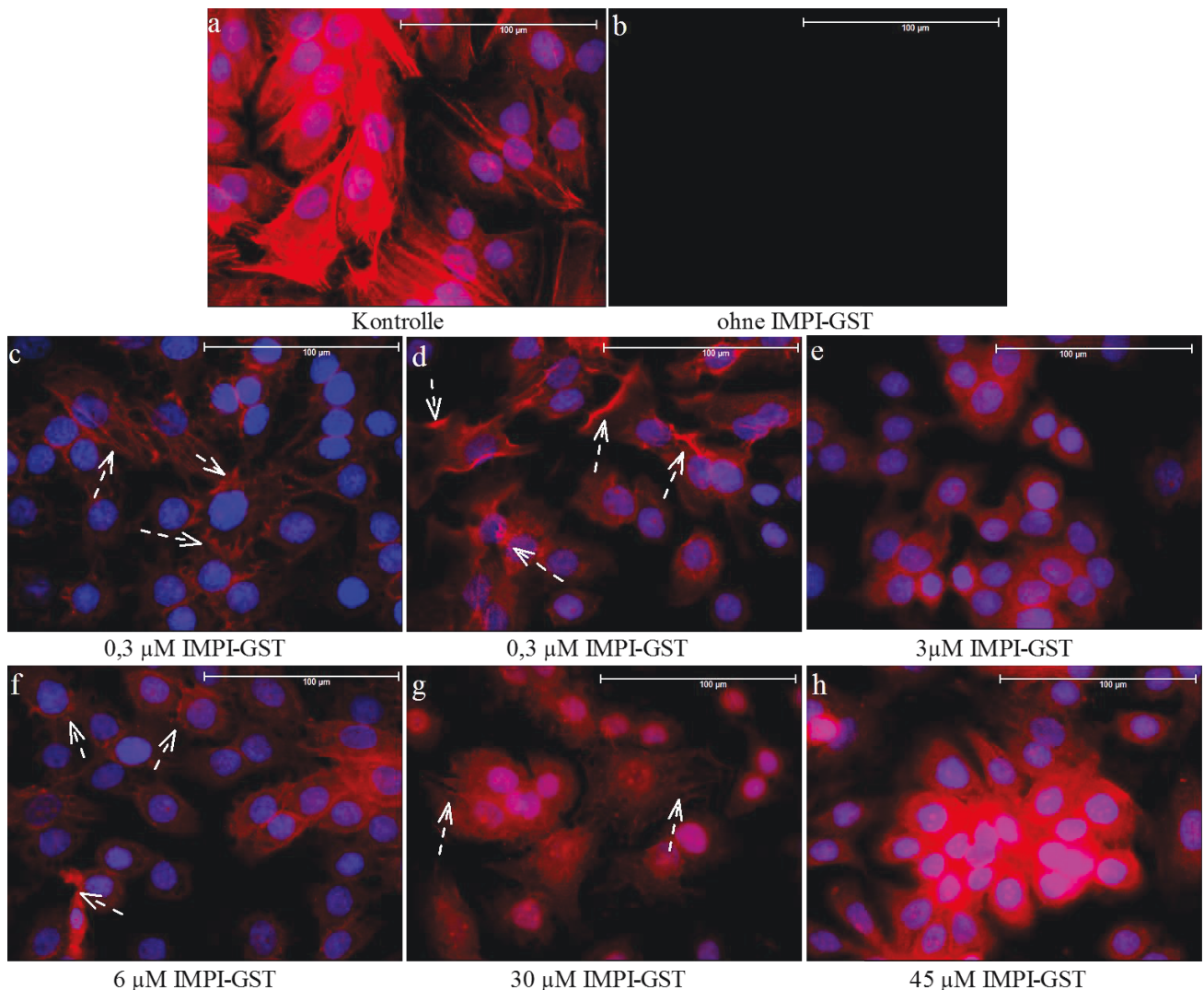


Abb. 43: Immunhistologisch gefärbte, mit 10% Sekretom und IMPI-GST behandelte HaCaT-Zellen. Konfluente HaCaT-Zellen wurden mit 10% Sekretom und steigenden IMPI-GST-Konzentrationen über 24 h inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Bilder von vier identischen Experimenten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, aufgenommen im Fluoreszenzmikroskop mit 63x Öl-Immersions-Objektiv (Größenbalken entspricht 100 μm). Die gestrichelten leeren Pfeile weisen auf morphologisch verändertes F-Aktin hin.

Bei Applikation von 3 μM IMPI-GST wurde in Abb. 41 ein konfluenter Zellrasen detektiert, in der immunhistologischen Färbung (Abb. 43e) wurde stark reduziertes F-Aktin ermittelt. Bei Applikation von 6 μM IMPI-GST (Abb. 43f) erhöhte sich die Intensität leicht, es traten Stressfasern und punktuelle Verstärkungen des F-Aktins in einem unscharf abgebildeten Zytoskelett auf. Mit steigender IMPI-GST-Konzentration vergrößerten sich die roten, F-Aktin-reichen Bereiche rund um den Zellkern, gleichzeitig verringerte sich das Vorkommen von Stressfasern und punktuellen Verstärkungen. Weiterhin waren bei Behandlung mit 30 μM und 45 μM IMPI-GST unscharfe F-Aktin-Fasern mit geringerer Intensität zu erkennen.

Beim Einsatz von 45 μM IMPI-GST erhöhte sich die Fluoreszenz-Intensität weiter, was auf ein vermehrtes Vorkommen an F-Aktin hindeutete. Diese Probe mit der höchstmöglichen IMPI-GST-Konzentration war dennoch nicht mit der Zellmorphologie der unbehandelten Kontrolle zu vergleichen. Es wurden keine scharfen Strukturen des Zytoskeletts beobachtet, sondern eher eine diffuse, rote Färbung um die Zellkerne. Weder der Zellkortex, noch interzelluläre Fasern wurden in Anwesenheit von 45 μM IMPI-GST ermittelt.

Anhand der mikroskopischen und immunhistologischen Beobachtungen der mit Sekretom und IMPI-GST behandelten Zellkulturen wurde ein konfluenter Zellrasen detektiert, dennoch traten keine mit der Kontrolle vergleichbare morphologische Strukturen auf. Dieses Ergebnis deckte sich mit dem vorher ermittelten Resultat der Zytotoxizitätsstudien (4.1.2). IMPI-GST wurde eine positive Wirkung auf die mit Sekretom behandelten Zellen nachgewiesen, denn ohne den Zusatz des Inhibitors überlebte keine Zelle die Behandlung mit 10% Sekretom.

4.1.4 Zellmigrationsstudien

Die Migration der Keratinozyten ist einer der zentralen Vorgänge in der Wundheilung [30]. Deshalb wurde der Einfluss des *P. aeruginosa* Sekretoms auf die zu untersuchende Migration einer immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) in dem definierten Zellmigrations-Testsystem (Ibidi®) unter Zugabe des Sekretoms beobachtet (Abb. 44). In der unbehandelten Kontrolle migrierten die Zellen innerhalb von 24 h soweit in den zellfreien Spalt, dass dieser fast komplett geschlossen wurde. In Anwesenheit von 0,5% Sekretom wurde kein Unterschied zur Kontrolle beobachtet und der Riss in dem *in vitro* Modell war ebenfalls nahezu komplett zugewachsen. Mit steigender Konzentration des Sekretoms verringerte sich die Migration der Zellen, bei Zugabe von 1% Sekretom war ein deutlicher Spalt in dem Zellrasen zu erkennen. Ab der Applikation von 5% Sekretom vergrößerte sich der zellfreie Spalt und in Anwesenheit von 10% wurden keine Zellen mehr detektiert. Diese zellablösenden Effekte entsprachen den Ergebnissen der Zellviabilitätstests (4.1.2) sowie den mikroskopischen und immunhistologischen Auswertungen (4.1.3).

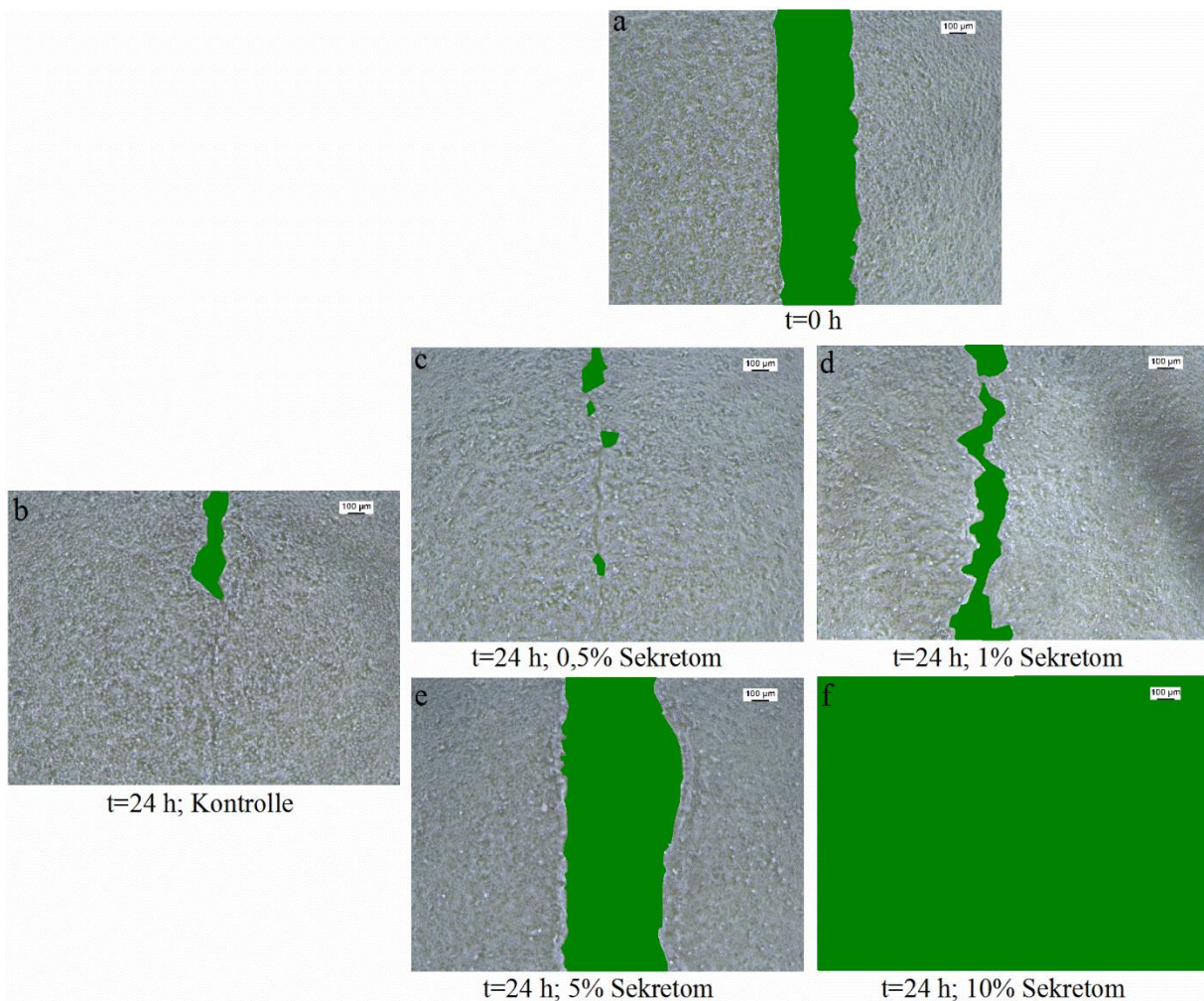


Abb. 44: Einfluss des Sekretoms auf die Migration von HaCaTs. Dargestellt sind mikroskopischen Aufnahmen von HaCaT-Zellen im Migrations-Testsystemen zum Start-Zeitpunkt $t=0$ h (a) und nach einer Inkubation von $t=24$ h (b: Kontrolle) mit verschiedenen Sekretom-Konzentrationen (c-f, in %). Die zellfreie Fläche wurde zur Verdeutlichung grün markiert, die Größenbalken entsprechen $100\ \mu\text{m}$.

Anschließend wurden die Daten der Migration über die Berechnung der zellfreien Fläche nach der Inkubation mit Sekretom in An- oder Abwesenheit von IMPI-GST aufgenommen (Abb. 45). Das Ergebnis zeigte eine mit steigender Sekretom-Konzentrationen abnehmende Migration (Abb. 45a). Ab einer Sekretom-Konzentration von 1% war die Zellmigration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant reduziert. Ab einer Sekretom-Konzentration von 10% löste sich der Zellrasen komplett ab, was zu einer zellfreien Fläche von etwa $40\ \text{mm}^2$ führte und eine negative Migration von etwa -1000% bedeutete.

Nachfolgend sollte die Wirkung von IMPI-GST auf die Zellmigration von mit Sekretom behandelten Zellen untersucht werden. Zur Kontrolle wurde zuerst ermittelt, dass IMPI-GST keinen signifikanten Einfluss auf die Zellmigration hatte (1500 nM ohne Sekretom; Daten sind nicht abgebildet). Anschließend wurden die HaCaT-Zellen mit 2% Sekretom in Kombination mit steigenden IMPI-GST-Konzentrationen versetzt (Abb. 45b).

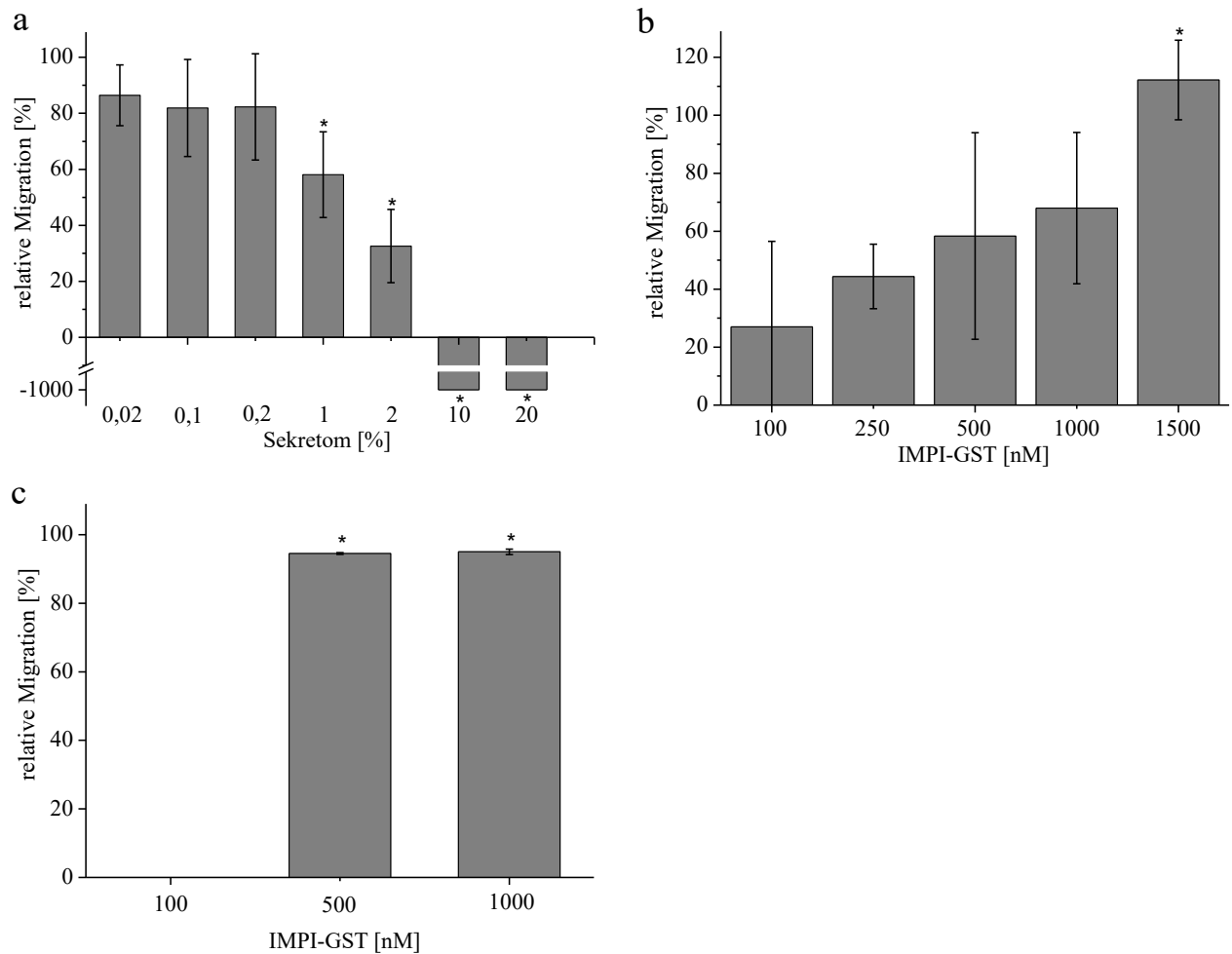


Abb. 45: Migration von Keratinozyten unter dem Einfluss von Sekretom und IMPI-GST. Im Zellmigrations-Testsystem wurden HaCaT-Zellen jeweils mit 500 μ l frischem Medium mit unterschiedlichen Sekretom-Konzentration in **a**, mit 2% Sekretom und unterschiedlichen IMPI-GST-Konzentrationen in **b** sowie mit 10% Sekretom und unterschiedlichen IMPI-GST-Konzentration in **c** über 22 h inkubiert. Anschließend wurden die zellfreien Bereiche markiert und die Flächeninhalte bestimmt. Diese sind als MW \pm SD von n=3 unabhängigen Experimenten relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur unbehandelten Kontrolle (**a**) oder zur Behandlung ohne IMPI-GST (**b,c**) sind jeweils mit * gekennzeichnet.

Ohne den potenziellen Wirkstoff IMPI-GST wurde im Durchschnitt eine negative Migration von -20% in diesem Experiment gemessen. Bei steigender Applikation von IMPI-GST stieg die Zellmigration an. Eine signifikante Zunahme der Migration wurde in Anwesenheit von 1500 nM IMPI-GST erreicht. Die daraus resultierten Werte waren nicht mehr von der unbehandelten Kontrolle zu unterscheiden. In Abb. 45c wurde die Migration einer mit 10% Sekretom und steigenden IMPI-GST-Konzentrationen behandelnden Zellkultur bestimmt. In Abwesenheit von IMPI-GST oder in Kombination mit 100 nM IMPI-GST wurde ein komplettes Zellsterben beobachtet und damit eine negative Migration gemessen. Die Zugabe von 500 nM IMPI-GST verhinderte diese Zellablösung, wie bereits in Abb. 34 gezeigt, eine positive Migration von 14% wurde in Kombination mit 1000 nM IMPI-GST nachgewiesen.

4.1.5 Untersuchung des *ex vivo* Wundmodells

Nach der molekularen Wirkstoffcharakterisierung von IMPI-GST (4.1.1) und der *in vitro* Testung an einer Keratinozyten-Zelllinie (4.1.2) folgte die Untersuchung in einem *ex vivo* Schweinehaut-Wundmodell. Dafür wurde zunächst der Einfluss des Sekretoms und anschließend das Sekretom in Kombination mit 1,5 μ M IMPI-GST auf dem *ex vivo* Wundmodell untersucht. Nach zwei Wochen Inkubation und täglicher Zugabe der Sekretom- und IMPI-GST-Proben auf die Wunden, wurden die Gewebeproben histologisch analysiert (Abb. 46). Dabei fiel auf, dass die Wundbreite einheitlich war und sich die Wundtiefen teilweise unterschieden. Innerhalb von 2 Wochen kam es zur Ausbildung einer Wundzunge. Je nach Behandlung wurden große Unterschiede in den histologisch gefärbten Schnitten deutlich (Abb. 46).

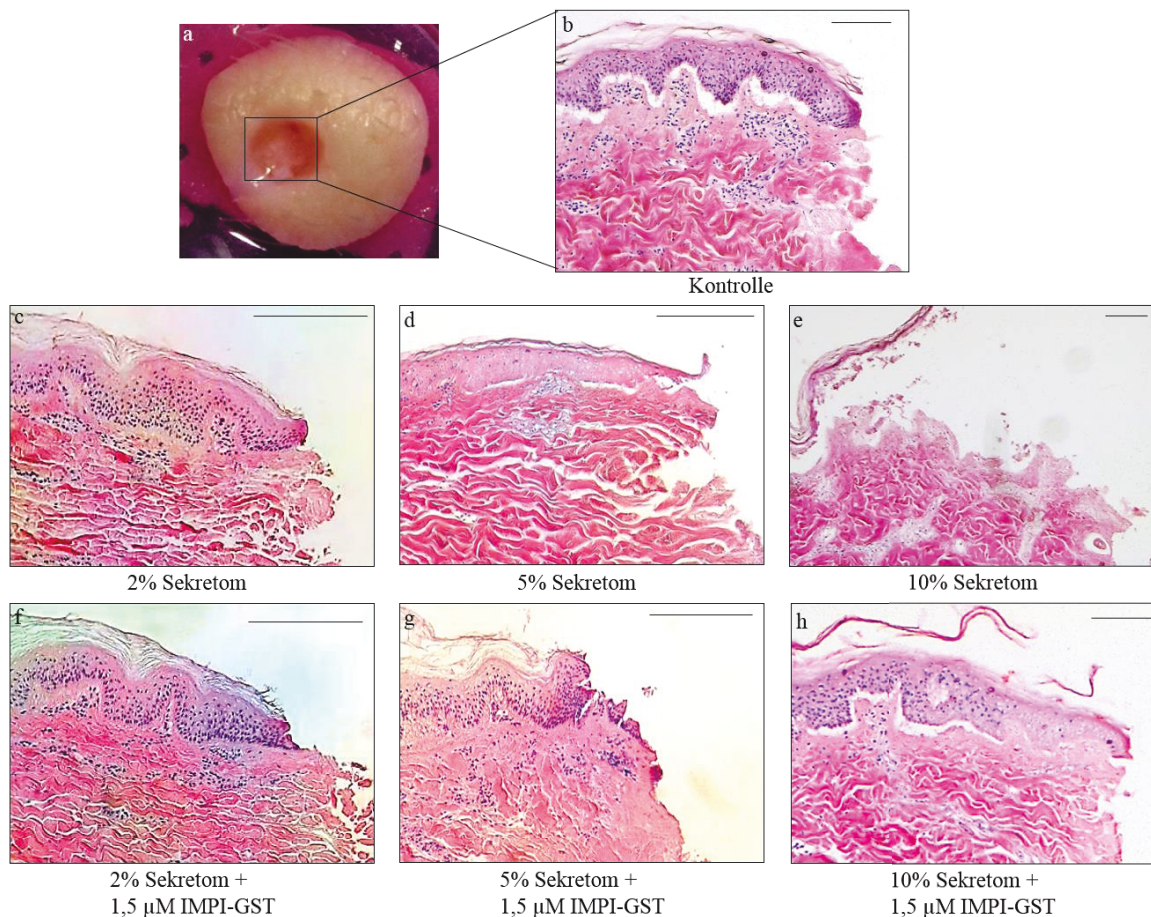


Abb. 46: *Ex vivo* Schweinehaut-Wundmodell nach Sekretom und IMPI-GST-Behandlung. Dargestellt ist das Schweinehaut-Wundmodell in Draufsicht in a und die histologischen Hautschnitte unterschiedlich behandelte Modelle (b-h). Die Größenbalken entsprechen 100 μ m. Die Aufnahme b zeigt die mit PBS behandelte Kontrolle. Die Bilder c-e zeigen Hautschnitte von täglich mit Sekretom (Konzentration in %) behandelten Modellen. Im Vergleich dazu sind die zur jeweiligen Sekretom-Konzentration (in %) mit 1,5 μ M IMPI-GST behandelten Modelle in f-h abgebildet. Die Aufnahmen repräsentieren Ergebnisse von $n \geq 3$ Versuchen mit jeweils ≥ 6 Schweinen.

In der Kontrollaufnahme Abb. 46b sind die unterschiedlichen Hautschichten klar zu erkennen. Von einem größeren Spalt am Wundrand abgesehen, erschien die rotgefärbte Dermis kompakt und enthielt einige blaugefärbte Zellkerne. Die Epidermis wirkte ebenfalls dicht gepackt und beinhaltete wesentlich mehr Zellkerne. Das *Stratum corneum* lag über dem gesamten Hautabschnitt in mehreren Schichten dicht an der Epidermis. Am Wundrand war es in die Wunde eingewachsen und bildete dort mit den in die Wunde migrierenden Keratinozyten die Wundzunge. Diese war stärker gefärbt und enthielt eine vermehrte Anzahl an Keratinozyten. In dieser histologischen Analyse galt die Ausbildung der Wundzunge als Maß für den Wundfortschritt [144].

Mit steigender Sekretom-Konzentration wurden eine reduzierte Wundzunge und eine auftretende Nekrose anhand einer porösen Dermis und geringeren Zahl an Zellkernen beobachtet. Bei Zugabe von 2% Sekretom (Abb. 46c) wurde kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festgestellt. In Anwesenheit von 5% Sekretom (Abb. 46d) war keine Wundzunge zu erkennen und das *Stratum corneum* löste sich am Wundrand von der Epidermis ab. Die Epidermis selbst zeigte eine löchrige Struktur mit sehr wenigen Zellkernen und im Übergang zur Dermis war ein Spalt zu erkennen. Die Dermis wirkte ebenfalls porös mit einer geringeren Anzahl an Zellkernen. Unter dem Einfluss von 10% Sekretom (Abb. 46e) löste sich das *Stratum corneum* nahezu komplett ab. Die Epidermis war nicht mehr als solche zu erkennen und es wurden keine Zellkerne detektiert. Damit konnten die einzelnen Gewebebestandteile nicht mehr identifiziert werden. Zusammengefasst verhinderte das Sekretom einen Wundfortschritt und löste eine Nekrose aus. Anschließend wurde die Wirkung des Sekretoms bei gleichzeitiger Inkubation mit 1,5 μM IMPI-GST in dem *ex vivo* Wundmodell beurteilt. Unter Zugabe von 2% Sekretom und IMPI-GST wurden keine Veränderungen beobachtet. Unter dem Einfluss von 5% Sekretom und IMPI-GST bildete sich eine Wundzunge aus. IMPI-GST verhinderte damit das Sekretom-verursachte Ablösen des *Stratum corneums* und der Epidermis. Außerdem entsprach die Anzahl der Zellkerne dem mit Puffer behandelten Kontroll-Wundmodell. Anhand der Abb. 46e und h fiel unter dem Einfluss von 10% Sekretom der positive Effekt von IMPI-GST am deutlichsten auf. In Abwesenheit von IMPI-GST löste sich das Hautgewebe nahezu komplett auf, aber in Kombination mit 1,5 μM IMPI-GST war eine intakte Epidermis mit Zellkernen zu erkennen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle lag zwar weiterhin eine verringerte Anzahl an Zellen vor und das *Stratum corneum* löste sich teilweise ab, trotzdem bildete sich eine Wundzunge aus. Zusammenfassend konnte in dem *ex vivo* Schweinehaut-Wundmodell gezeigt werden, dass das Sekretom die Wundheilung massiv störte und eine Nekrose zur Folge hatte. Durch die Zugabe

von IMPI-GST wurde der Zellabbau sowie die Auflösung des Hautgewebes verhindert und ein Heilungsfortschritt über die Ausbildung einer Wundzunge erkennbar. Dennoch zeigte sich die Wirkung von IMPI-GST bei der Behandlung mit 10% Sekretom limitiert, womit sich diese Ergebnisse mit den zytologischen Resultaten deckten (4.1.2; 4.1.3; 4.1.4).

4.2. Entwicklung der Formulierung

In dieser Arbeit sollte, neben der präklinischen, pharmakologischen Überprüfung des Wirkstoffes IMPI, eine geeignete Formulierung für die topische Applikation bei chronischen Wundinfektionen entwickelt werden. Die Anforderung, die an die thermosensitive Formulierung gestellt wurde, war es flüssig bei Raumtemperatur und fest bei Hautoberflächentemperatur vorzuliegen. Zunächst stand die Identifikation der einzelnen Komponenten in ihren einzusetzenden Konzentrationen im Vordergrund. Dazu wurden verschiedene Gelbildner, Feuchtigkeits- und Konservierungsmittel rheologisch untersucht.

4.2.1 Rheologie

Das für seine thermosensitiven Eigenschaften bekannte Poloxamer 407 (P407) [128] wurde als Hauptkomponente für die Entwicklung des thermosensitiven Hydrogels verwendet. Bei 40° C gelierte das Gel und wies in mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 47) eine hexagonale Struktur auf.

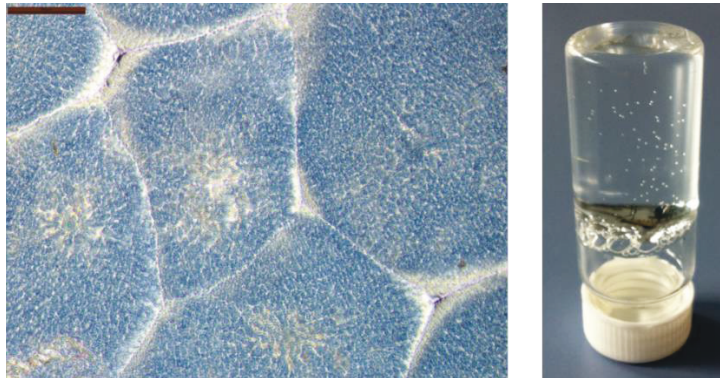


Abb. 47: Poloxamer Hydrogel. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines Hydrogels mit 16% P407 bei 40° C. Das linke Bild ist eine mikroskopische Aufnahme des Gels, der Größenbalken entspricht 200 μm . Die rechte Aufnahme zeigt das gelierte Gel im Glasvial in Vorderansicht.

Zur Definition einer geeigneten P407-Konzentration wurden die viskoelastischen Eigenschaften verschiedener P407-Lösungen untersucht. Zunächst wurde der LVE-Bereich in Amplitudensweeps bestimmt. Dafür wurden Messungen bei steigender Schubspannung (τ) von 0,5 –

1000 Pa und konstanter Winkelgeschwindigkeit (ω) von 0,5 Hz sowie einer variierenden kontrollierten Temperatur zwischen 20° C und 38° C durchgeführt. Das Ergebnis war ein rascher Anstieg des Elastischen Moduls in Abhängigkeit der Schubspannung bis zum Erreichen eines Plateaus. Bei hohen Schubspannungen sank das Plateau aufgrund einer Deformation des Gels wieder ab (siehe Anhang). Die Ergebnisse der Amplituden-Sweeps belegten eine Strukturstabilität der getesteten Gele bis mindestens 60 Pa bei allen untersuchten Temperaturen. Dieser Wert wurde somit als viskoelastisches Deformationsgrenzlevel definiert und die nachfolgenden rheologisch-oszillatorischen Messungen bei einer Schubspannung von 50 Pa durchgeführt. In einem anschließenden Frequenz-Sweep zeigte sich im Bereich von 0,1–100 Hz kein Abfall des Elastischen Moduls G' , aber eine Abhängigkeit von G' von der Frequenz (siehe Anhang). Die Hydrogele wurden anschließend in Temperatur-Sweeps bei einer möglichst niedrigen, trotzdem realisierbaren Frequenz von 1,0 Hz, rheologisch charakterisiert.

Rheologische Charakteristik des Gelbildners Poloxamer 407

Für die Entwicklung des themosensitiven Hydrogels wurde P407 als Hauptgelbildner eingesetzt. Zur Identifikation der geeigneten Konzentration für eine bei Raumtemperatur flüssig und bei Hautoberflächentemperatur geliert vorliegenden Formulierung wurden verschiedene Poloxamer-Lösungen (14-25% P407 in Aqua purificata) nach der „Kalt-Methode“ von Schmolka [129] hergestellt und rheologisch charakterisiert. Alle entstandenen Gele lagen bei einer Lagerungstemperatur von 4° C im flüssigem und bei 40° C im festen Zustand vor, wie in Abb. 47 gezeigt.

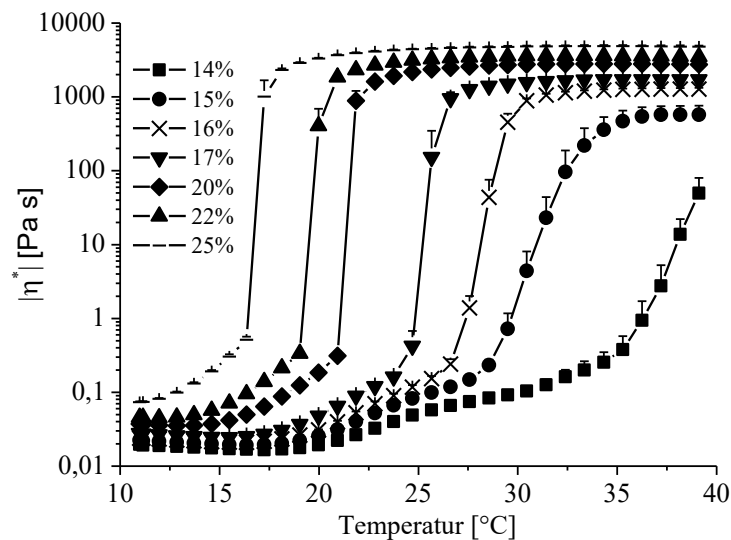


Abb. 48: Betrag der dynamischen Viskosität von P407-Lösungen in Abhängigkeit der Temperatur. In oszillatorischen Temperatur-Sweep-Messungen im linear-viskoelastischen Bereich bei $\tau=50$ Pa und $\omega=1,0$ Hz wurde der Betrag der dynamische Viskosität unterschiedlicher P407-Konzentrationen angegeben in % in Aqua purificata bestimmt (MW \pm SD, $n \geq 2$).

Durch eine steigende Temperatur nahm die dynamische Viskosität der verschiedenen P407-Lösungen zwischen 14% und 25% stetig zu (Abb. 48). Je höher dabei die P407-Konzentration war, desto steiler stieg der Betrag der komplexen Viskosität, die eine Ausbildung des Gels wieder spiegelt. Die nach links verschobenen Kurven belegen eine mit steigender P407-Konzentration sinkende T_{Gel} .

Anschließend wurde für die ausführliche Beschreibung des rheologischen Verhaltens das Elastische Modul G' bei $32,5^\circ\text{C}$ als Maß für die Gelstärke bei Hautoberflächentemperatur und der Schnittpunkt von G' mit dem viskosen Modul G'' als T_{Gel} in Temperatur-Sweep-Messungen bestimmt (Abb. 49). Mit steigender P407-Konzentration sank T_{Gel} und das Elastische Modul stieg linear an. Basierend auf den Anforderungen einer idealen Applikation mit T_{Gel} zwischen 28°C und 32°C wurde eine P407-Konzentration von 16% für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

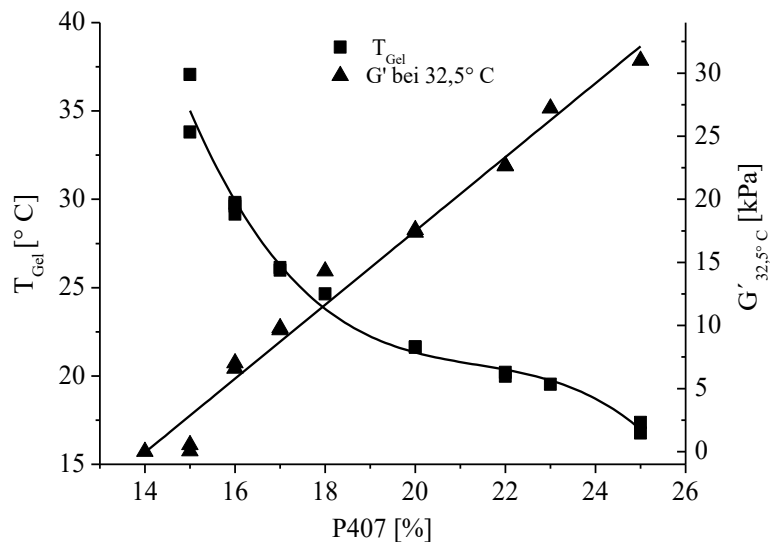


Abb. 49: Gelstärke und Gel-Sol-Übergangstemperatur von P407-Gelen. Dargestellt ist das Elastische Modul G' bei $32,5^\circ\text{C}$ und die Gelierungstemperatur (T_{Gel}) in Abhängigkeit der P407-Konzentration in Aqua purificata, angegeben in %. T_{Gel} wurde über den Schnittpunkt von G' mit G'' bestimmt. Die Module G' und G'' wurden in oszillatorischen Temperatur-Sweeps bei $\tau=50\text{ Pa}$, $\omega=1,0\text{ Hz}$ und $T=10^\circ\text{-}40^\circ\text{ C}$ gemessen.

Für den Vergleich der Ergebnisse mit Daten aus der Literatur musste darauf geachtet werden, dass T_{Gel} in unterschiedliche Methoden bestimmt werden kann. In Abb. 49 wurde T_{Gel} anhand des Schnittpunktes von G' mit G'' aus den Temperatur-Sweep-Messungen im LVE-Bereich bestimmt. In einem weiteren Versuch wurde T_{Gel} anhand der Tube-Inversions-Methode bestimmt und mit den Ergebnissen aus den rheologisch-oszillatorischen Messungen verglichen (siehe Anhang). Dabei wurden signifikant, um durchschnittlich 4°C höhere T_{Gel} -Werte für das gleiche Gel ermittelt. Das zeigt, dass die unterschiedlichen Methoden nicht miteinander vergleichbar sind. Weil davon ausgegangen wird, dass die rheologisch-oszillatorische Methode die

wissenschaftlich korrekte Messmethode ist, hatte das Ergebnis der Tube-Inversions-Methode hier keine Auswirkung auf die Wahl der P407-Konzentration von 16%.

Einfluss verschiedener Additive auf die Rheologie des Hydrogels

Nach Festlegung der Konzentration des Hauptgelbildners P407 wurden weitere Zusätze zur Erhöhung der Gelstärke bei Hauttemperatur, zur Verhinderung der Austrocknung des Gels oder zur Konservierung eingesetzt und ihr Einfluss auf die Rheologie des 16%igen P407-Gels wurde untersucht. Zunächst wurden die Auswirkungen von 0,1-1,0% Hyaluronsäure (HA) in dem Hydrogel zur Optimierung der Gelstärke und gleichzeitigen Feuchtigkeits-spendenden Eigenschaften bestimmt (Abb. 50). Dabei stieg das Elastische Modul mit steigender HA-Konzentration an. Aufgrund eines mit der HA-Konzentration logarithmisch ansteigende G' bei 11° C fiel die Erhöhung der Gelstärke insbesondere bei niedrigen Temperaturen auf. Bei Betrachtung des Hydrogels mit 16% P407 und 1% HA wurde dieser Anstieg in G' besonders deutlich, weil bei diesem Hydrogel unabhängig von der Temperatur das elastische Verhalten über dem viskosen Verhalten dominierte. Der steile Anstieg in G' ähnelte sich bei allen Gelen und war nicht verschoben, was eine ähnliche T_{Gel} bedeutet.

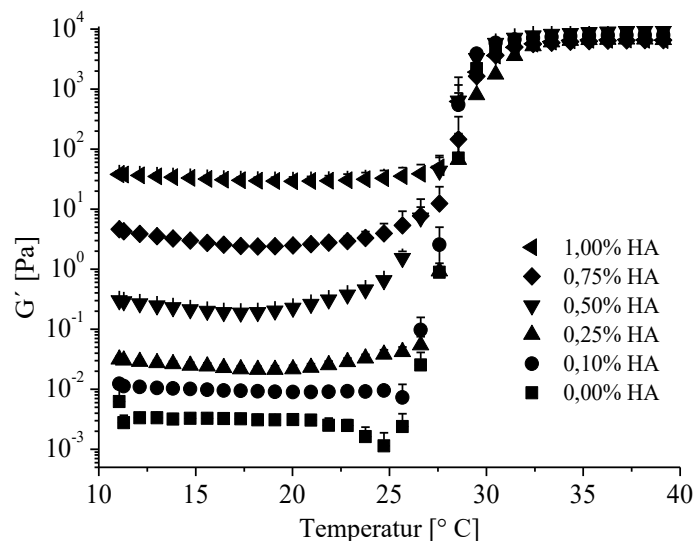


Abb. 50: Einfluss von Hyaluronsäure (HA) auf die Rheologie des Hydrogels. Dargestellt ist das Elastische Modul G' in Abhängigkeit der Temperatur von 16%igen P407 Hydrogelen, gemischt mit unterschiedlichen HA-Konzentrationen in Aqua purificata, angegeben in %. Die Daten wurden in rheologisch-oszillatorischen Temperatur-Sweeps mit $\tau=50$ Pa; $\omega=1,0$ Hz und $T=10^{\circ}-40^{\circ}$ C ($MW \pm SD$, $n \geq 2$) aufgenommen.

Ein weiterer Gelbildner ist das Poloxamer 188 (P188). Es ist dafür bekannt, die rheologischen Eigenschaften von P407-Hydrogelen zu optimieren [145]. Die 16%ige P407-Lösung wurde mit 1-20% P188 versetzt und die entstandenen Hydrogele rheologisch charakterisiert (Abb. 51).

Die Parameter T_{Gel} und G' wiesen eine parabolische und eine invers-parabolische Beziehung in Abhängigkeit der eingesetzten P188-Konzentration auf. Dabei konnte T_{Gel} bei 5% P188 nicht ermittelt werden, weil der Messbereich mit 10° - 40° C begrenzt war.

Die Ergebnisse zeigten, dass bis zu einer Konzentration von etwa 6% T_{Gel} anstieg und G' bis etwa 10% absank. Zwischen 16% und 17% P188 lagen die Elastischen Module G' das erste Mal über und T_{Gel} unter den Ausgangswerten ohne den Zusatz P188. Daher wurde als optimale Konzentration in die zu entwickelnde Formulierung 15% P188 eingesetzt. Dieses Gel hatte eine etwas niedrigere Gelstärke und eine erhöhte T_{Gel} , die aber dennoch unterhalb der Hauttemperatur von 32° C lag.

Als Feuchthaltemittel für das 16% P407-Hydrogel wurden bis zu 10% PEG 300/400 (1:1) und bis zu 10% Glycerin getestet. Die Zugabe dieser Hilfsstoffe zeigte bis zu einer Konzentration von 5% nur einen leichten, aber keinen signifikanten Einfluss auf die rheologische Charakteristik des 16% P407-Hydrogels (siehe Anhang). Glycerin wurde daher und aufgrund einer möglichen Doppelfunktion als Lösungsmittel für den Wirkstoff als Feuchtigkeitskomponente in einer Konzentration von 3% in die Formulierung ausgewählt. Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse aus den rheologischen Studien wurde eine Rezeptur aus 16% P407, 15% P188, 3% Glycerin in Aqua purificata als geeignete Formulierung zur Applikation des Wirkstoffs IMPI bei infizierten Wunden ausgewählt. Bei diesem Hydrogel wurde $T_{\text{Gel}}=31,6^{\circ} \pm 0,12^{\circ}$ C und $G'_{32,5^{\circ}\text{C}}=385 \pm 88$ Pa gemessen.

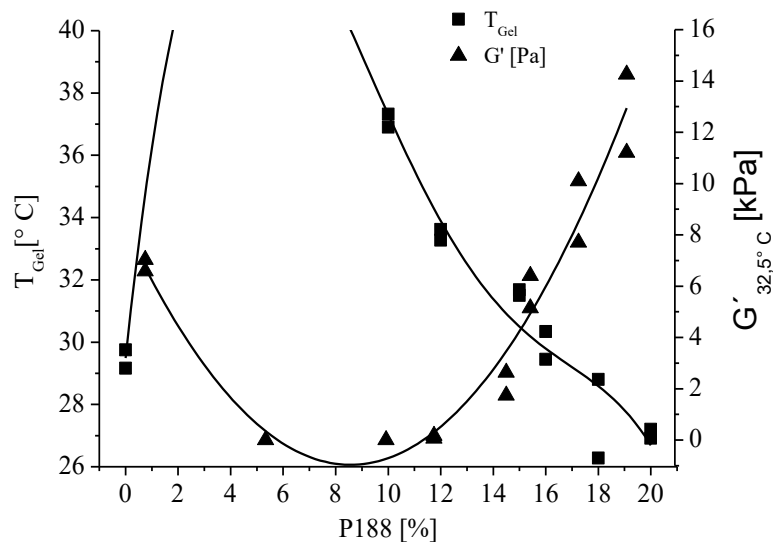


Abb. 51: Einfluss der P188-Konzentration auf die Rheologie des Hydrogels. Dargestellt ist das Elastische Modul G' bei $32,5^{\circ}$ C und die Gelierungstemperatur (T_{Gel}) in Abhängigkeit der P188-Konzentration, angegeben in %, in 16% P407 und Aqua purificata. T_{Gel} wurde über den Schnittpunkt von G' mit G'' bestimmt. Gemessen wurden die Module in oszillatorischen Temperatur-Sweeps bei $\tau=50$ Pa, $\omega=1,0$ Hz und $T=10^{\circ}$ - 40° C.

4.2.2 Überprüfung der Konservierungsmittel

Eine geeignete Konservierung ist bei dermalen Formulierungen, insbesondere bei Hydrogelen wegen ihres hohen Wassergehaltes, unumgänglich. Um den Einfluss möglicher Konservierungsmittel auf die viskoelastischen Eigenschaften des Hydrogels zu beurteilen, wurden oszillatorische Temperatur-Sweep-Messungen durchgeführt. Getestet wurden 20% Propylenglykol; 0,2% Kaliumsorbat in Kombination mit 0,1% Zitronensäure sowie eine Kombination aus 0,5% Phenoxyethanol mit 0,2% Parabenen (0,15% methyl-4-hydroxybenzoat mit 0,05% propyl-4-hydroxybenzoat) in dem Hydrogel aus 16% P407, 15% P188 und 3% Glycerin in Aqua purificata.

Propylenglykol führte in dem P407-Gel zu einer erniedrigten T_{Gel} , aber im P407-P188-Gel zu einer erhöhten T_{Gel} ($33,5^\circ \pm 0,71^\circ \text{ C}$, MW \pm SD, n=3) und einem reduzierten Elastischen Modul G' bei Hauttemperatur ($414 \pm 19 \text{ Pa}$; MW \pm SD n=3). Diese Konservierung wurde nicht weiter betrachtet, da T_{Gel} über der Hauttemperatur lag. Die Phenoxyethanol-Parabene-Kombination reduzierte T_{Gel} ($27,9^\circ \pm 0,5^\circ \text{ C}$; MW \pm SD; n=3) und führte zu einem signifikant höheren G' -Werten bei Hauttemperatur ($17.950 \pm 773 \text{ Pa}$; MW \pm SD; n=3). Die Konservierung mit Kaliumsorbat und Zitronensäure hatte den geringsten Einfluss auf T_{Gel} ($30,2^\circ \pm 1,1^\circ \text{ C}$; MW \pm SD; n=3) und $G'_{32,5^\circ \text{ C}}$ ($9488 \pm 1904 \text{ Pa}$; MW \pm SD; n=3). Allerdings führte diese Kombination zu einer signifikanten pH-Wert-Erniedrigung auf pH 5,4 im Vergleich zu pH 6,8-8,0 der anderen Gele. Mit den Konservierungsmittelkombinationen aus Phenoxyethanol mit Parabene und Kaliumsorbat mit Zitronensäure wurden Keimbelastungstests (KBT) nach Ph.Eur. für topische Anwendungen geprüft. Darin wurden antimikrobielle Aktivitäten hinsichtlich der Bakterien *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis* getestet. Phenoxyethanol mit Parabenen eliminierten 99,7% bzw. 99,8% aller bakteriellen Mikroorganismen und 98,3% bzw. 94,9% aller pilzartigen Mikroorganismen nach 7 Tagen (siehe Anhang). Damit hielt diese Konservierung nicht die geforderten Grenzwerte ein. Der KBT für die Kaliumsorbat-Zitronensäure-Kombination war hingegen erfolgreich. Das hergestellte Gel beseitigte mehr als 99,9% aller bakteriellen Mikroorganismen und 99% aller pilzartigen Mikroorganismen nach 7 Tagen. Auch nach 28 Tagen stieg die Mikroorganismenzahl nicht wieder an (siehe Anhang). Aufgrund der Ergebnisse im KBT und des niedrigen Einflusses auf die rheologischen Eigenschaften wurde für die Konservierung des Hydrogels Kaliumsorbat und Zitronensäure gewählt. Damit enthielt die finale Formulierung (Hydrogel) eine Rezeptur aus 16% P407; 15% P188; 3% Glycerin; 0,2% Kaliumsorbat; 0,1% Zitronensäure in Aqua purificata.

4.2.3 Proteinen in der Formulierung

Das oben beschriebene thermosensitive Hydrogel sollte als Formulierung für den potenziellen Wirkstoff IMPI entwickelt werden. In dieser Arbeit wurde das Fusionsprotein IMPI-GST (13,5 μM) durch einfaches Mischen in das 4° C kalte Hydrogel eingearbeitet. Diese eingesetzte IMPI-GST-Konzentration entspricht dem 1,5-fachen des für 100% Sekretom berechneten IC_{80} -Wertes (siehe Anhang). Bei diesem Wert wurde in allen vorherigen proteolytischen (4.1.1) und zytotoxischen Tests (4.1.2) die maximale Wirkung von IMPI-GST erreicht.

Nach dieser Zugabe von IMPI-GST wurde eine Trübung des Gels (Abb. 52) festgestellt. Zur Identifikation der für diesen Effekt verantwortlichen Gelkomponente, wurden die einzelnen Bestandteile nacheinander zur wässrigen IMPI-GST Lösung gegeben. Dabei fiel auf, dass durch die Zugabe des Hauptgelbildners P407 dieser Trübungseffekt auftrat. Dieser Effekt war unabhängig von dem verwendeten Konservierungsmittel und wurde daher auch bei Werten zwischen pH 5 und pH 8 beobachtet. Zur Untersuchung des Einflusses anderer Proteine, wurden Aprotinin, Lysozym und Rinderserumalbumin (BSA) in gleicher molarer Konzentration in dem Hydrogel gelöst. Die kleineren Proteine, wie Aprotinin (6,5 kDa; pI: 9,2) und Lysozym (14,4 kDa; pI:11) verursachten keine Trübung des Gels. Die größeren Proteine, wie BSA (67 kDa; pI:4,7) oder IMPI-GST (35 kDa; pI: 5,3) riefen eine stärkere Trübung hervor.

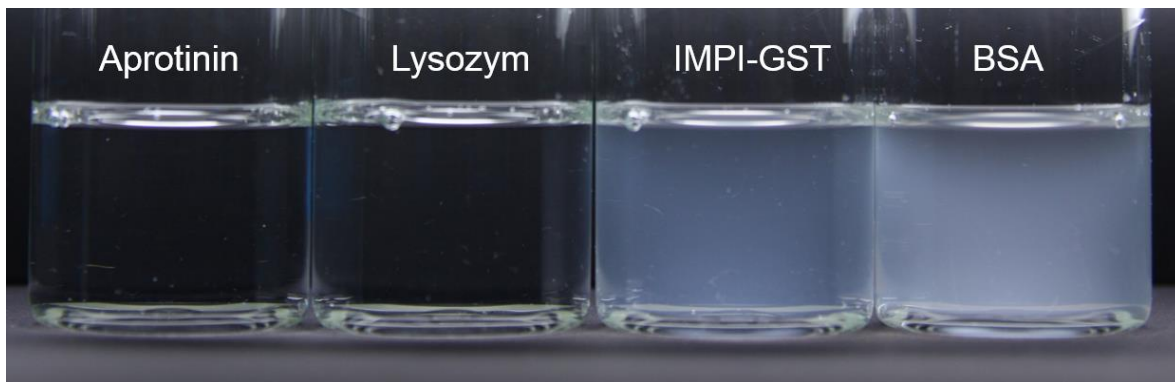


Abb. 52: Verschiedene Proteine in Poloxamer Hydrogelen. 13,5 μM Aprotinin (6,5 kD); 13,5 μM Lysozym (14,4 kD); 13,5 μM IMPI-GST (35 kD) oder 13,5 μM BSA (67 kD) wurden im Hydrogel (16% P407; 15% P188, 3% Glycerin, 0,2% Kaliumsorbat, 0,1% Zitronensäure in Aqua purificata) gelöst. Dargestellt sind repräsentative Bilder von n=3 unabhängig hergestellten Hydrogelen.

Letztlich konnte ein Gel mit 13,5 μM IMPI ohne GST-Tag hergestellt werden, das keine Trübung des Gels verursachte (Abb. 53) und eine OD_{600} von 0,005, verglichen mit Wasser, hatte.

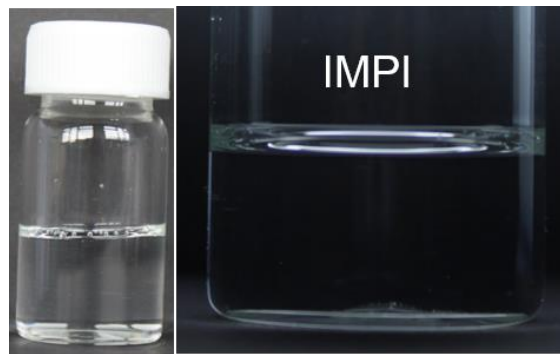


Abb. 53: IMPI in Poloxamer Hydrogel. 13,5 μM IMPI gelöst im Hydrogel (16% P407; 15% P188, 3% Glycerin, 0,2% Kaliumsorbat, 0,1% Zitronensäure in Aqua purificata).

Neben diesem sichtbaren Einfluss der Proteine, wurden auch die rheologischen Eigenschaften der Hydrogele überprüft. Dabei zeigte keines der Proteine einen signifikanten Einfluss auf die dynamische Viskosität der Gele (siehe Anhang). Auch das Hydrogel mit dem potenziellen Wirkstoff-Protein IMPI-GST zeigte nur einen geringfügig abweichenden Verlauf des Elastischen Moduls G' über der Temperatur im Vergleich zum Placebo-Gel (Abb. 54).

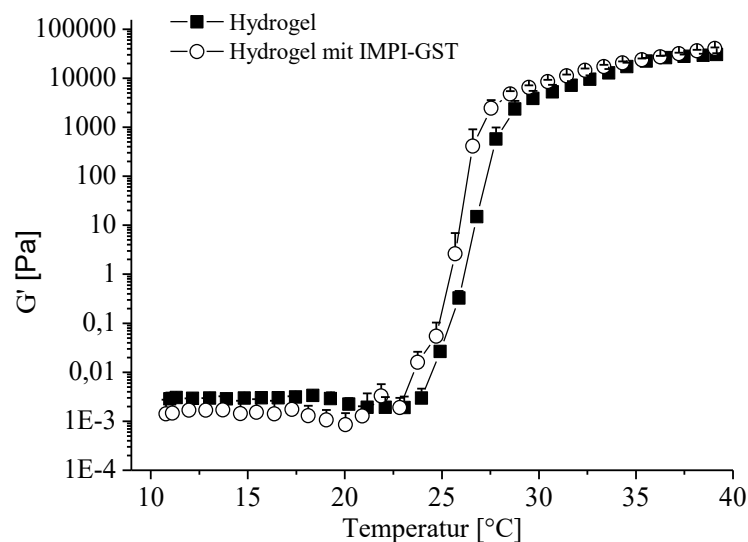


Abb. 54: Einfluss von IMPI-GST auf die Rheologie des Hydrogels. Dargestellt ist die dynamische Viskosität in Abhängigkeit der Temperatur eines Hydrogels aus 16% P407; 15% P188, 3% Glycerin, 0,2% Kaliumsorbat, 0,1% Zitronensäure in Aqua purificata mit oder ohne 13,5 μM IMPI-GST (MW \pm SD; n=3 Gele, je 2 Messungen).

4.2.4 Aktivität von IMPI-GST

In dem oberen Abschnitt wurde dargestellt, dass das Wirkstoffmolekül nicht oder nur in einem geringen Maße die Rheologie des Gels beeinflusst. Anschließend wurde geprüft, ob die entwickelte Formulierung einen Einfluss auf die Aktivität des Wirkstoffes hat. Dafür wurde die inhibitorische Aktivität von IMPI-GST in Puffer (PBS) mit IMPI-GST im Hydrogel gegen die

Protease Thermolysin im bereits dargestellten Fluoreszenz-Quenching-Test (4.1.1) verglichen (Abb. 55).

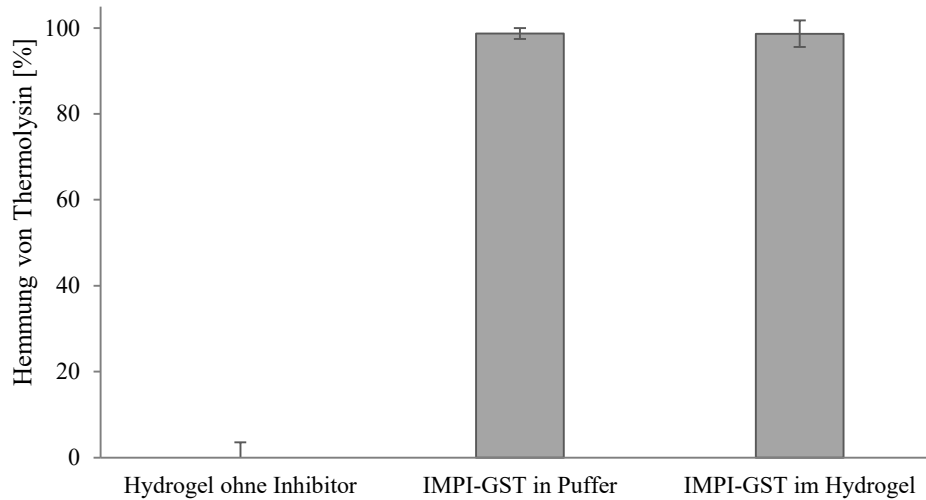


Abb. 55: Vergleich der Aktivität von IMPI-GST in Puffer und Hydrogel. Angegeben ist die prozentuale Hemmung von 9 nM Thermolysin im Hydrogel (16% P407; 15% P188, 3% Glycerin, 0,2% Kaliumsorbat, 0,1% Zitronensäure in Aqua purificata) ohne Inhibitor, IMPI-GST (13,5 μ M) in Puffer (PBS) oder IMPI-GST (13,5 μ M) im Hydrogel, gemessen in einem Fluoreszenz-Quenching-Tests mit FITC-Casein (1 μ g/ml) (MW \pm SD, n=3).

Das Ergebnis war eine totale Hemmung der proteolytischen Aktivität des Thermolysins, unabhängig von der Formulierung. Das Hydrogel selbst beeinflusste in der verwendeten Konzentration nicht die Protease-Aktivität von Thermolysin, sodass IMPI-GST allein für die konstante Hemmung verantwortlich war. In diesem Experiment zeigte das Hydrogel keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität von IMPI-GST. In diesem Aktivitätstest wurde auch nach 4-wöchiger Lagerung von IMPI-GST bei 4° oder 25° C in der Formulierung dieses Resultat bestätigt. Zusammenfassend wurden keine Wechselwirkungen zwischen Formulierung und Wirkstoff bezüglich der rheologischen Eigenschaften oder der inhibitorischen Aktivität detektiert. Allerdings wurde eine Trübung des Gels durch die Wirkstoffzugabe festgestellt, das auf eine Präzipitation des Wirkstoff-Proteins hindeutet.

4.2.5 Freisetzung von IMPI-GST

Für die Anwendung des Wirkstoffes muss seine Freisetzung aus der entwickelten Formulierung gewährleistet sein. Dafür wurden Freisetzungsstudien in Franz-Diffusions-Zellen von dem Hydrogel (16% P407; 15% P188, 3% Glycerin, 0,2% Kaliumsorbat, 0,1% Zitronensäure in Aqua purificata) mit IMPI-GST durchgeführt. Abb. 56 zeigt die freigesetzte kumulative Menge IMPI-GST in % aus dem Hydrogel über der Zeit. Es wurde eine konstante Freisetzung von IMPI-GST aus der getesteten Formulierung gezeigt. Nach 10 h wurden $78,2 \pm 10,2\%$ (n=6)

IMPI-GST in dem Akzeptor-Medium wieder gefunden, womit eine konstante Wirkstofffreisetzung aus dem Gel bewiesen wurde.

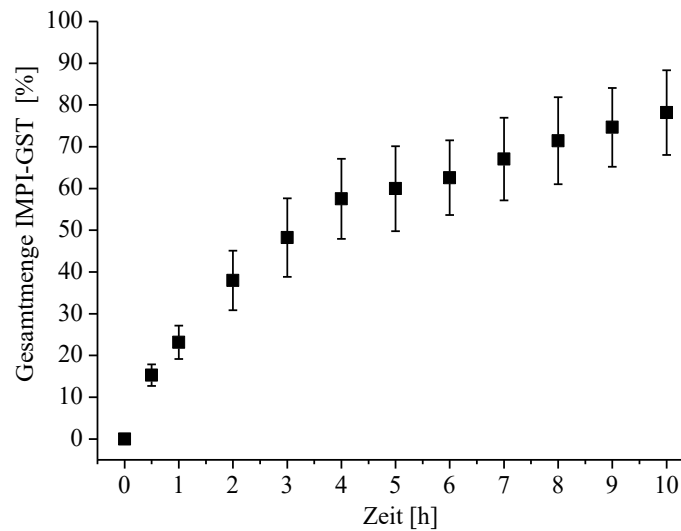


Abb. 56: Freisetzung von IMPI-GST aus dem Hydrogel. Dargestellt ist der freigesetzte kumulative Anteil der Gesamtmenge von IMPI-GST (13,5 μ M), angegeben in % aus dem Hydrogel (16% P407; 15% P188, 3% Glycerin, 0,2% Kaliumsorbat, 0,1% Zitronensäure in Aqua purificata) über der Zeit mittels Franz-Zell-Diffusions-Methode mit einer Zellulose-Membran (MW \pm SD, n=6). Die Konzentration von IMPI-GST wurde mittels quantitative HPLC-Methode bestimmt.

5 Diskussion

Durch den limitierten Erfolg von Antibiotika bei der Behandlung von infizierten Wunden, wächst die Nachfrage an therapeutischen Alternativen stetig an. Dieses Interesse ist vor allem auf das hohe und laufend zunehmende Auftreten multiresistenter Keime und der steigenden Zahl an betroffenen Patienten zurückzuführen [7]. Einer der häufigsten und aggressivsten Auslöser dieser Wundinfektionen ist das Bakterium *P. aeruginosa*, das zu 70-90% antibiotikaresistent in chronischen Wunden vorkommt [5,9]. Einer der Hauptvirulenzfaktoren ist die M4-MP PE. Sie ist für die nekrotische Wirkung, Invasion und Verbreitung des Bakterium verantwortlich [55]. In diesem Zusammenhang werden PE-Inhibitoren als neue, vielversprechende Wirkstoffe zur Behandlung von *P. aeruginosa* Infektionen erforscht [7]. In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der präklinischen Untersuchungen die therapeutische Wirkung des insektenbasierten Proteins IMPI-GST gegen PE und das Sekretom von *P. aeruginosa* *in vitro* und *ex vivo* untersucht. Außerdem wurde eine geeignete Formulierung in Form eines thermosensitiven Hydrogels zur dermalen Anwendung von IMPI bei Wundinfektionen designt.

5.1. Präklinische Untersuchungen

Die hemmende Wirkung von IMPI-GST auf PE und das Sekretom von *P. aeruginosa* wurde in proteolytischen Aktivitätstests bestimmt. Die Auswirkungen einer Sekretom- und IMPI-GST-Behandlung wurden *in vitro* an einer immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie und *ex vivo* in einem Schweinehaut-Wundmodell überprüft.

5.1.1 Wirkung von IMPI-GST gegen M4-MP

In dieser Arbeit wurde das rekombinant in *E. coli* produzierte IMPI-GST verwendet. Im Vergleich zu IMPI ohne Tag, zeigte IMPI-GST in proteolytischen Aktivitätstests keine signifikanten Unterschiede in der Hemmung der M4-MP Thermolysin (Abb. 24). Daher gelten die folgenden Erkenntnisse dieser Arbeit bezüglich des Wirkpotenzials von IMPI-GST vermutlich ebenso für IMPI. Vor der Verwendung wurde IMPI-GST jeweils in Qualitäts- und Stabilitätskontrollen mittels FRET-Tests zur Bestimmung der proteolytischen Aktivitätstests gegen FITC-Casein überprüft. Dabei zeigte sich eine der drei Chargen mit einem IC_{50} von 24,2 nM im Vergleich zu 74,7 nM und 74,8 nM effizienter. Diese Abweichung wurde hier nicht näher betrachtet und als vernachlässigbar eingestuft, da eine erfolgreiche Inhibition in der gleichen Log-Stufe und einem

IC₅₀-Wert unter 100 nM erreicht wurde. Vermutlich lässt sich die Differenz auf unterschiedliche Produktions- und Aufreinigungsstrategien zurückführen, wie in 3.2.1 beschrieben.

Zur Einordnung der Wirksamkeit von IMPI-GST im Vergleich zu anderen PE-Inhibitoren wurde als Referenz-Inhibitor das metallbindende Phosphoryl-Dipeptid PA als Kontrolle genutzt. Ähnliche Dipeptide wurden bereits im Tierversuch bei *P. aeruginosa*-Infektionen der Hornhaut eingesetzt. Sie sind die wohl bekannteste, meist verwendete und am besten untersuchte Gruppe an M4-MP-Inhibitoren [7,101,108]. In proteolytischen Aktivitätstests gegen Thermolysin, Pseudolysin und das Sekretom eines aus der Wunde isolierten *P. aeruginosa*-Stammes, zeigte IMPI-GST im Vergleich zu PA steilere Dosis-Wirkungs-Kurven und geringere IC₅₀-Werte, die insbesondere bei der Hemmung von PE deutlich wurden. Außerdem inhibierte IMPI-GST vollständig das Sekretom des Kulturüberstandes eines klinisch relevanten *P. aeruginosa*-Stammes (Abb. 31). Die Ursachen für dieses engere therapeutische Fenster und die höhere Effizienz liegen in den unterschiedlichen Hemmmechanismen der Inhibitoren begründet. PA bindet im aktiven Zentrum der MP und agiert dort als Analogon des Übergangszustands [98]. IMPI hemmt als Substrat-Analogon nach dem „Standard-Mechanismus“ der I8-Inhibitoren, es bindet eng im aktiven Zentrum und fungiert als „Pseudosubstrat“. Nach der kovalenten Bindung wird es über die Hydrolyse einer Peptidbindung langsam gespalten. Diese Bindungs-Spaltungs-Reaktion nach Formel 1 (Seite 28) ist reversibel, wodurch bei Trennung des Komplexes entweder die gespaltene oder die intakte Inhibitor-Form entsteht. Aus der stärkeren Bindung des Enzym-Inhibitor-Komplexes und den längeren Dissoziationszeiten verursacht IMPI-GST wohl eine stärkere Abnahme der proteolytischen Aktivität der M4-MP (4.1.1) [113].

Im Vergleich zu anderen MP-Inhibitoren wurde IMPI bereits in vorherigen Studien neben einer höheren Effektivität, auch eine höhere Spezifität für bakterielle M4-MP nachgewiesen. IMPI zeigte dabei keine Wirkung auf Trypsin, Papain oder die meisten MMPs [15]. Schon aufgrund dieser Charakteristik ist IMPI dem hier getesteten PA und anderen PE-Inhibitoren, wie Hydroxamat-basierten [103], Terpen-basierten [146] sowie diversen Metallkomplex-bildende-Substanzen, wie EDTA, DTPA [102] oder -Proteinen [101], überlegen. Viele dieser Inhibitoren, wie z.B. PA oder nicht-peptidöse Inhibitoren, zeigten außerdem eine geringe Effektivität [105]. Alle erwähnten Inhibitoren hemmen entweder unspezifisch oder es liegen keine Erkenntnisse über ihre Spezifität vor [96], womit Nebenwirkungen aufgrund einer möglichen Hemmung von körpereigenen MMP [103] oder anderen humanen Proteasen nicht ausgeschlossen werden können. PA hemmt z.B. die Endothelin- (ECE) und Angiotensin-(ACE) konvertie-

renden Enzyme [108] sowie Neprilysin-2 [107], womit Auswirkungen auf z.B. Blutgefäße möglich sind. Eine Wirkung als MMP-Hemmer würde das empfindliche Gleichgewicht von MMP zu TIMP stören. Weil IMPI ebenso effizient wie hochspezifisch ist, wird es als PE-Inhibitor favorisiert.

5.1.2 Wirkung von IMPI-GST gegen *P. aeruginosa*

IMPI-GST ist in der Lage reines PE, den Hauptvirulenzfaktor von *P. aeruginosa* [66], effektiv zu hemmen (4.1.1). Wie wirksam IMPI-GST damit bei *P. aeruginosa* Infektionen ist [7], hängt vor allem von seiner Wirkung in natürlicher Umgebung ab. Dafür wurde IMPI-GST gegen das Sekretom von *P. aeruginosa* in proteolytischen Aktivitätstest getestet, um mögliche Beeinträchtigungen des Sekretoms auf den potentiellen Wirkstoff IMPI-GST oder die Ziel-Protease PE festzustellen. Dabei sollte ebenfalls die einzusetzende Konzentration an IMPI-GST eingegrenzt werden.

Zuerst wurde die von *P. aeruginosa* freigesetzte, im Sekretom enthaltene Konzentration von PE im proteolytischen Aktivitätstest ermittelt. Das Sekretom enthält zwar verschiedene Exoproteine der Sekretionssysteme [147], wie die Proteasen AprA, Serin-Protease IV, Lysin-spezifische Serin-Endoprotease oder Staphylolysin [10], trotzdem konnte hier eine Korrelation über die proteolytische Aktivität von reinem PE durchgeführt werden. Denn es wurde bereits von Leduc et al. gezeigt, dass PE für 95% der proteolytischen Elastase-Aktivität des Sekretoms verantwortlich sei und das Sekretom eines LasB-defizienten Stammes keine Aktivität im Elastin-Congo-Red-Assay aufweist [73]. In weiteren Studien wurde der Serin-Protease relativ zu den anderen Proteasen im Sekretom keine merkliche [148] und AprA eine im Vergleich zu PE um den Faktor 10 geringere Elastase-Aktivität nachgewiesen [10]. Staphylolysin verstärkt nur die Aktivität von PE [61]. In dem hier durchgeführten Experiment wurde ein für PE spezifisches Fluoreszenzmarkiertes Peptid-Substrat verwendet, um die Auswirkungen anderer Proteasen gänzlich zu verhindern. PE hat eine Substratspezifität für die AS Phe an P1' und Ala an Position P1 oder P2' sowie eine Verlängerung des Substrates an der P2 und der P2'-Position [66,143]. Damit wird die Spaltung des hier verwendeten kleinen Peptides (Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH) an Phe-Ende zwischen den AS Ala-Phe von PE präferiert. Die dabei bestimmte proteolytische Aktivität eines aus der Wunde isolierten und in Beef-Extrakt-Medium kultivierten *P. aeruginosa*-Sekretoms entsprach der Aktivität einer PE-Konzentration von 944 ± 68 nM (Abb. 30).

Für das Sekretom eines PAO1-Referenzstammes wurden in den Studien von de Bentzmann et al. niedrigere PE-Konzentrationen von bis zu 500 nM publiziert [73,75-77]. Für Stämme aus

klinischen Isolaten wurden höhere Konzentrationen ($>1 \mu\text{M}$) beschrieben [149]. Die Ursache für die relativ hohe PE-Konzentration in dem hier verwendeten Sekretom liegt wahrscheinlich in der Herkunft des Stammes aus einer Wunde begründet. Zusätzlich kann vermutlich die Kultivierung in Beef-Extrakt die PE-Produktion hochregulieren. Beef-Extrakt enthält vornehmlich größere Peptide und Proteine und weniger freie AS. In anderen Studien [73,75-77,146] wird stattdessen Standard-LB-Medium verwendet, das vornehmlich vorverdaute Proteine in Form von Trypton enthält. Weil PE dem Bakterium in erster Linie zur Akquirierung von Nährstoffen dient, indem es große Proteine vorverdaut [66], könnte demnach das Medium zu einer Hochregulierung der PE-Produktion geführt haben. Die PE-Konzentration in Gewebe bzw. Sputum infizierter Patienten liegen zwischen 300 nM und 3 μM [75,150]. Damit ist das Sekretom aus dieser Arbeit mit höheren PE-Konzentrationen aufgrund des isolierten Stammes und der Kultivierungsbedingungen besser an die reale Wundumgebung angepasst. Insofern wurde IMPI-GST in der vorliegenden Arbeit mit einem klinisch relevanteren Sekretom und einer größeren Wirkung von PE getestet.

Bei der anschließenden Überprüfung der inhibitorischen Wirkung von IMPI-GST und PA bei unterschiedlichen Sekretom-Konzentrationen war IMPI-GST im entscheidenden Bereich der abfallenden Dosis-Wirkungskurve (0,03% - 1,1% Sekretom) wie in den vorherigen Tests signifikant ($p \leq 0,05$) effizienter als PA. Außerdem hemmte IMPI-GST die 17%ige Sekretom-Lösung (entspricht 160 nM PE) komplett, im Gegensatz zu PA, das nur zu einer 80%igen Hemmung führte (Abb. 8). Die für PA ermittelten Konzentrationswerte zur Inhibition des Sekretoms stimmen mit anderen Studien überein [73,76]. Damit gilt IMPI-GST als erster spezifischer Protease-Inhibitor, der die proteolytische Aktivität des Sekretoms komplett inhibierte. Allerdings sollte bedacht werden, dass hier die höchste Sekretom-Konzentration bei 17% lag. Diese Konzentration wurde gewählt, weil es der höchsten getesteten Konzentration in den Zellversuchen entsprach (4.1.2). Weitere Sekretom-Konzentrationen konnten aufgrund der Wirkstoffknappheit von IMPI leider noch nicht getestet werden. Nach einfachen Hochrechnungen wird die für das komplette Sekretom notwendige IMPI-GST-Konzentration auf den Bereich von $10^0 - 10^3 \mu\text{M}$ IMPI-GST eingegrenzt (siehe Anhang). In anderen Studien waren Protease-Inhibitoren in der Lage die Aktivität einer 50%igen Sekretom-Konzentration um bis zu 96% zu reduzieren, allerdings weisen diese Inhibitoren auch eine geringere Spezifität als MMP auf [146]. Deshalb ist nach den dargestellten Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur Literatur weiterhin IMPI der favorisierte PE-Inhibitor.

5.1.3 *P. aeruginosa* Sekretom auf HaCaT-Zellen

Nach den Untersuchungen auf molekularer Ebene, folgten zellbasierte *in vitro* Experimente an HaCaT-Kulturen. Zunächst wurden die Auswirkungen des Sekretoms auf die Viabilität der Keratinozyten bestimmt. Keratinozyten sind als Hauptbestandteil der Epidermis eine der wichtigsten Zellen im Wundheilungsprozess, deren Migration zur Reepithalisierung beiträgt und zum Wundverschluss führt. Die Viabilität dieser Zellen ist damit essentiell für eine erfolgreiche Heilung [37]. Dem Sekretom wurde in den durchgeführten Viabilitätstests ab einer Konzentration von 0,1% eine toxische Wirkung auf HaCaTs nachgewiesen, die ab 10% ein totales Zellsterben auslöste (Abb. 32).

Verschiedene Studien haben auf Atemwegs- [80,102] und Endothelzellen [73,75-77,82] die Zytotoxizität des Sekretoms und insbesondere die des Virulenzfaktors PE nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal Hautzellen auf einen zytotoxischen Einfluss von *P. aeruginosa* untersucht. Im Vergleich zu anderen Studien wurde hier eine stärkere Toxizität beobachtet, trotz gleicher Inkubationszeiten und Sekretom-Konzentrationen. Ein Grund dafür ist die in 5.1.2 beschriebene höhere PE-Konzentration im Sekretom. Zugleich kann eine unterschiedliche PE-Sensitivität der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Generell ist der Vergleich von Zytotoxizitätswerten mit Literaturdaten schwierig, da die Kultivierungs- und Mediums-Konditionen nicht standardisiert sind und diese Faktoren einen großen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse haben. Insbesondere bei der Behandlung mit PE spielt die FKS-Konzentration im Medium eine entscheidende Rolle. Bereits Grinnell et al. [74] bewiesen bei chronischen Wundinfektionen die Hemmung von MPs durch FKS. In dieser Arbeit wurde in proteolytischen Aktivitäts- und Zytotoxizitätstests eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Sekretoms durch FKS bestätigt (Abb. 33). Verursacht wird diese Hemmung vermutlich aufgrund der im FKS enthaltenen Seruminhibitoren [74]. Bei infizierten Wunden können durch eine verstärkte Immunantwort erhöhte Seruminhibitor-Konzentrationen vorkommen. Um reale Bedingungen zu schaffen und eine optimale Versorgung der Zellen sicherzustellen, wurden in dieser Arbeit 5% FKS/Well in den Viabilitätstests eingesetzt. Trotz dieser hohen FKS-Werte wurde durch die Applikation von nur 10% Sekretom ein komplettes Zellsterben beobachtet (Abb. 32). In anderen Toxizitätsstudien werden serumfreie [80,102] oder nur mit 0,2% FKS angereicherte Medien eingesetzt [73,75-77]. Dieser Vergleich belegte zusätzlich die größere toxische Wirkung des hier eingesetzten Sekretoms.

Der Verlust der Zellviabilität ließ sich in mikroskopischen Aufnahmen der Zellen eindeutig auf das Auftreten einer Anoikis zurückführen (Abb. 37 und Abb. 38). Das Abrollen der Zellen von

der Wachstumsoberfläche begann an den zellfreien Rändern des Monolayers. Dieser von Inkubationszeit und Sekretom-Konzentration abhängige Prozess wurde bereits von anderen Autoren als Konsequenz einer Behandlung mit Sekretom bzw. direkt mit PE beschrieben [75-77,80,87]. Diese Studien zeigen, dass PE für das Auftreten eines porösen Zellrasens verantwortlich ist, die ursächlichen Mechanismen sind allerdings vielseitig und noch nicht völlig aufgeklärt (siehe 2.3.2). Unter anderem wurde ein Abbau von Faser-Proteinen, wie Elastin, Fn und Kollagen und die Auflösung der Zelladhäsionskontakte, wie FA, TJ und AJ bewiesen [23,63,72,74-76,78,80,82,84].

Das an zellfreien Bereichen beginnende Abrollen der Zellen von der Wachstumsoberfläche (4.1.3) kann als Beleg für die Annahme von Lee et al. gedeutet werden [80]. Sie stellten die These auf, der Angriff von PE beginne an den Enden oder an einem Spalt der Zellschicht, denn PE zerstöre zuerst Proteine von offenen TJ. Anhand der immunhistologischen Aufnahmen konnte diese Hypothese bekräftigt werden (Abb. 39). Dabei wurde ein Aufrollen und teilweise Überlagern des Zellrasens beobachtet, das nur möglich ist, wenn sich die Zell-Matrix-Verbindungen am Rand des Zellrasens auflösen, aber die Zell-Zell-Verbindungen innerhalb des Zellrasens bestehen bleiben. Eine Erklärung wäre, PE degradiert die Proteine der EZM (Elastin, Kollagen [71,151], Fibrin [59]) und die Ankerproteine zwischen Matrix und Zelloberfläche (Fn und Vn [75,76]) vom Rand des Zellrasens schneller, als im intakten Zellverband. Außerdem phosphoryliert PE über einen bisher unbekanntem Mechanismus EGFR und aktiviert damit die nachgeschaltete Signalkaskade über ERK/MAPK [82,87]. Es ist möglich, dass Oberflächenrezeptoren von PE angegriffen werden, die die MAPK-Kaskade aktivieren. Diese könnten am Rand des Zellrasens leichter und damit schneller angegriffen werden, als in einem intakten Zellverband. Das Ergebnis ist in beiden Fällen eine Instabilität der FA und damit eine Ablösung der Zellen von der Wachstumsoberfläche [74]. Darüber hinaus wird vermutet, dass die PE-induzierte Endoproteolyse des Rezeptor uPAR ebenfalls an der Zerstörung der FA und damit an der Anoikis beteiligt ist (2.3.2) [73].

Die Auswirkungen des Sekretoms auf die Zellen sind in der vorliegenden Arbeit detaillierter anhand von immunhistochemischen Färbungen (Abb. 40) gezeigt. Mit steigender Sekretom-Konzentration reduzierten sich die Intensität und das Vorkommen von F-Aktin, es kam zur Retraktion der Fasern zum Zellkern, außerdem wurden die Strukturen zunehmend unschärfer und poröser (Abb. 40). Teilweise traten morphologisch veränderte Strukturen auf, die an Filopodien oder Lamellipodien erinnerten (Abb. 39; Abb. 40). Ähnliche morphologische Veränderungen und eine Des- oder Reorganisation des Zytoskeletts sind als Konsequenz einer PE-

bzw. Sekretom-Zugabe beschrieben [77,86] und in vielen Aufnahmen von PE-behandelten Zellkulturen zu erkennen [75,76,82]. Als Ursache werden die von PE induzierte Phosphorylierung von EGFR des MAPK-Signalwegs, die Aktivierung von PKC und von Rho-Proteinen genannt [82,86,87]. Die in Abb. 39 beobachteten abnormen Aktin-Strukturen könnten auch das Ergebnis der verminderten Zelladhäsion sein und nicht, wie in der Literatur teilweise beschrieben, über Signalwege induziert sein [77,82,87]. Weder in Abb. 39, noch in Abb. 40 sind viele Filopodien oder Stressfasern klar zu erkennen. In Abb. 39 sind eher abgelöste "Aktin-Reste" zu sehen, die durch die Degradierung der Proteine der EZM oder die Auflösung der Zell-Kontakte bedingt sind. In Abb. 40 fallen die in der Literatur beschriebenen Stressfasern oder Lamellipodien [86] ebenfalls weniger auf, sondern eher eine verringerte Anzahl, Dichte und Schärfe an Aktin. Das mit steigender Sekretom-Konzentration reduzierte F-Aktin könnte dennoch mit den beschriebenen Signalkaskaden der Rho-Proteine, MAPK und PKC zusammenhängen, da sie an dem Auf- und Umbau des Zytoskeletts beteiligt sind und insbesondere die Rho-Proteine verschiedene Prozesse des Aktins koordinieren.

Es wurde bewiesen, dass das Sekretom von *P. aeruginosa* toxisch auf Keratinozyten wirkt und die Zellen in Folge dessen von der Oberfläche abgelöst werden. Damit wurden vorherige Erkenntnisse an anderen Zellkulturen bestätigt. Ferner wurde beobachtet, dass das Sekretom einen Abbau des Aktins und eine Re- oder Desorganisation des Zytoskeletts induziert. Die Folgen von PE auf den Zellstoffwechsel sind in der Literatur vielseitig beschrieben und die Ursachen der beschädigten Zytoskelett-Strukturen zum derzeitigen Wissensstand noch nicht aufgeklärt.

5.1.4 Wirkung von IMPI-GST auf mit Sekretom behandelte Zellen

In der vorliegenden Arbeit stand das therapeutische Potenzial von IMPI zur Behandlung von *P. aeruginosa*-Wundinfektionen im Vordergrund. In ersten Zellviabilitätstests wurde eine mögliche Zytotoxizität des potenziellen Wirkstoffs im größtmöglichen Konzentrationsbereich ausgeschlossen, um eine prinzipielle Anwendung zu erlauben (siehe Anhang). Anschließend wurde bewiesen, dass IMPI-GST ein vom Sekretom verursachtes komplettes Zellsterben verhinderte und eine Erhöhung der Viabilität um mehr als 60% erreichte (Abb. 34). Die zur Verminderung der Toxizität des Sekretoms notwendige IMPI-GST-Konzentration war in der Größenordnung konsistent zu den vorher in proteolytischen Aktivitätstests bestimmten IMPI-GST-Konzentration zur Hemmung des Sekretoms (Abb. 31). In beiden Untersuchungen waren für die Inhibition von 17% Sekretom IMPI-GST-Konzentrationen im einstelligen μM -Bereich notwendig. Diese Ergebnisse der molekularbiologischen und zellbasierten Tests demonstrierten

eine konstante inhibitorische Kapazität von IMPI-GST, unabhängig des umgebenden Mediums und möglicher extrazellulärer Störfaktoren. Außerdem zeigte sich IMPI-GST jeweils effizienter im Vergleich zu PA. Die für PA ermittelten Konzentrationen (Abb. 34), stimmen mit den Daten von Beaufort et al. überein, die ebenfalls eine reduzierte Toxizität des Sekretoms durch PA bewiesen [75]. Eine mit unbehandelten Zellen vergleichbare Viabilität wurde weder mit IMPI-GST noch mit PA erreicht. Mögliche Ursachen sind eine begrenzte Wirksamkeit der Inhibitoren oder andere im Sekretom enthaltene Virulenzfaktoren haben ebenfalls eine toxische Wirkung. Gegen eine geringere Wirksamkeit von IMPI-GST sprechen die Ergebnisse der FRET-Tests, in denen die proteolytische Aktivität des Sekretoms komplett gehemmt wurde (Abb. 31).

Beim Einsatz von niedrigeren Sekretom-Konzentrationen (3%) wurde die Zellviabilität um 30% reduziert und damit weniger Zellen abgelöst als mit 10% Sekretom. Durch die gleichzeitige Applikation von IMPI-GST oder PA wurde die Toxizität des Sekretoms verhindert und eine mit der unbehandelten Kontrolle vergleichbare Viabilität von 100% erreicht (Abb. 36). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass andere toxische Stoffe in höheren Konzentrationen vorliegen müssen, um eine merkliche Schädigung der Zellen zu verursachen. In einem weiteren Experiment wurde nachfolgend der Behandlung mit Sekretom und IMPI-GST eine langsame Rehabilitation der Zellen beobachtet (Abb. 35). Dies lässt vermuten, dass die nicht von IMPI-GST verhinderte Schädigung der Zellen, keine langfristigen Folgen auf die Viabilität hat. Zur Bestätigung dieser These sollten weitere Untersuchungen mit längeren Rehabilitationszeiten durchgeführt werden. An mikroskopischen Aufnahmen der Zellen wurde in Anwesenheit des Sekretoms das Auftreten einer Anoikis beobachtet (Abb. 38). Beim Einsatz von IMPI-GST erhöhte sich die Zelladhärenz mit steigender Konzentration (Abb. 41). Trotz einer geringeren Viabilität, unterschieden sich die Zellkulturen im Durchlichtmikroskop optisch nicht von der unbehandelten Kontrolle (Abb. 41). Zur besseren Identifikation der dabei auftretenden Ereignisse wurden die Zellen immunhistologisch gefärbt (Abb. 42). In Abwesenheit von IMPI-GST lösten sich alle Zellen von der Oberfläche, bei Zugabe von IMPI-GST (500 nM) wurden ähnliche morphologische Zellstrukturen beobachtet wie in Anwesenheit von 5% Sekretom ohne Inhibitor (Abb. 39). Das beweist die Hypothese, IMPI-GST führt zu einer Verringerung der PE-bedingten Anoikis. Weiterhin war der vom Sekretom verursachte Abbau von F-Aktin in Anwesenheit von IMPI-GST sichtbar reduziert (Abb. 43).

In den immunhistologischen Färbungen (Abb. 43) wurden bei 0,3 μ M IMPI-GST abnorme Aktin-Strukturen, Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien detektiert. Vermutlich wird das PE des Sekretoms dann nur zum Teil inhibiert und freies PE bewirkt, wie bereits beschrieben (5.1.3

und 2.3.2), eine Aktivierung von Rho-Proteinen im MAPK-Signalweg, was diese morphologischen Aktin-Strukturen auslöst [87]. Mit steigenden IMPI-GST-Konzentrationen wurde mehr, schärfer intensiver gefärbtes Aktin beobachtet. Allerdings wurde, unabhängig von der eingesetzten IMPI-GST-Konzentration, nie eine mit der Kontrolle vergleichbare Morphologie des F-Aktins erreicht. Diese limitierte Wirkung von IMPI-GST deckte sich mit den Viabilitätsstudien (4.1.2). Die Ursache dafür könnten andere, extrazellulär freigesetzte, zytotoxische Stoffe in dem Sekretom sein, die eine Schädigung des Zytoskeletts und der Viabilität der Zellen verantworten. Dabei könnte es sich um weitere Exoproteasen, wie Staphylolysin oder Serin-Protease IV handeln oder Exotoxine, wie Exotoxin A, ExoS oder ExoT.

Staphylolysin ist in erster Linie dafür bekannt, die Wirkung von PE zu verstärken. Andere Proteasen, wie AprA oder Serin-Protease, spielen eine eher untergeordnete Rolle [59]. Exotoxin A kann, ebenso wie PE, ZO-Proteine herunterregulieren und TJ am Wiederaufbau hindern [152]. ExoS und T gehören zu dem T3SS, greifen unter anderem F-Aktin an und bedingen eine Reorganisation des Zytoskeletts [41]. Außerdem wird ExoS vermutet die FA zu schädigen und damit die Zelladhärenz zu vermindern sowie die Formierung von Stressfasern über die Deaktivierung von Rho-Proteinen auszulösen [153] (siehe 2.3.1). Beide Exotoxine fungieren als so genannte GAP-Aktivatoren [41]. Für eine Intoxikation durch ExoS und T sprechen die veränderten morphologischen Strukturen des F-Aktins in den immunhistologischen Aufnahmen. Dagegen spricht, dass T3SS Exotoxine direkt in die Wirts-Zelle sekretiert werden und eigentlich nicht im Sekretom enthalten sind. Eine andere Erklärung betrifft das Auftreten weiterer, Aktin-schädigender Substanzen, wie z.B. Exotoxin A, deren Wirkung zum derzeitigen Wissensstand noch unklar ist. Hierbei wird die bisher noch nicht komplett aufgeklärte, multifaktorielle Virulenz von *P. aeruginosa* besonders deutlich [59]. Dennoch führte die Applikation von IMPI zu einer signifikanten Verbesserung der Viabilität um mehr als 60%, verhinderte eine auftretende Anoi-kis und hemmte zum Großteil morphologische Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts. Unter Betrachtung einer multifaktoriellen Virulenz von *P. aeruginosa* erscheint die Wirkung von IMPI aussichtsreicher als erwartet.

5.1.5 Zellmigration unter Sekretom- und IMPI-GST-Einfluss

In infizierten Wunden ist neben dem zytotoxischen Einfluss der Virulenzfaktoren die Migration [77] der Keratinozyten entscheidend für einen erfolgreichen Wundverschluss [30]. Deshalb wurde zunächst die Auswirkung des Sekretoms auf die *in vitro* Wundheilung in Zellmigrationstests ermittelt. Dabei wurde die standardisierte Methode mit Inserts dem klassischen Scratch-

Assay vorgezogen, weil sie eine höhere Reproduzierbarkeit aufwies (siehe Anhang). Dennoch wurde in beiden Methoden eine relativ hohe Standardabweichung festgestellt, die jedoch ebenso in anderen Zellmigrations-Studien dargestellt wird [154]. Um die Daten zu relativieren, wurden die Migrationswerte in Abhängigkeit der jeweiligen Kontrolle angegeben (4.1.4).

Unabhängig von den meist hohen Standardabweichungen zeigten die Versuche klar eine mit zunehmender Sekretom-Konzentration reduzierte Migration der Zellen (Abb. 44). Bereits bei Zugabe von 1%-5% Sekretom nahm die Migrationsfähigkeit der Zellen deutlich an den Aufnahmen erkennbar um 40%-70% ab. Mit einer weiter steigenden Konzentration vergrößerte sich der zellfreie Spalt sogar und die Zellen lösten sich ab. Damit wurde eine negative Migration gemessen. Ab einer 10%igen Sekretom-Konzentration wurden, wie zuvor in den Zytotoxizitätstests (Abb. 32), keine Zellen mehr detektiert. Eine verlangsamte Migration durch das *P. aeruginosa* Sekretom wurde bereits in verschiedenen Studien festgestellt [77,155,156]. In diesen Studien wurde gezeigt, dass PE-fähige [77] sowie QS-aktive [156] *P. aeruginosa* Stämme die Zellmigration verminderten, aber das Sekretom von PE-defizienten ebenso wie von QS inaktivierte Bakterien keinen Einfluss auf die *in vitro* Wundheilung hatten. Im Vergleich zu diesen Daten aus der Literatur, fällt auf, dass trotz höherer Sekretom-Konzentrationen kein komplettes Ablösen des Zellrasens auftrat [156]. Das in dieser Arbeit verwendete Sekretom enthält höhere PE-Konzentrationen (5.1.2) und wirkt zugleich aggressiver. Damit wurde ein weiterer Beleg dafür gefunden, dass vor allem PE für die schädigende Wirkung auf die Zellmigration verantwortlich ist.

Für eine funktionierende Zellmigration sind unter anderem ein vollständiges F-Aktin-Zytoskelett, intakte AJ sowie die Bausteine der FA essentiell [25]. Durch PE wurden diese Strukturen empfindlich gestört, was vermutlich der Grund für die reduzierte Migration war. Weitere Faktoren, die zur beeinträchtigten Migration von Keratinozyten führen, sind die von PE aktivierte Rho-A-GTPase [86] und der MAPK-Signalweg [87] sowie der endoproteolytische Rezeptor uPAR [73]. Damit sind für die verminderte Zellmigration die gleichen Faktoren ursächlich, wie für die beschriebene Anoikis und die morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts (5.1.3), wodurch der gesamte Wundheilungsprozess maßgeblich behindert werden kann.

Nach der positiven Wirkung von IMPI-GST auf die Viabilität von Sekretom-behandelten Zellen, wurde der Effekt auf die Migration der Keratinozyten untersucht. Die Zugabe einer 2%igen Sekretom-Lösung führte aufgrund der beschriebenen großen Standardabweichungen in einem Experiment zu einer geringen, aber positiven Migration und bei einem anderen Sekretom zu einer leichten negativen Migration. Im Durchschnitt wurde keine Migration (0%) gemessen,

sodass diese im Vergleich zur Kontrolle in jedem Fall deutlich reduziert war (Abb. 45). Bei Einsatz von IMPI-GST wurde, obwohl die Abweichungen bis zu 30% betragen, eine signifikante Steigerung der Migration nachgewiesen. Bei Zugabe von 1,5 μM IMPI-GST zur 2%igen Sekretom-Lösung wurden mit der Kontrolle vergleichbare Werte erzielt. In weiteren Experimenten unter Behandlung von 10% Sekretom verhinderte IMPI-GST eine totale Zellablösung und es wurde eine leichte Migration gemessen. Der Inhibitor selbst hatte keinen Einfluss auf die Migration unbehandelter Zellen.

Das Resultat der *in vitro* Wundheilungsexperimente bewies, dass IMPI-GST eine von dem Sekretom ausgelöste reduzierte Zellmigration verhinderte. Die Ergebnisse zeigten außerdem eine zu den vorherigen Zellviabilitätsstudien konsistente limitierte Wirkung von IMPI-GST. Bei einem völlig zerstörten Zellrasen konnte die Zellablösung verhindert, jedoch keine signifikante Migration nachgewiesen werden. Trotzdem belegen die gesteigerte Zelladhäsion und die erhöhte Migration bei niedrigeren Sekretom-Konzentrationen das große therapeutische Potenzial dieses Protease-Inhibitors.

5.1.6 Sekretom und IMPI-GST im *ex vivo* Wundmodell

Zur besseren Annäherung an den Wundheilungsprozess folgten auf die *in vitro* Untersuchungen *ex vivo* Versuche. Mit Hilfe des Schweinehaut-Wundmodells konnte die komplexe Wundheilung unter Beteiligung verschiedener Zellen anhand einer Gewebeprobe repräsentiert werden. Schweinehaut ist aufgrund der morphologischen, histologischen und physiologischen Ähnlichkeiten mit Humanhaut sehr gut als Testsystem geeignet und bereits von der OECD als Permeationsmodell anerkannt [144,157-159]. Außerdem handelt es sich dabei um Schlachtabfälle, sodass moralische Bedenken, wie in Tierversuchen ausbleiben. Hausschweine besitzen, obwohl sie nicht im Labor aufgezogen werden, trotzdem aufgrund des ähnlichen Schlachalters, Futters und Gesundheitszustands eine nahezu konstante Qualität. Das *ex vivo* Schweinehaut-Wundmodell wurde in Anlehnung an ein Patent von Brandner et al. und andere Publikationen entwickelt [144,160] und im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Auch in der unbehandelten Kontrollgruppe wurde eine im Vergleich zur normalen Wundheilung langsamere Heilung beobachtet [31]. Nach 2-wöchiger Kultivierung bildete sich zwar keine epidermale Schicht über die gesamte Wundlänge, wie im Humanhaut-äquivalenten Modell, aber es war eine Wundzunge zu erkennen. Diese Wundzunge bildet eine keilförmigen Ausstülpung der Epidermis mit einer hohen Anzahl an Zellkernen, der in den Wundspalt hinein migrierten Keratinozyten (Abb. 46), die ebenso in anderen Quellen beschrieben ist [144,161].

Zuerst wurde das *P. aeruginosa* Sekretom auf dem Schweinehaut-Wundmodell untersucht. Durch die Applikation von 2% Sekretom wurde eine verkürzte Wundzunge erfasst, die einer verminderten Wundheilung entspricht (Abb. 46). Bei höheren Sekretom-Konzentrationen zeigte sich eine steigende, nekrotische Wirkung, die bei Zugabe von 10% Sekretom in einem deutlich zerstörten Gewebe resultierte. Diese Ergebnisse decken sich mit den beobachteten Auswirkungen einer *P. aeruginosa* Wundinfektion im Tierversuch am Schwein [162].

Verschiedene Studien zeigten bereits, dass PE für eine weitreichende Gewebeerstörung, insbesondere durch den Abbau von Kollagen, Elastin und Fibrin verantwortlich ist [59,62,63,70,71]. Die in diesem *ex vivo* Experiment sichtbare Ablösung des *Stratum corneums*, über die Zerstörung epidermaler Zellen bis hin zur kompletten Destruktion der oberen Hautschichten (Abb. 46) korrelieren mit den *in vitro* Ergebnissen (4.1.2-4.1.4). In allen Versuchen wurde eine durch das Sekretom induzierte Störung der Zelladhäsion, Degradierung von Zell- und Gewebestrukturen und eine Reduktion der Migration beobachtet. Auslöser für die damit verbundene Wundheilungsstörung ist nach den dargestellten Ergebnissen, verknüpft mit den bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur, PE und dem damit verbundenen direkten oder indirekten Abbau der EZM, der Zellkontakte sowie des Zytoskeletts [63,74,78].

Dieser beschriebene Gewebeabbau in den *ex vivo* Versuchen durch Applikation des Sekretoms entspricht den bisher publizierten Beobachtungen von *P. aeruginosa* [63,162]. Dafür hauptsächlich verantwortlich ist die Protease PE [62,63], weshalb bereits die potenzielle Therapie mit PE-Inhibitoren postuliert [7,63] und bei kornealen Infektionen mit *P. aeruginosa* bereits am Tier eingesetzt wurde [101,104]. Diese Vermutung wurde in der vorliegenden Arbeit mit IMPI-GST *in vitro* und *ex vivo* bestätigt. In dem Schweinehaut-Wundmodell verhinderte der spezifische PE-Inhibitor eine Sekretom-bedingte Nekrose und eine damit einhergehende Wundheilungsstörung. Bei gleichzeitiger Zugabe von IMPI-GST wurden bei Sekretom-Konzentrationen von 2-5% eine Wundzunge und eine hohe Zellkerndichte beobachtet. Ein Gewebeabbau, ein Ablösen des *Stratum corneums* sowie eine verlangsamte Migration wurden verhindert und die Wundmodelle ließen keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle erkennen. Bei Sekretom-Konzentrationen von über 10% verhinderte die Zugabe von IMPI-GST eine nekrotische Gewebeerstörung, jedoch war die erkennbare Wundzunge weniger stark ausgebildet. Dementsprechend bestätigen die *ex vivo* Versuche die *in vitro* Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit von IMPI-GST.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit anhand der pharmakologischen Untersuchungen das große Potenzial von IMPI-GST in der Therapie von Wundinfektionen mit *P. aeruginosa* auf molekularer, zellulärer und histologischer Ebene gezeigt.

5.2. Formulierungsdesign

Neben der Erforschung der Wirkung von IMPI, war die Entwicklung einer geeigneten Formulierung zur dermalen Anwendung ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit. Die Anforderungen dabei waren der mögliche Einsatz auf Wunden und eine Freisetzung des potenziellen Wirkstoffs mit ausreichender Aktivität. Optimale Eigenschaften zum Einsatz bei Wunden sind unter anderem die Generierung eines feuchten Wundmilieus bei gleichzeitiger Aufnahme von überschüssigem Wundexsudat, die Okklusion zum Schutz der Wunde und die Toxin- und Allergenfreiheit. Daher fiel die Wahl auf ein thermosensitives Hydrogel. Hydrogele sind generell zur Anwendung bei infizierten Wunden geeignet (siehe 2.5.2) [123] und können gleichzeitig Peptidwirkstoffe schützen und freigegeben [135,163,164]. Auf der Basis von Poloxamer 407 wurde eine bei Raumtemperatur flüssige und bei Hauttemperatur gelierende Formulierung entwickelt. Eine mögliche schmerz- und keimfreie Applikation als Spray oder mit Hilfe einer Spritze könnte so im flüssigen Zustand erfolgen, um erst auf der Wunde die geforderten Geleigenschaften auszubilden. Die einzelnen Inhaltsstoffe und Konzentrationen wurden alle anhand ihrer rheologischen Charakteristik ausgesucht. Später wurden geeignete Konservierungsmittel getestet, die Wechselwirkungen zwischen Formulierung und Wirkstoff überprüft sowie die Freisetzung von IMPI-GST aus dem Gel sichergestellt.

5.2.1 Rheologische Charakterisierung

Für die Entwicklung des thermosensitiven Hydrogels wurden die einzelnen Bestandteile in variierenden Konzentrationen hinsichtlich ihrer Rheologie untersucht. Der Hauptgelbildner P407 war verantwortlich für den thermosensitiven Effekt. Alle wässrigen Lösungen mit 14-25% P407 lagen entsprechend anderer Studien bei Lagerungstemperatur (4° C) in einem flüssigen und bei 40° C in einem festen Zustand vor [129,165,166]. Diese Viskositätssteigerung durch Erwärmung war reversibel und die Anzahl der möglichen Umkehrungen von Sol zu Gel unbegrenzt.

Zunächst wurde in rheologisch-oszillatorischen Messungen die Abhängigkeit der Gel-Sol-Übergangstemperatur (T_{Gel}) von der P407-Konzentration, die bereits publiziert wurden [132,165,167-169], bestätigt (Abb. 48). Das Ziel dieser ersten Experimente war die Ermittlung einer geeigneten P407-Konzentration, die die Anforderung einer T_{Gel} zwischen 28° und 32° C

erfüllte. Dabei wurde ein linearer Anstieg der Gelstärke, angegeben als Speichermodul G' bei Hautoberflächentemperatur ($32,5^\circ\text{C}$), und ein sukzessiver Abfall von T_{Gel} bei steigenden P407-Konzentrationen gemessen. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen aus der Literatur [128,170,171]. Die Ursache für diese steigende Gelierung ist eine verminderte Löslichkeit des Poloxamers durch die zunehmende Moleküldichte. Dadurch erhöhen sich die Wechselwirkungen der Molekülketten, die Mizellenbildung und die Packungsdichte im Gel [128,171,172].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein 16%iges P407-Gel mit einer T_{Gel} von $29,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$ als ideal beurteilt. Andere Studien thermosensitiver P407-Hydrogele, kamen teilweise zu ähnlichen [173], aber auch zu unterschiedlichen Ergebnissen [145,174-177]. Diese widersprüchlichen Aussagen basieren auf unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung von T_{Gel} . Eine Messung des Gel-Sol-Übergangspunkt entspricht immer einer Näherung des Übergangsbereichs zwischen flüssiger Lösung und ausgebildeter Gelstruktur. Je nach Messmethode kann dieser Bereich aber genauer ermittelt werden [139]. Die am häufigsten angewendeten Bestimmungsmethoden sind Rührstabs- und Tube-Inversions- sowie rheologische Messmethoden.

Die wissenschaftlich korrekte Definition von T_{Gel} entspricht einem frequenzunabhängigen Phasenverschiebungswinkel δ . Deshalb hätte die Extrapolarisation über eine Multifrequenz-Messung zwar zu einer genaueren Bestimmung geführt, aber eine exakte Ermittlung ist nicht möglich, weil der eigentliche Gelpunkt nicht existiert [139]. In der vorliegenden Arbeit wurde sich aufgrund des deutlich geringeren Zeitaufwandes für die rheologische Bestimmung von T_{Gel} über den Schnittpunkt von G' mit G'' entschieden. Weil hier eine praktische Anwendung im Vordergrund stand, erschien eine Genauigkeit für T_{Gel} unter 1°C [166] als ausreichend. Dieser Schnittpunkt entspricht nach Formel 5 einem Phasenverschiebungswinkel (δ) von 1. Bei einer viskoelastischen Flüssigkeit dominiert unterhalb des Gel-Sol-Übergangspunktes eher viskoses Verhalten bei einem Phasenverschiebungswinkel $\delta > 1$ und ab $\delta < 1$ eher elastisches Verhalten. Die rheologische Bestimmung wird im LVE-Bereich bei konstanter, niedriger Frequenz unter 1,5 Hz empfohlen [178] und dementsprechend hier durchgeführt. Der LVE-Bereich wurde zunächst im Amplituden-Sweep über ein konstantes G' definiert. Im anschließenden Frequenz-Sweep wurde die Abhängigkeit des komplexen Schubmoduls G^* von der Frequenz festgestellt und bestätigt die Abhängigkeit des Phasenverschiebungswinkels δ von der Frequenz. Um einen möglichst geringen Einfluss auf die Gelstruktur bei akzeptabler Messdauer zu haben, wurde eine kleine Messfrequenz von $\omega = 1\text{ Hz}$ gewählt.

Die weiteren Methoden zur Bestimmung von T_{Gel} , wie Rührstabs- oder Tube-Inversions-Methode, sind jeweils schlechter untereinander vergleichbar, da die jeweiligen Versuchsaufbauten (Vials, Rührer, Gelvolumen etc.) variieren [131,145,179]. Bei dem Vergleich von der Tube-Inversions- und der Rührstabs-Methode mit rheologischen Daten wurden Inkonsistenzen zwischen den jeweils bestimmten T_{Gel} -Werten festgestellt [174,179]. In dieser Arbeit wurden mit der Tube-Inversions-Methode im Durchschnitt um 4°C höhere T_{Gel} -Werte bestimmt als mit der rheometrischen Messung (siehe Anhang). Durch das Umdrehen des Tubes wirken so hohe Scherkräfte auf die Probe, dass eine neu gebildete Gelstruktur vermutlich zerstört wird. Erst bei einer stärkeren Vernetzung kann das Gel als solches identifiziert werden. Ein ähnlicher Effekt kommt bei der Rührstabs-Methode zum Tragen, wobei dort eine stetige Scherung eine Vernetzung bereits während des Gelierungsprozesses verhindert.

Nach der Identifikation der idealen P407-Konzentration von 16%, wurde der Einfluss verschiedener Additive, wie Verdickungs-, Feuchtigkeits- und Konservierungsmittel auf die rheologischen Eigenschaften untersucht. Jeder Zusatzstoff kann die viskoelastische Charakteristik von Hydrogelen beeinflussen [165,167,180,181]. Dabei kann es zu einer verstärkten Verknüpfung der PEOs mit Folge einer vorzeitigen Gelbildung und erhöhter Gelstärke kommen [171]. Hydrophile Substanzen können jedoch eine verzögerte Gelbildung mit erhöhter T_{Gel} und geringeren Gelstärken bedingen [181].

Zur Optimierung der rheologischen Eigenschaften wurden Hyaluronsäure (HA) und Poloxamer 188 als zusätzliches Verdickungsmittel getestet. HA besteht aus einer makromolekularen Kette aus 2 Glucosederivaten, ist strukturviskos und wasserbindend. Der allergenfreie, atoxische, körpereigene Stoff spielt eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung, der Proliferation und der Zelldifferenzierung des Wundheilungsprozesses [182,183]. Bei der Testung von HA in dem P407-Hydrogel führte HA zu einem von der Messtemperatur unabhängigen Anstieg von G' (Abb. 50), womit die Ergebnisse von Mayol et al. bestätigt wurden [170]. Dieses Resultat wird durch die wasserbindende Eigenschaft von HA und seine mikrostrukturellen Interaktionen mit P407 ausgelöst [170]. Weil dieser Effekt besonders bei niedrigen Temperaturen ins Gewicht fällt, wurde auf die Zugabe von HA verzichtet, denn eine erhöhte Gelstärke bei Umgebungstemperatur ist für die Applikation, das Handling und die Herstellung der Formulierung ungeeignet.

P188 wurde bereits in P407-Gelen zur Optimierung der rheologischen Eigenschaften eingesetzt [145,173]. Durch Zugabe einer P188-Konzentration unter 5% verzögerte sich die Gelbildung und es wurden höhere T_{Gel} -Werte gemessen. Ab etwa 10% P188 kehrte sich das Verhalten um und die Gelbildung verstärkte sich (Abb. 51). Erklärt wird diese Charakteristik durch ein

höheres PEO/PPO Verhältnis. Die Folge ist eine zunächst vermehrte Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen hydrophilen PEO-Blöcken. Dadurch werden die Interaktionen zwischen den PPO-Segmenten von P407 gehemmt und die Mizellen-Bildung verzögert, weil sie aufgrund des eingeschränkten Volumens schlechter miteinander in Kontakt kommen [145]. Bei höheren P188-Konzentrationen kommt es dann zur Ausbildung von P188-Mizellen, die in ein Netzwerk aus P407 Mizellen eingebaut werden. Daraufhin verstärkt sich die Gelbildung und T_{Gel} nimmt ab [145,181]. Basierend auf den ermittelten Daten wurde 15% P188 als optimale Konzentration für ein bei Raumtemperatur flüssiges und auf der Haut gelierendes Hydrogel ausgewählt. Der Vorteil dieser Kombination an Gelbildnern ist eine höhere T_{Gel} (31,5° C) bei ungefähr gleichbleibender Gelstärke.

Die zusätzlichen Feuchthaltemittel Glycerin und PEG wurden eingesetzt, um das Austrocknen des Hydrogels nach dem Auftragen auf der Haut zu verhindern. Außerdem soll ein auf die Wundheilung positiv wirkendes feuchtes Wundmilieu erzeugt werden [3,4,45]. Beide Stoffe zeigten bis zu einer Konzentration von 5% keinen signifikanten Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften eines P407-Hydrogels. Höhere Konzentrationen führten zu einer verstärkten Gelierung (siehe Anhang), was ebenfalls in der Literatur beschrieben wird [165]. Vermutlich lässt sich dieser Effekt auf eine verringerte Löslichkeit von P407 durch Anwesenheit der Alkoholgruppen zurückführen. Alkohole senken die Dielektrizitätskonstante der Lösung und tendieren zur Dehydratisierung der gelösten Substanzen [165]. Daraus resultiert eine Desolvatisierung der Poloxamer-Moleküle und damit verstärkte Interaktionen der Moleküle, was eine vermehrte Vehikel-Bildung und somit eine erhöhte Gelbildung zur Folge hat [165]. Aufgrund seiner möglichen Doppelfunktion als Feuchthalte- und Lösemittel für IMPI und dabei geringen Beeinflussung der rheologischen Charakteristik wurden 3% Glycerin in die Formulierung eingesetzt.

Zum Schutz des Hydrogels vor mikrobiellem Verfall wurden verschiedene Konservierungsmittel getestet. Ihr Einfluss auf das Hydrogel wurde in rheologischen Messungen und ihre Funktion in Keimbelastungstests untersucht. Bei Zugabe von 20% Propylenglykol verstärkte sich die Gelbildung der P407-Lösungen und niedrigere T_{Gel} waren die Folge der Alkoholgruppen. In den P407-P188-Gelen erhöhte sich jedoch T_{Gel} in Anwesenheit von Propylenglykol. Ursächlich dafür ist wahrscheinlich eine vermehrte Wasserstoffbrückenbildung zwischen den Alkoholgruppen und PEO-Blöcken. Die Zugabe einer Kombination aus Parabenen mit Phenoxyethanol oder Kaliumsorbat mit Zitronensäure resultierten vermutlich aufgrund von Aussalzungseffekten in einer erhöhten Gelstärke und einer reduzierten T_{Gel} . Ähnliche Ergebnisse wurden beim Einsatz

diverser Salze in P407-Lösungen beobachtet [142,184]. Kaliumsorbat und Zitronensäure beeinflussten am wenigsten die Rheologie des Gels. Entscheidend für die Wahl des Konservierungsmittels war jedoch, dass diese Kombination als einzige die Kriterien des Keimbelastungstests erfüllte, die Bakterien und Pilze abtötete und ihr Wachstum über einen Zeitraum von mindestens 28 Tagen unterdrückte. Allerdings führte dieses Konservierungsmittel zu einer Abnahme des pH-Wertes von 7,5 auf 5,4. Ein niedrigerer pH-Wert nahe der normalen Haut wird vermutet, zusätzlich zum Rückgang des bakteriellen Wachstums, sich positiv auf die Wundheilung auszuwirken [185,186]. Chronische, nicht heilende Wunden weisen generell einen hohen pH-Wert von über 7,3 auf, akute Wunden oder chronische Wunden, die im Begriff sind zu heilen eher einen sauren pH-Wert [185]. Dementsprechend wurde sich für den Einsatz von 0,2% Kaliumsorbat und 0,1% Zitronensäure als Konservierungsmittel in der Formulierung entschieden.

5.2.2 Eignung des Hydrogels

Poloxamer-Gele werden als geeignete Matrizen für verschiedenen Wirkstoffe [169,176,187], darunter auch Proteine verwendet [127,188]. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die großen Proteine BSA und IMPI-GST eine Trübung des Gels verursachte. Dafür könnte eine zerstörte Hydrathülle der Proteine, aufgrund von Aussalzungseffekten durch die Polymer-Einheiten, verantwortlich sein. Für eine damit verbundene Reduktion der freien Wassermoleküle spricht, dass die Gelstärke bei Zugabe von IMPI-GST leicht zunahm und T_{Gel} etwas abfiel (Abb. 54). Die Folgen einer solchen Präzipitation könnten in einer heterogenen Verteilung des Wirkstoffs und damit einer ungleichmäßigen Freisetzung enden. Außerdem könnte eine irreparable Zerstörung der Proteinstruktur auftreten und diese damit inaktiviert werden. IMPI (Abb. 53), Lysozym und Aprotinin bildeten in gleicher molekularer Konzentration klare Gele (Abb. 52), weshalb vermutet wurde, dass die Molekülgröße entscheidend ist. Neben der Proteingröße spielt der isoelektrische Punkt (pI) im Zusammenhang mit dem pH-Wert der Lösung eine wichtige Rolle bei der Ausfällung von Proteinen. Allerdings liegt die pI von IMPI (6,1) näher an dem pH-Wert des Gels (5,4) als der pI von BSA (4,6), dass der pI, wenn überhaupt, dann nur eine untergeordnete Rolle spielt. Außerdem trat der von IMPI-GST ausgelöste Trübungseffekt in einem pH- Bereich von pH 5-8 in Anwesenheit verschiedener Konservierungsmittel auf. Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass das entwickelte Drug Delivery System höchstwahrscheinlich für große Proteine ungeeignet ist, aber eine Applikation von IMPI unproblematisch. Mitentscheidend bei der Wahl einer geeigneten Darreichungsform ist die Wirkstofffreisetzung. In dieser Arbeit wurde eine zeitabhängige Freisetzung von IMPI-GST aus dem Hydrogel gezeigt

(Abb. 56). Da 90% des Wirkstoffs über 10 h in beheizten Franz-Diffusions Zellen wiedergefunden wurden, konnte eine verzögerte, aber komplette Freisetzung belegt werden. In dem Verlauf dieser Studie wurde keine Lag-Phase gemessen, womit eine rasche Inhibition freier Proteasen durch IMPI-GST gewährleistet werden kann. Nach 4 h verringerte sich die Freisetzungsgeschwindigkeit etwas, sodass IMPI-GST nach einem schnellen Wirkeintritt leicht verzögert freigegeben wird. Der Wirkstoff wird dabei über wässrige Diffusionswege durch Verengungen und Verwinkelungen zwischen den hexagonal angeordneten Gelbildnern freigegeben [135,163]. Diese verzögerte Freisetzung wurde bereits mit unterschiedlichen Wirkstoffen wie Naproxen [136], Cetiofur [187], Lidocain [169] oder Hirudin [176] nachgewiesen. Die hier gezeigte Freisetzungsstudie diente dem Nachweis der Diffusion von IMPI-GST aus dem Gel. Möglicherweise wird das kleinere Peptid IMPI ohne GST-Tag schneller freigesetzt, was in weiteren Untersuchungen überprüft werden sollte. Diese Freisetzung von IMPI kann anschließend noch gezielt über die Gelstärke, z.B. mittels Poloxamer-Konzentration, gesteuert und damit an seine Wirkdauer angepasst werden.

Auf die inhibitorische Aktivität von IMPI-GST zeigte das Hydrogel im Protease-Assay keinen Einfluss. Bei gleicher IMPI-GST-Konzentration konnte die M4-MP Thermolysin unabhängig des umgebenden Mediums, Puffer oder Hydrogel, komplett gehemmt werden. Allerdings kann dieser Versuch einen Einfluss des Gels auf die Funktion von IMPI nicht komplett ausschließen, da keine IC_{50} -Bestimmung durchgeführt wurde. Das Ergebnis zeigte aber, dass IMPI-GST generell in der Formulierung wirksam ist. Das gleiche Experiment wurde auch nach einer 4-wöchigen Lagerung bei 4° C oder 25° C durchgeführt und bestätigte damit die Stabilität von IMPI-GST in dem Gel. Weiterführende IC_{50} -Bestimmungen könnten zusätzliche Aufschlüsse über den Einfluss der Formulierung auf die Aktivität des Wirkstoffes geben.

Zusammengefasst wurde in der vorliegenden Arbeit eine geeignete Formulierung mit der geforderten rheologischen Charakteristik eines thermosensitiven Hydrogels für IMPI entwickelt. Allerdings muss die Eignung des Hydrogels in Hinblick auf die Protein-Präzipitation und die Freisetzung noch weiter untersucht und insbesondere für IMPI ohne Tag geprüft werden. IMPI-GST wurde aus dem Gel freigesetzt und eine größere, gegenseitige Beeinflussung von Wirkstoff und Formulierung, in Bezug auf die Gel-Eigenschaften und auf die Aktivität von IMPI-GST wurde nicht festgestellt.

5.3. Fazit und Ausblick

Der Behandlungsansatz mit PE-Inhibitoren bei *P. aeruginosa*-Infektionen wurde bereits mehrfach postuliert [7,63] und bei kornealen Infektionen im Tierversuch angewendet [101,104]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein PE-Inhibitor systematisch auf die Anwendung bei Wundinfektionen getestet. IMPI wurde erstmals als potenzielles Wirkstoffprotein *in vitro*, an Zellkulturen, ebenso wie *ex vivo* an einem Schweinehautwundmodell näher untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten das große therapeutische Potenzial von IMPI zur Behandlung von Infektionen mit *P. aeruginosa*. Außerdem wurde eine mögliche Formulierung für dessen Anwendung vorgestellt.

IMPI-GST wird insbesondere aufgrund seiner hohen Spezifität im Vergleich mit anderen M4-MP-Inhibitoren favorisiert [15]. Nach bisherigem Kenntnisstand und den Zytotoxizitäts-Untersuchungen in dieser Arbeit, wurden durch IMPI keine Nebenwirkungen hervorgerufen [15]. Andere Inhibitoren sind entweder weniger spezifisch oder ihre Spezifität, bzw. Toxizität wurde noch nicht ermittelt, womit mögliche Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen werden können. Im Vergleich zu dem Standard-Inhibitor PA wirkte IMPI-GST in allen molekularbiologischen und zellbasierten Experimenten stets effektiver. Im Hinblick auf eine weitere Forschung an dem Wirkstoff steht die Wiederholung der entscheidenden *in vitro* und *ex vivo* Versuche mit IMPI ohne Tag an erster Stelle, sobald es in ausreichender Menge produziert werden kann. Dann sollten die Hemmung höherer Sekretom-Konzentrationen in den proteolytischen Aktivitätstests und den Zellkultur-Untersuchungen überprüft werden.

Die in dieser Arbeit durch das Sekretom hervorgerufenen, beobachteten *in vitro* Schädigungen an humanen Keratinozyten decken sich zum Großteil mit den bisherigen Erkenntnissen einer PE-Behandlung auf anderen Zellkulturen. Der Einfluss von PE wurde insbesondere an der verringerten Zelladhäsion und der verminderten Zellmigration deutlich. Die morphologischen Veränderungen des F-Aktins sind sowohl in dieser Arbeit als auch in der Literatur unterschiedlich beschrieben und die Ursachen noch nicht aufgeklärt. Eine weitere Erforschung des PE-Einflusses auf Proteinebene, z.B. auf Aktin und den MAPK-Signalweg, sollten darüber Aufschluss geben. Im Vordergrund dieser Arbeit stand dabei die Behandlung mit IMPI-GST, die den toxischen Einfluss des Sekretoms auf die Zellviabilität um mehr als 60% reduzierte, die Anoikis und die morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts zum Großteil verhinderte.

Die *ex vivo* Untersuchungen in dem Schweinehaut-Wundmodell bestätigten die nekrotische, zellschädigende und heilungsvermindernde Wirkung des Sekretoms. In diesen Experimenten

fürte die Applikation von IMPI-GST ebenfalls zu einer deutlichen Verbesserung der Gewebemorphologie und der Wundheilung. Diese weitreichende, erfolgreiche Wirkung eines Protease-Inhibitors wurde hier zum ersten Mal an IMPI-GST nachgewiesen. Dabei wurde auch die große Bedeutung von PE auf die Wundheilung aufgezeigt, denn aufgrund der hohen Spezifität von IMPI musste PE für das Auftreten der Anokis, die verminderte Migration und die nekrotische Wirkung des Sekretoms verantwortlich sein. Andere in das Sekretom freigesetzte Virulenzfaktoren fallen vermutlich weniger stark ins Gewicht. In den *ex vivo* Versuchen wurden IMPI-GST in einem komplexen Gewebe unter dem Zusammenspiel von mehreren Zellen beobachtet. Die Auswertung des Modells beschränkte sich hier auf eine Beurteilung der histologischen Schnitte. Zur besseren Identifikation des Wundfortschritts könnten über die Markierung proliferierender Zellen die Proliferations- und Apoptose-Rate am Wundrand bestimmt werden [189]. In anderen Studien werden Wundmodelle aus Humanvollhautproben oder humane 3-D-Modelle verwendet, die in diesem Projekt eine interessante Folgeuntersuchung darstellen [190,191].

In der vorliegenden Arbeit wurde die therapeutische Wirkung von IMPI gegen das Sekretom von *P. aeruginosa* nachgewiesen. Im Anschluss sollte die Erforschung von IMPI in direktem Kontakt mit dem Bakterium *P. aeruginosa* folgen. Generell wird vermutet, PE-Inhibitoren können die Biofilm-Bildung über QS gesteuerte Prozesse hemmen und damit die Antibiotikaresistenz herabsetzen [10,96]. Diese Hypothese könnte in Biofilm-Modellen [54] und Antibiotika-Resistenz-Tests untersucht werden. Cathcart et al. zeigten bereits ein verringertes Biofilm-Wachstum von *P. aeruginosa* bei Anwesenheit eines PE-Inhibitors [96]. In Kombination mit einem Antibiotikum konnte das Bakterium trotz Biofilm komplett vernichtet werden [96]. Für eine Kombinationstherapie mit IMPI könnte idealerweise ein AMP eingesetzt werden, das bereits im Produktionsstamm an IMPI kloniert werden könnte.

PE ist verantwortlich für die Invasion des Bakteriums in den Wirt und ist vermutlich an der Bereitstellung von Nährstoffen beteiligt [64,192]. Bei einer Kultivierung des Bakteriums in Beef Extrakt ohne weitere AS-Quelle würde bei Zutreffen dieser Hypothese durch Zugabe von IMPI eine Wachstumsminderung zu beobachten sein. Zur abschließenden pharmakologischen *ex vivo* Überprüfung sollte *P. aeruginosa* in den *in vitro* und *ex vivo* Wundheilungsversuchen mit IMPI und IMPI in Kombination mit einem Antibiotika getestet werden, bevor es in Tierversuchen weiter untersucht wird.

Neben der Testung der Wirksamkeit wurde in dieser Arbeit eine Formulierung für IMPI designt. Die thermosensitive Formulierung mit dem Hauptgelbildner P407 zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität von IMPI-GST und ermöglichte seine gleichmäßige Freisetzung über einen Zeitraum

von 10 h. Darüber hinaus wird angenommen, dass das Gel den Wirkstoff schützt, die Wunde vor Neuinfektionen bewahrt und zusätzlich die Wundheilung begünstigt [123]. Diese Vermutungen könnten mit und ohne IMPI, z.B. im Schweinehaut-Wundmodell, überprüft werden. Dabei sollten ebenfalls mögliche Wechselwirkungen des Arzneimittels mit Haut- und Wundlysaten untersucht und der Schutz des Wirkstoffproteins vor ubiquitär vorkommenden Proteasen, UV-Licht, Oxidation oder weiteren zur Denaturierung führenden Umwelteinflüssen sichergestellt werden. Die Freisetzung von IMPI-GST wurde nachgewiesen, jedoch müsste dieses Experiment mit IMPI wiederholt werden, da die Freisetzungskinetik dieses wesentlich kleineren Peptids höchstwahrscheinlich verändert ist.

In Schweinehaut-Wundmodellen wurde mit *S. aureus* ein ähnlicher Gewebeabbau wie in Folge einer Infektion mit *P. aeruginosa* verursacht [193]. Aureolysin, eine M4-MP und gleichzeitig ein Virulenzfaktor von *S. aureus* könnte für diese nekrotische Wirkung verantwortlich sein. Es steht unter Verdacht ebenso wie PE diverse TJ- und AJ-Proteine zu zerstören. Die Applikation von Aureolysin führte auf HaCaTs zu niedrigeren TER-Werten und Veränderungen im Aktin-Zytoskelett, die auf eine Herunterregulierung von ZO-1-3, Occludin und Anhänger der Claudin-Familie zurückzuführen waren [193]. Die Zellmigration und –Proliferation wird ebenfalls von *S. aureus* wie von *P. aeruginosa* gehemmt. Damit wurde für den wichtigen Virulenzfaktor Aureolysin eine ähnliche Wirkung wie für PE gezeigt [146,155,194]. Aufgrund der ähnlichen Struktur-Wirkungsbeziehung wäre ein Einsatz von IMPI bei Infektionen mit dem häufigsten und oft multiresistent vorkommenden Keim *S. aureus* denkbar. Das Wirkspektrum von IMPI könnte außerdem auf weitere M4-MP produzierende Erregergruppen, wie *Legionella*, *Clostridium prefringens* (Lamda Toxin), *Listeria* (*Listeria* metallprotease, Mpl), *Enterococcus faecalis* (Coccolysin), *Helicobacter* und *Vibrio* (Vibriolysin, Wundinfektionen) ausgeweitet werden [15,146].

P. aeruginosa ist nicht nur ein Auslöser von chronischen Wunden, sondern löst auch andere Infektionen aus. *P. aeruginosa* gilt z.B. als einer der häufigste und am schwierigsten zu behandelnden Keime von Lungeninfektionen [10,61]. Insbesondere Patienten der Mukoviszidose leiden häufig unter diesem Pathogen, das eine der häufigsten Todesursachen dieser Krankheit ist [61,195]. Diverse Untersuchungen wiesen bereits auf die schädigende Wirkung von PE und dem Sekretom von *P. aeruginosa* an Lungenzellen hin [77,80,102]. Hornhautinfektionen lassen sich ebenfalls häufig auf *P. aeruginosa* und den Virulenzfaktor PE zurückführen und wurden schon mit PE-Inhibitoren im Tierversuch therapiert [101]. Der potenzielle therapeutische Einsatz von IMPI sollte daher auf weitere Indikationsgebiete ausgeweitet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Wirknachweis von IMPI bei der Therapie von Wundinfektionen mit *P. aeruginosa* *in vitro* und *ex vivo* erbracht und ein thermosensitives Hydrogel als geeignete Darreichungsform entwickelt. Die umfangreichen präklinischen Untersuchungen auf molekularer, zellulärer und histologischer Ebene lassen darauf schließen, dass eine Vielzahl an weiteren therapeutischen Möglichkeiten für das Wirkstoffprotein IMPI existiert.

Referenzen

1. Eisenhardt M, Dobler D, Schlupp P, Schmidts T, Salzig M, et al. (2015) Development of an insect metalloproteinase inhibitor drug carrier system for application in chronic wound infections. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 67: 1481-1491.
2. Diener H, Storck M, Dissemond J, Karl T, Riepe G, et al. (2012) Wundzentren. *Gefäßchirurgie* 17: 334-340.
3. Gillitzer R (2002) Modernes Wundmanagement. *Der Hautarzt* 53: 130-147.
4. Mani R, Romanelli M, Shukla V (2012) *Measurements in Wound Healing: Science and Practice*: Springer Science & Business Media.
5. Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, et al. (2006) Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *International wound journal* 3: 225-231.
6. Jockenhöfer F, Chapot V, Stoffels-Weindorf M, Körber A, Klode J, et al. (2014) Bakteriellles Spektrum der Kolonisation des chronischen Ulcus cruris: 10-Jahres-Vergleichsstudie Eines Deutschen Wundbehandlungszentrums. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 12: 1121-1128.
7. Supuran CT, Scozzafava A, Clare BW (2002) Bacterial protease inhibitors. *Medicinal Research Reviews* 22: 329-372.
8. Fischbach MA, Walsh CT (2009) Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 325: 1089-1093.
9. Estahbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheh F (2002) Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns* 28: 340-348.
10. Strateva T, Mitov I (2011) Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of microbiology* 61: 717-732.
11. Yu H, He X, Xie W, Xiong J, Sheng H, et al. (2014) Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. *Canadian journal of microbiology* 60: 227-235.
12. Pavlovskis OR, Wretling B (1979) Assessment of protease (elastase) as a *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor in experimental mouse burn infection. *Infection and Immunity* 24: 181-187.
13. Tamura Y, Suzuki S, Sawada T (1992) Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Microbial pathogenesis* 12: 237-244.
14. Theander T, Kharazmi A, Pedersen B, Christensen LD, Tvede N, et al. (1988) Inhibition of human lymphocyte proliferation and cleavage of interleukin-2 by *Pseudomonas aeruginosa* proteases. *Infection and Immunity* 56: 1673-1677.
15. Clermont A, Wedde M, Seitz V, Podsiadlowski L, Lenze D, et al. (2004) Cloning and expression of an inhibitor of microbial metalloproteinases from insects contributing to innate immunity. *Biochemical Journal* 382: 315-322.
16. Fritsch P (2013) *Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas*: Springer-Verlag.
17. Vaupel P, Mutschler E, Schaible H-G, Thews G (2007) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen: Wiss. Verlag-Ges.*
18. Herrmann K, Trinkkeller U (2007) *Dermatologie und medizinische Kosmetik* Springer.
19. Munk K, Abröhl C, Kurth T, Langer T, Nethe-Jaenchen R, et al. (2008) *Biochemie-Zellbiologie* Thieme Verlag Stuttgart.
20. Boujard D, Anselme B, Cullin C, Raguénès-Nicol C (2014) *Zell-und Molekularbiologie im Überblick* Springer-Verlag.
21. Mitchison T, Cramer L (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84: 371-379.
22. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J (2014) Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews* 94: 235-263.
23. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry* 273: 29745-29753.
24. Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nature reviews Molecular cell biology* 2: 285-293.

25. Peglion F, Llense F, Etienne-Manneville S (2014) Adherens junction treadmill during collective migration. *Nature cell biology* 16: 639-651.
26. Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (2009) *Physiologie*: Georg Thieme Verlag.
27. Boujard D, Anselm B, Cullin C, Raguénès-Nicol C (2012) *Biologie cellulaire et moléculaire, tout le cours en fiches*: Dunod.
28. Van Itallie CM, Anderson JM (2004) The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology* 19: 331-338.
29. Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286: C1213-C1228.
30. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453: 314-321.
31. Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine* 341: 738-746.
32. Schultz G (1999) Molecular regulation of wound healing. *Acute and chronic wounds: Nursing management 2nd edition* St Louis, MO: Mosby: 413-429.
33. Shaw TJ, Martin P (2009) Wound repair at a glance. *Journal of Cell Science* 122: 3209-3213.
34. Andree C, Kopp J, Stark G (2013) *Physiologie und Pathologie der Wundheilung. Forschung in der Chirurgie: Konzepte, Organisation, Schwerpunkte: Eine Bestandsaufnahme—Universitäre Einrichtungen*: 333.
35. Tarnuzzer RW, Schultz GS (1996) Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair and Regeneration* 4: 321-325.
36. Trengove NJ, Stacey MC, Macauley S, Bennett N, Gibson J, et al. (1999) Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair and Regeneration* 7: 442-452.
37. Santoro MM, Gaudino G (2005) Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research* 304: 274-286.
38. Clark RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, et al. (1982) Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *Journal of Investigative Dermatology* 79: 264-269.
39. Alberts B, Lewis J, Bray D (2000) *Molecular biology of the cell.*: Garland Science.
40. Ananthakrishnan R, Ehrlicher A (2007) The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci* 3: 303-317.
41. Baldwin M, Barbieri J (2005) The type III cytotoxins of *Yersinia* and *Pseudomonas aeruginosa* that modulate the actin cytoskeleton *Bacterial Virulence Factors and Rho GTPases*: Springer. pp. 147-166.
42. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews Molecular cell biology* 6: 56-68.
43. Kjølner L (2002) The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility. *Biological Chemistry* 383: 5-19.
44. Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O (2006) Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117: 35S-41S.
45. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM (2008) Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences* 97: 2892-2923.
46. Bowler PG (2002) Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. *Annals of Medicine* 34: 419-427.
47. Altincicek B, Linder M, Linder D, Preissner KT, Vilcinskas A (2007) Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infection and Immunity* 75: 175-183.
48. Management AEW (2005) *Positionsdokument: Aufstellung von Kriterien für Wundinfektionen*. London: MEP Ltd.
49. Barnett AB, D.; Ksander, G.A.; Vistnes, M.D. (1985) A Concentration Gradient of Bacteria within Wound Tissue and Scab.

50. Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M, Cellini L (2013) Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *International wound journal* 12: 47-52.
51. Twum-Danso KG, C.; Al-Suleiman, S.A.; Abdel-Khader, S.; Al-Awami, M.S.; Al-Breiki, S.; Taha, S.; Ashoor, A-A.; Wosornu, L. (1991) Microbiology of postoperative wound infection: a prospective study of 1770 wounds.
52. Halbert AR, Stacey MC, Rohr JB, Jopp-Mckay A (1992) The effect of bacterial colonization on venous ulcer healing. *Australasian Journal of Dermatology* 33: 75-80.
53. James GA, Swogger E, Wolcott R, Secor P, Sestrich J, et al. (2008) Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration* 16: 37-44.
54. Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, et al. (2012) A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair and Regeneration* 20: 647-657.
55. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and infection* 2: 1051-1060.
56. Stover CK, Pham XQ, Erwin A, Mizoguchi S, Warren P, et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
57. Koburger T, Hübner N-O, Braun M, Siebert J, Kramer A (2010) Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 1712-1719.
58. El Solh AA, Alhajhusain A (2009) Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64: 229-238.
59. Van Delden C, Iglewski BH (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases* 4: 551-560.
60. Matsumoto K (2004) Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biological Chemistry* 385: 1007-1016.
61. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS (2005) Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171: 1209-1223.
62. McCarty SM, Cochrane CA, Clegg PD, Percival SL (2012) The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: a focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing. *Wound repair and regeneration* 20: 125-136.
63. Schmidtchen A, Holst E, Tapper H, Björck L (2003) Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microbial pathogenesis* 34: 47-55.
64. Kon Y, Tsukada H, Hasegawa T, Igarashi K, Wada K, et al. (1999) The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 25: 313-321.
65. Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH, Hamood AN (1999) Contribution of Quorum Sensing to the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in Burn Wound Infections. *Infection and immunity* 67: 5854-5862.
66. Barrett AJ, Woessner JF, Rawlings ND (2012) *Handbook of proteolytic enzymes*: Elsevier.
67. Morihara K, Tsuzuki H, Oka T, Inoue H, Ebata M (1965) *Pseudomonas aeruginosa* elastase isolation, crystallization, and preliminary characterization. *Journal of Biological Chemistry* 240: 3295-3304.
68. Thayer M, Flaherty KM, McKay DB (1991) Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* 266: 2864-2871.
69. Adekoya OA, Sylte I (2008) The thermolysin family (M4) of enzymes: therapeutic and biotechnological potential. *Chemical biology & drug design* 73: 7-16.
70. Wretling B, Pavlovskis OR (1983) *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in pseudomonas infections. *Review of Infectious Diseases* 5: S998-S1004.
71. Heck L, Morihara K, McRae W, Miller E (1986) Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infection and Immunity* 51: 115-118.

72. Yang J, Zhao H-L, Ran L-Y, Li C-Y, Zhang X-Y, et al. (2015) Mechanistic Insights into Elastin Degradation by Pseudolysin, the Major Virulence Factor of the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports* 5: 1-7.
73. Leduc D, Beaufort N, de Bentzmann S, Rousselle J-C, Namane A, et al. (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* LasB metalloproteinase regulates the human urokinase-type plasminogen activator receptor through domain-specific endoproteolysis. *Infection and immunity* 75: 3848-3858.
74. Grinnell F, Ho C-H, Wysocki A (1992) Degradation of fibronectin and vitronectin and vitronectin in chronic wound fluid: analysis by cell blotting, immunoblotting, and cell adhesion assays. *Journal of Investigative Dermatology* 98: 410-416.
75. Beaufort N, Corvazier E, Hervieu A, Choqueux C, Dussiot M, et al. (2011) The thermolysin-like metalloproteinase and virulence factor LasB from pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* induces anoikis of human vascular cells. *Cellular microbiology* 13: 1149-1167.
76. Beaufort N, Corvazier E, Mlanaoindrou S, de Bentzmann S, Pidard D (2013) Disruption of the Endothelial Barrier by Proteases from the Bacterial Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: Implication of Matrilysin and Receptor Cleavage. *PloS one* 8: e75708.
77. de Bentzmann S, Polette M, Zahm J-M, Hinnrasky J, Kileztky C, et al. (2000) *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence Factors Delay Airway Epithelial Wound Repair by Altering the Actin Cytoskeleton and Inducing Overactivation of Epithelial Matrix Metalloproteinase-2. *Laboratory investigation* 80: 209-219.
78. Nomura K, Obata K, Keira T, Miyata R, Hirakawa S, et al. (2014) *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respiratory research* 15: 1-13.
79. Vikström E, Tafazoli F, Magnusson K-E (2006) *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3 oxododecanoyl)-l-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS letters* 580: 6921-6928.
80. Lee A, Chow D, Haus B, Tseng W, Evans D, et al. (1999) Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 277: L204-L217.
81. Supuran CT, Scozzafava A, Mastrolorenzo A (2001) Bacterial proteases: current therapeutic use and future prospects for the development of new antibiotics. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 11: 221-259.
82. Clark CA, Thomas LK, Azghani AO (2011) Inhibition of Protein Kinase C Attenuates *Pseudomonas aeruginosa* Elastase-Induced Epithelial Barrier Disruption. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45: 1263-1271.
83. Miyoshi S-i, Shinoda S (2000) Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes and infection* 2: 91-98.
84. Golovkine G, Faudry E, Bouillot S, Voulhoux R, Attrée I, et al. (2014) VE-Cadherin Cleavage by LasB Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Facilitates Type III Secretion System Toxicity in Endothelial Cells. *PLoS pathogens* 10.
85. Azghani A, Baker J, Shetty S, Miller E, Bhat G (2002) *Pseudomonas aeruginosa* elastase stimulates ERK signaling pathway and enhances IL-8 production by alveolar epithelial cells in culture. *Inflammation Research* 51: 506-510.
86. Pal B (2015) *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase Induces Restructuring of Actin Cytoskeleton by Phosphorylation of RhoA Proteins: The University of Texas at Tyler.
87. Azghani AO, Neal K, Idell S, Amaro R, Baker JW, et al. (2014) Mechanism of fibroblast inflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Microbiology* 160: 547-555.
88. Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *The FASEB journal* 9: 726-735.
89. Zohrabian VM, Forzani B, Chau Z, Murali R, Jhanwar-Uniyal M (2009) Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation. *Anticancer Research* 29: 119-123.
90. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, et al. (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and-independent mechanisms. *Science* 286: 1358-1362.

91. Parmely M, Gale A, Clabaugh M, Horvat R, Zhou W-W (1990) Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 58: 3009-3014.
92. Saulnier JM, Curtil FM, Duclos M-C, Wallach JM (1989) Elastolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 995: 285-290.
93. Schultz DR, Miller KD (1974) Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infection and Immunity* 10: 128-135.
94. Kamath S, Kapatral V, Chakrabarty A (1998) Cellular function of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis. *Molecular microbiology* 30: 933-941.
95. Travis J, Potempa J (2000) Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477: 35-50.
96. Cathcart GR, Quinn D, Greer B, Harriott P, Lynas JF, et al. (2011) Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: a potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 2670-2678.
97. Adekoya oW, N.-P.; Sylte, I. (2006) Molecular insight into pseudolysin inhibition using the MM-PBSA and LIE methods. *Journal of Structural Biology* 153: 129-144.
98. Bartlett PA, Marlowe CK (1983) Phosphoramidates as transition-state analog inhibitors of thermolysin. *Biochemistry* 22: 4618-4624.
99. Nishino N, Powers JC (1978) Peptide hydroxamic acids as inhibitors of thermolysin. *Biochemistry* 17: 2846-2850.
100. Suda H, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H (1973) A thermolysin inhibitor produced by actinomycetes: phosphoramidon. *The Journal of antibiotics* 26: 621-623.
101. Kessler E, Spierer A, Blumberg S (1983) Specific inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* elastase injected intracorneally in rabbit eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 24: 1093-1097.
102. Gi M, Jeong J, Lee K, Lee K-M, Toyofuku M, et al. (2014) A drug-repositioning screening identifies pentetic acid as a potential therapeutic agent for suppressing the elastase-mediated virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58: 7205-7214.
103. Adekoya OA, Sjøli S, Wuxiuer Y, Bilotto I, Marques SM, et al. (2015) Inhibition of pseudolysin and thermolysin by hydroxamate-based MMP inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 89: 340-348.
104. Burns F, Paterson C, Gray R, Wells J (1990) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and *Pseudomonas keratitis* using a thiol-based peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34: 2065-2069.
105. Garner AL, Struss AK, Fullagar JL, Agrawal A, Moreno AY, et al. (2012) 3-Hydroxy-1-alkyl-2-methylpyridine-4 (1 H)-thiones: Inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factor LasB. *ACS medicinal chemistry letters* 3: 668-672.
106. Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* 42: 503-509.
107. Ikeda K, Emoto N, Raharjo SB, Nurhantari Y, Saiki K, et al. (1999) Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides. *Journal of Biological Chemistry* 274: 32469-32477.
108. McMahon EG, Palomo MA, Brown MA, Bertenshaw SR, Carter JS (1993) Effect of phosphoramidon (endothelin converting enzyme inhibitor) and BQ-123 (endothelin receptor subtype A antagonist) on blood pressure in hypertensive rats. *American Journal of Hypertension* 6: 667-673.
109. Kukkola PJ, Savage P, Sakane Y, Berry JC, Bilci NA, et al. (1995) Differential structure-activity relationships of phosphoramidon analogues for inhibition of three metalloproteases: endothelin-converting enzyme, neutral endopeptidase, and angiotensin-converting enzyme. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 26: S65-68.

110. Wedde M, Weise C, Kopacek P, Franke P, Vilcinskas A (1998) Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *European Journal of Biochemistry* 255: 535-543.
111. Vilcinskas A, Wedde M (2002) Insect inhibitors of Metalloproteinases. *IUBMB Life* 54: 339-343.
112. Wedde M, Weise C, Nuck R, Altincicek B, Vilcinskas A (2007) The insect metalloproteinase inhibitor gene of the lepidopteran *Galleria mellonella* encodes two distinct inhibitors. *Biological chemistry* 388: 119-127.
113. Arolas JL, Botelho TO, Vilcinskas A, Gomis-Rüth FX (2011) Structural Evidence for Standard-Mechanism Inhibition in Metallopeptidases from a Complex Poised to Resynthesize a Peptide Bond. *Angewandte Chemie* 123: 10541-10544.
114. Coutinho HDM, Lobo KM, Bezerra DAC, Lobo I (2008) Peptides and proteins with antimicrobial activity. *Indian journal of pharmacology* 40: 3-9.
115. Vilcinskas A (2011) Anti-Infective therapeutics from the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Current pharmaceutical design* 17: 1240-1245.
116. Coutinho (2008) Peptides and proteins with antimicrobial activity.
117. Cullum N, Majid M, Sheldon T (2000) Systematic review of wound care management: antimicrobial agents, diabetic foot ulceration. *Health Technology Assessment* 4: 21.
118. Cullum N, Nelson E, Flemming K, Sheldon T (2001) Systematic reviews of wound care management:(5) beds;(6) compression;(7) laser therapy, therapeutic ultrasound, electrotherapy and electromagnetic therapy.
119. Agom DA, Agom JD, Anyigor C (2014) Using Maggot Therapy in Treatment of Wounds: A Review of Its Effectiveness and Patients' Experiences. *Journal of Medical Science And Clinical Research* 2: 2749-2760.
120. Hutchinson J, Lawrence J (1991) Wound infection under occlusive dressings. *Journal of Hospital Infection* 17: 83-94.
121. Forrest RD (1982) Early history of wound treatment. *Journal of the Royal Society of Medicine* 75: 198.
122. Qiu B, Stefanos S, Ma J, Laloo A, Perry B, et al. (2003) A hydrogel prepared by in situ cross-linking of a thiol-containing poly(ethylene glycol)-based copolymer: a new biomaterial for protein drug delivery. *Biomaterials* 24: 11-18.
123. Beynon T, Laverty D, Baxter A, Forsey P, Grocott P (2003) Lutrol gel: A potential role in wounds? *Journal of Pain and Symptom Management* 26: 776-780.
124. Kopeček J (2003) Smart and genetically engineered biomaterials and drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 20: 1-16.
125. Ito T, Fraser IP, Yeo Y, Highley CB, Bellas E, et al. (2007) Anti-inflammatory function of an *in situ* cross-linkable conjugate hydrogel of hyaluronic acid and dexamethasone. *Biomaterials* 28: 1778-1786.
126. Gong C, Shi S, Wu L, Gou M, Yin Q, et al. (2009) Biodegradable in situ gel-forming controlled drug delivery system based on thermosensitive PCL-PEG-PCL hydrogel. Part 2: Sol-gel-sol transition and drug delivery behavior. *Acta Biomaterialia* 5: 3358-3370.
127. Ruel-Gariépy E, Leroux J-C (2004) In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58: 409-426.
128. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC (2006) A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical research* 23: 2709-2728.
129. Schmolka IR (1972) Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *Journal of biomedical materials research* 6: 571-582.
130. Faulkner DM (1997) A New Stable Pluronic ® F68 Gel Carrier for Antibiotics in Contaminated Wound Treatment. *American Journal of Emergency Medicine* 15: 20-24.
131. Du L, Tong L, Jin Y, Jia J, Liu Y, et al. (2012) A multifunctional in situ-forming hydrogel for wound healing. *Wound repair and regeneration* 20: 904-910.
132. Nalbandian RM, Henry RL, Balko KW, Adams DV, Neuman NR (1987) Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs. *Journal of biomedical materials research* 21: 1135-1148.

133. Abashzadeh S, Dinarvand R, Sharifzadeh M, Hassanzadeh G, Amini M, et al. (2011) Formulation and evaluation of an in situ gel forming system for controlled delivery of triptorelin acetate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 44: 514-521.
134. Bromberg LE, Ron ES (1998) Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Advanced drug delivery reviews* 31: 197-221.
135. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T (1999) Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. *International Journal of Pharmaceutics* 184: 189-198.
136. Escobar-Chávez J, López-Cervantes M, Naik A, Kalia Y, Quintanar-Guerrero D, et al. (2006) Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharmaceut Sci* 9: 339-358.
137. Wedler G, Freund H-J (2012) *Lehrbuch der physikalischen Chemie*: John Wiley & Sons.
138. Steudel R (2014) *Chemie der Nichtmetalle: Synthesen-Strukturen-Bindung-Verwendung*: Walter de Gruyter.
139. Winter H (1987) Can the gel point of a cross-linking polymer be detected by the G' - G'' crossover? *Polymer Engineering & Science* 27: 1698-1702.
140. Eriksson K, Belew M (1998) *Hydrophobic interaction chromatography. Protein purification: Principles High-Resolution Methods and Applications* New York: 283-309.
141. Brandner JH, P.; Moll,I.; Siemann-Harms, Uta (2004) *Ex-vivo-hautorganmodell aus Schweinehaut*. Patent WO2004092726 A1.
142. Gilbert JC, Richardson JL, Davies MC, Palin KJ, Hadgraft J (1987) The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solutions for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release* 5: 113-118.
143. Viglio S, Zanaboni G, Lupi A, Gianelli L, Luisetti M, et al. (1999) Micellar electrokinetic chromatography for analyzing active site specificity of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Electrophoresis* 20: 1578-1585.
144. Xie Y, Rizzi SC, Dawson R, Lynam E, Richards S, et al. (2010) Development of a three-dimensional human skin equivalent wound model for investigating novel wound healing therapies. *Tissue Engineering Part C: Methods* 16: 1111-1123.
145. Wei G, Xu H, Ding PT, Li SM, Zheng JM (2002) Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. *Journal of Controlled Release* 83: 65-74.
146. Gilabert M, Marcinkevicius K, Andujar S, Schiavone M, Arena M, et al. (2015) Sesqui- and triterpenoids from the liverwort *Lepidozia chordulifera* inhibitors of bacterial biofilm and elastase activity of human pathogenic bacteria. *Phytomedicine* 22: 77-85.
147. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, et al. (2010) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology* 300: 534-543.
148. Caballero AR, Moreau JM, Engel LS, Marquart ME, Hill JM, et al. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Analytical Biochemistry* 290: 330-337.
149. Döring G, Høiby N (1983) Longitudinal study of immune response to *Pseudomonas aeruginosa* antigens in cystic fibrosis. *Infection and immunity* 42: 197-201.
150. Azghani A, Bedinghaus T, Klein R (2000) Detection of elastase from *Pseudomonas aeruginosa* in sputum and its potential role in epithelial cell permeability. *Lung* 178: 181-189.
151. Nagano T, Hao J-L, Nakamura M, Kumagai N, Abe M, et al. (2001) Stimulatory effect of pseudomonal elastase on collagen degradation by cultured keratocytes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 42: 1247-1253.
152. Azghani AO (1996) *Pseudomonas aeruginosa* and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 15: 132-140.
153. Rocha CL, Coburn J, Rucks EA, Olson JC (2003) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A. 1 macrophages. *Infection and Immunity* 71: 5296-5305.

154. Di Grazia A, Cappiello F, Imanishi A, Mastrofrancesco A, Picardo M, et al. (2015) The Frog Skin-Derived Antimicrobial Peptide Esculentin-1a (1-21) NH₂ Promotes the Migration of Human HaCaT Keratinocytes in an EGF Receptor-Dependent Manner: A Novel Promoter of Human Skin Wound Healing? *PloS one* 10: 1-20.
155. Marano RJ, Wallace HJ, Wijeratne D, Fear MW, San Wong H, et al. (2015) Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses in vitro. *Scientific reports* 5: 1-11.
156. Jacobsen JN, Andersen AS, Krogfelt KA (2012) Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on cellular wound healing responses in vitro. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 44: 615-619.
157. Meyer W (1996) Bemerkungen zur Eignung der Schweinehaut als biologisches Modell für die Haut des Menschen. *Der Hautarzt* 47: 178-182.
158. Kanikkannan N, Patel R, Jackson T, Shaik MS, Singh M (2001) Percutaneous absorption and skin irritation of JP-8 (jet fuel). *Toxicology* 161: 1-11.
159. Ansell DM, Holden KA, Hardman MJ (2012) Animal models of wound repair: Are they cutting it? *Experimental dermatology* 21: 581-585.
160. Rijnkels JM, Whiteley LO, Beijersbergen van Henegouwen GM (2001) Time and Dose-related Ultraviolet B Damage in Viable Pig Skin Explants Held in a Newly Developed Organ Culture System *Photochemistry and photobiology* 73: 499-504.
161. Falanga V (2004) The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 32: 88-94.
162. Pastar I, Nusbaum AG, Gil J, Patel SB, Chen J, et al. (2013) Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS One* 8: e56846.
163. Pec E, Wout Z, Johnston T (1992) Biological activity of urease formulated in poloxamer 407 after intraperitoneal injection in the rat. *Journal of pharmaceutical sciences* 81: 626-630.
164. Hubbell JA (1996) Hydrogel systems for barriers and local drug delivery in the control of wound healing. *Journal of Controlled Release* 39: 305-313.
165. Miller SC, Drabik BR (1984) Rheological properties of poloxamer vehicles. *International Journal of Pharmaceutics* 18: 269-276.
166. Cabana A, Ait-Kadi A, Juhasz J (1997) Study of the gelation process of polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide copolymer (Poloxamer 407) aqueous solutions. *Journal of colloid and interface science* 190: 307-312.
167. Pisal SS, Paradkar AR, Mahadik KR, Kadam SS (2004) Pluronic gels for nasal delivery of Vitamin B₁₂. Part I: Preformulation study. *International Journal of Pharmaceutics* 270: 37-45.
168. Tung I (1994) Rheological behavior of poloxamer 407 aqueous solutions during sol-gel and dehydration processes. *International Journal of Pharmaceutics* 107: 85-90.
169. Ricci E, Bentley M, Farah M, Bretas R, Marchetti J (2002) Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 17: 161-167.
170. Mayol L, Quaglia F, Borzacchiello A, Ambrosio L, Rotonda M (2007) A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70: 199-206.
171. Grüning N, Müller-Goymann CC (2008) Physicochemical characterisation of a novel thermogelling formulation for percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid. *Journal of pharmaceutical sciences* 97: 2311-2323.
172. Heilmann S, Kuchler S, Wischke C, Lendlein A, Stein C, et al. (2013) A Thermosensitive Morphine-Containing Hydrogel for the Treatment of Large-Scale Skin Wounds. *International Journal of Pharmaceutics*.
173. Xuan J, Balakrishnan P, Oh D, Yeo E, Park S, et al. (2010) Rheological characterization and in vivo evaluation of thermosensitive poloxamer-based hydrogel for intramuscular injection of piroxicam. *International Journal of Pharmaceutics* 395: 317-323.

174. Chen J, Zhou R, Li L, Li B, Zhang X, et al. (2013) Mechanical, Rheological and Release Behaviors of a Poloxamer 407/Poloxamer 188/Carbopol 940 Thermosensitive Composite Hydrogel. *Molecules* 18: 12415-12425.
175. Chirio D, Trotta M, Gallarate M, Peira E, Carlotti M (2011) Thermosensitive Gels for the Topical Administration of Diltiazem. *Journal of Dispersion Science and Technology* 32: 320-325.
176. Liu Y, Lu W-L, Wang J-C, Zhang X, Zhang H, et al. (2007) Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermo-sensitive Pluronic® F127 hydrogel for subcutaneous administration: In vitro and in vivo characterization. *Journal of Controlled Release* 117: 387-395.
177. Edsman K, Carlfors J, Petersson R (1998) Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 6: 105-112.
178. Mezger TG (2006) *Das Rheologie Handbuch Vincentz Network Coatings Compendien*. 334 p.
179. Baloglu E, Karavana SY, Senyigit ZA, Guneri T (2011) Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. *Pharmaceutical Development and Technology* 16: 627-636.
180. Veyries M, Couarraze G, Geiger S, Agnely F, Massias L, et al. (1999) Controlled release of vancomycin from Poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics* 192: 183-193.
181. Seo HJ, Kim J-C (2012) Effects of additives on phase transitions of Poloxamer 407/Poloxamer 188 mixture and release property of monoolein cubic phase containing the poloxamers. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18: 88-91.
182. Cho K, Chung T, Kim B, Kim M, Lee J, et al. (2002) Release of ciprofloxacin from poloxamer-graft-hyaluronic acid hydrogels in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* 260: 83-91.
183. Prestwich G, Vercruyse K (1998) Therapeutic applications of hyaluronic acid and hyaluronan derivatives. *PSTT* 1: 42-43.
184. Pandit N, Wang D (1998) Salt effects on the diffusion and release rate of propranolol from poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics* 167: 183-189.
185. Schneider LA, Korber A, Grabbe S, Dissemond J (2007) Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? *Archives of dermatological research* 298: 413-420.
186. Diegelmann RF, Evans MC (2004) Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 9: 283-289.
187. Zhang L, Parsons DL, Navarre C, Kompella UB (2002) Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. *Journal of Controlled Release* 85: 73-81.
188. Hiwale P, Lampis S, Conti G, Caddeo C, Murgia S, et al. (2011) In vitro release of lysozyme from gelatin microspheres: effect of cross-linking agents and thermoreversible gel as suspending medium. *Biomacromolecules* 12: 3186-3193.
189. Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182: 311-322.
190. Kratz G (1998) Modeling of wound healing processes in human skin using tissue culture. *Microscopy Research and Technique* 42: 345-350.
191. Moll I, Houdek P, Schmidt H, Moll R (1998) Characterization of Epidermal Wound Healing in a Human Skin Organ Culture Model: Acceleration by Transplanted Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 111: 251-258.
192. Miyoshi S-i, Okamoto K, Takahashi E (2004) *Handbook of Proteolytic Ezymes*. In: Salvesen NDRGS, editor. 3 ed.
193. Ohnemus U, Kohrmeyer K, Houdek P, Rohde H, Wladykowski E, et al. (2007) Regulation of epidermal tight-junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative *Staphylococcus* strains. *Journal of Investigative Dermatology* 128: 906-916.
194. Laarman AJ, Ruyken M, Malone CL, van Strijp JA, Horswill AR, et al. (2011) *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *The Journal of Immunology* 186: 6445-6453.
195. Döring G, Goldstein W, Röhl A, Schiøtz P, Høiby N, et al. (1985) Role of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzymes in lung infections of patients with cystic fibrosis. *Infection and Immunity* 49: 557-562.

Anhang

I. Kalibriergerade IMPI-GST

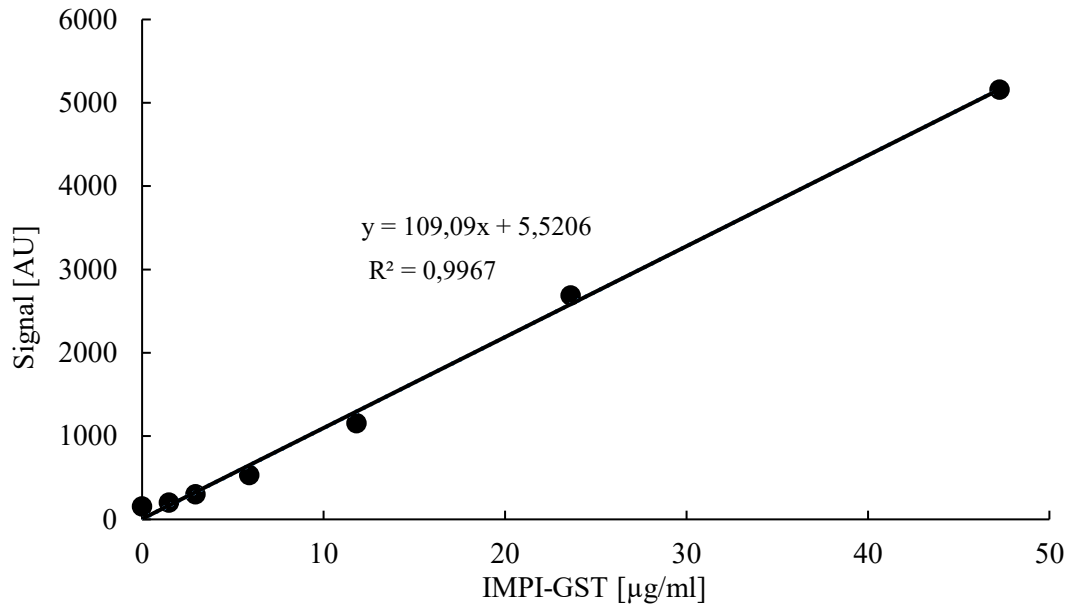


Abbildung I: Kalibriergerade von IMPI-GST. Die Konzentration von IMPI-GST wurde mittels HPLC-Analytik bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind $MW \pm SD$ ($n=3$) mit linearem Fit, deren Steigung und Bestimmtheitsmaß im Diagramm angegeben sind.

II. Kalibriergerade PE

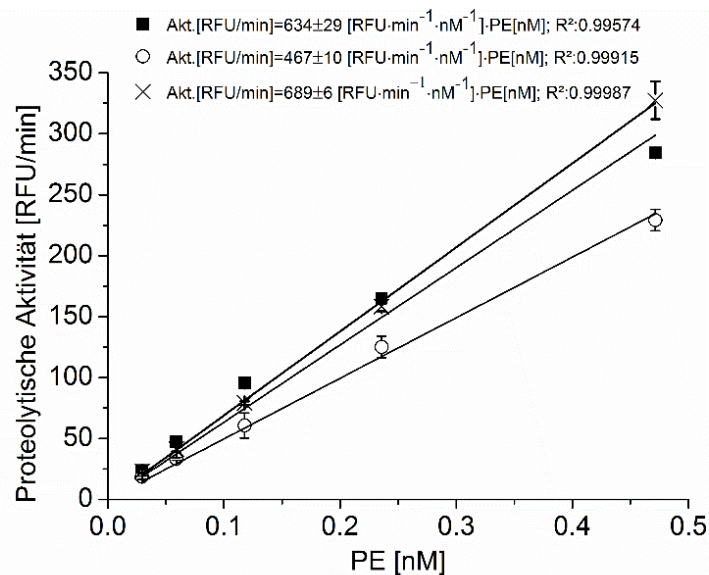


Abbildung II: Kalibriergeraden der proteolytischen Aktivität von Pseudomonas Elastase (PE). Die proteolytische Aktivität unterschiedlicher PE Konzentrationen wurde in einem Fluoreszenz-Quenching-Test mit dem Peptid Substrat Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind $MW \pm SD$ ($n=3$) mit linearem Fit, deren Steigung und Bestimmtheitsmaß im Diagramm angegeben sind.

III. IMPI-GST nach 7 Monaten Lagerung

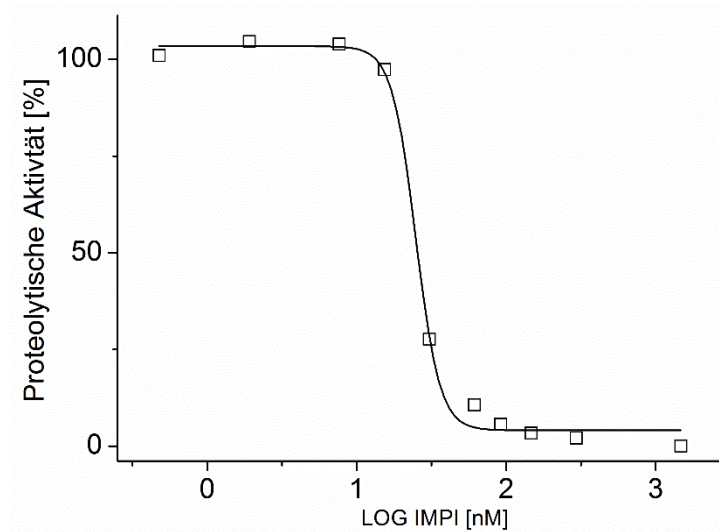


Abbildung III: Proteolytische Aktivität von IMPI-GST nach 7 Monaten Lagerung. Dargestellt ist der Fit des Sigmoids der proteolytischen Aktivität von Thermolysin (9 nM) in % der Kontrolle (ohne Inhibitor) über der IMPI-GST-Konzentration nach 7 Monaten Lagerung bei 4° C.

IV. Auswirkungen von FKS und Medium

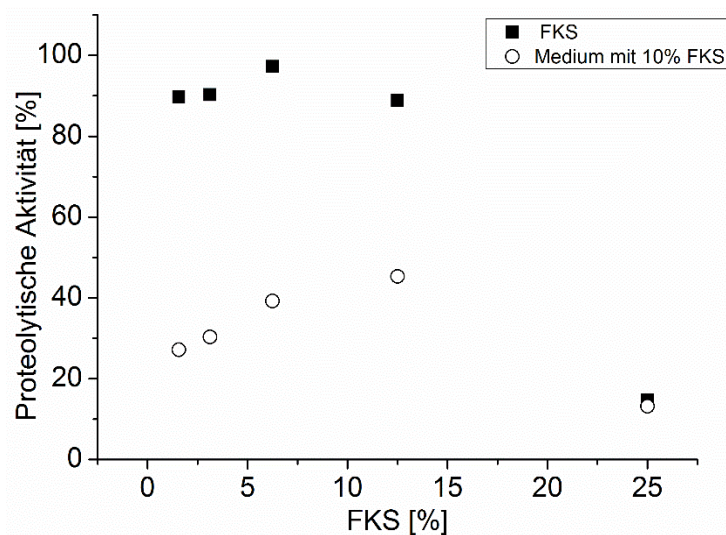


Abbildung IV: Proteolytische Aktivität des Sekretoms in Abhängigkeit von FKS- und Wachstumsmedium. Die proteolytische Aktivität von 14% Sek wurde in einem Fluoreszenz-Quenching-Test mit FITC-Casein (1 µg) als Kontrolle (100%) definiert. Dargestellt sind die relativen Messwerte in Abhängigkeit der zugesetzten FKS- und Mediumskonzentration pro Well (n=1).

V. Wachstumskurve der HaCaT-Zellen

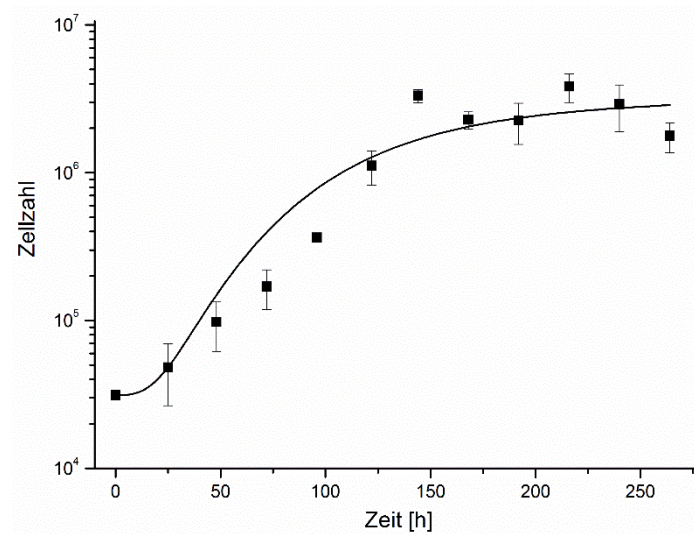


Abbildung V: Wachstumskurve der HaCaT-Zelllinie Aufgenommen wurde die Wachstumskurve über einen Zeitraum von 11 Tagen.

VI. Zytotoxizitätsuntersuchung von IMPI-GST und PA

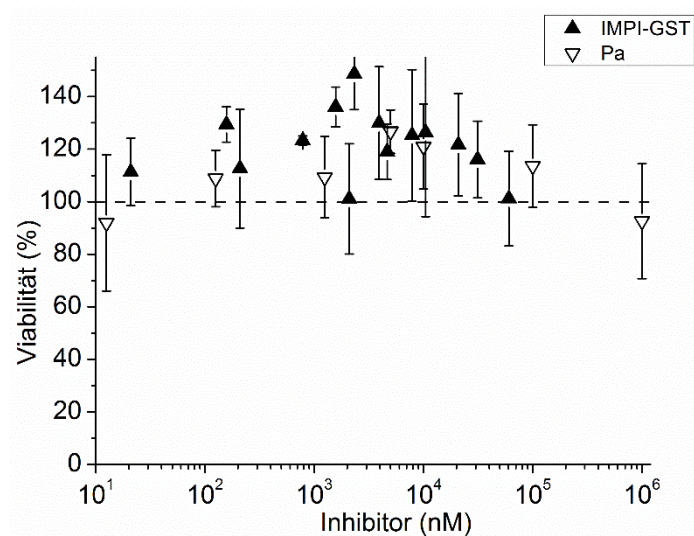


Abbildung VI: Zellviabilität nach der Behandlung mit IMPI-GST oder PA. Konfluente HaCaT-Kulturen wurden 2 h mit verschiedenen IMPI-GST- oder PA-Konzentrationen inkubiert. Dargestellt sind die MW \pm SD, relativ zur unbehandelten Kontrolle (n=3 Messungen mit je 3 Replikaten).

VII. Auswertung des Zellmigrationstests

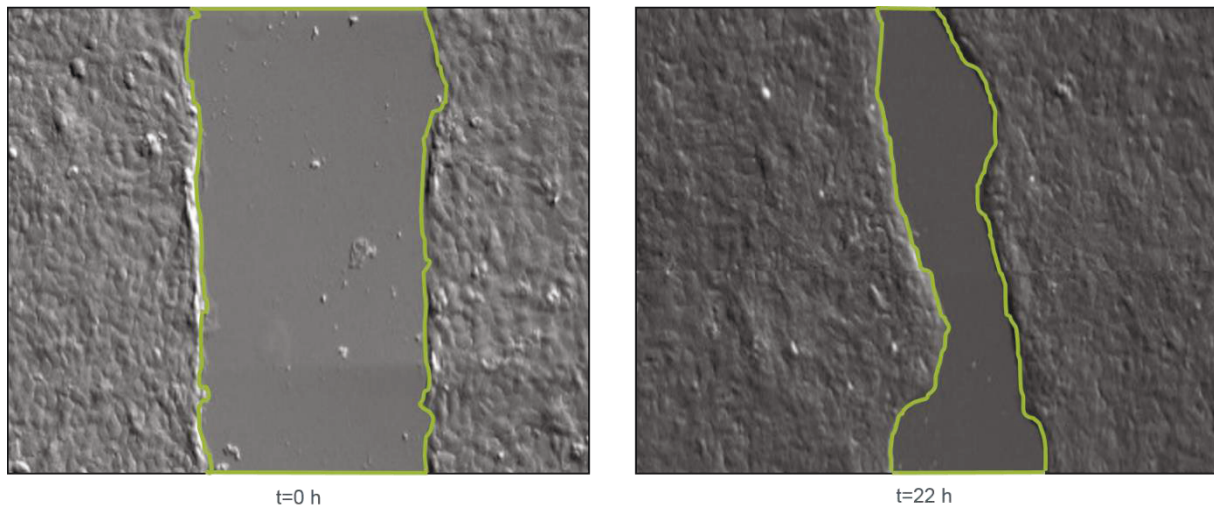


Abbildung VII: Auswertung des Zellmigrationstests. Beim Startpunkt (links) der Messung, sowie rechts nach 22 h Inkubation wurden jeweils die zellfreien Flächen mit der Software LAF markiert und berechnet.

VIII. Vergleich der Zellmigrations-Methoden

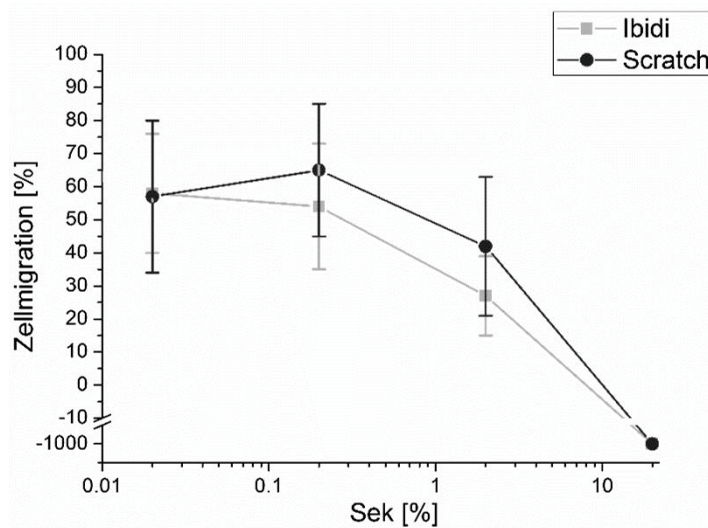


Abbildung VIII: Vergleich der Methoden zur Bestimmung der Zellmigration. Dargestellt ist die Zellmigration in % in Abhängigkeit der eingesetzten Sekretom-Konzentration mit unterschiedlichen Methoden bestimmt: dem klassische Scratch-Assay mit 10 μ l Pipettenspitze (rot) und im Ibidi[®]-System (grün). Der Scratch-Assay wurde mit 1 ml einer $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml HaCaT-Suspension in Wachstumsmedium in einer für adhärenes Zellwachstum geeigneten 24-Wellplatte durchgeführt. In die Mitte des konfluente Zellrasens wurde mit einer 10 μ l Pipettenspitze ein Riss gesetzt. Die abgelösten Zellen wurden abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Sekretom in Wachstumsmedium appliziert und 22 h inkubiert. Die zusammengewachsene Fläche wurde ebenso bestimmt wie bei dem Ibidi[®]-System (3.2.3) und darüber die Zellmigration bestimmt.

IX. Amplituden-Sweep-Messung

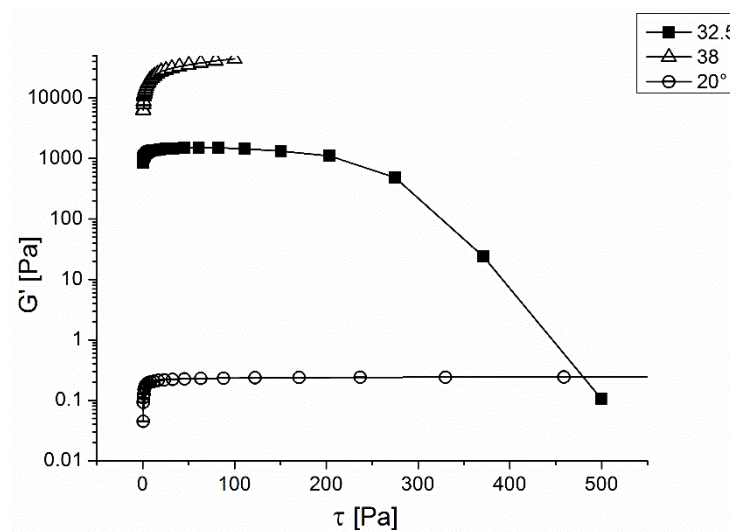


Abbildung IX: Beispiele von Amplituden-Sweep-Messungen von unterschiedlichen Gelen. Dargestellt ist das Elastische Modul über der Schubspannung. Die oszillatorisch-rheologischen Messungen wurden bei $\omega=0,5$ Hz und verschiedenen Temperaturen durchgeführt.

X. Frequenz-Sweep-Messung

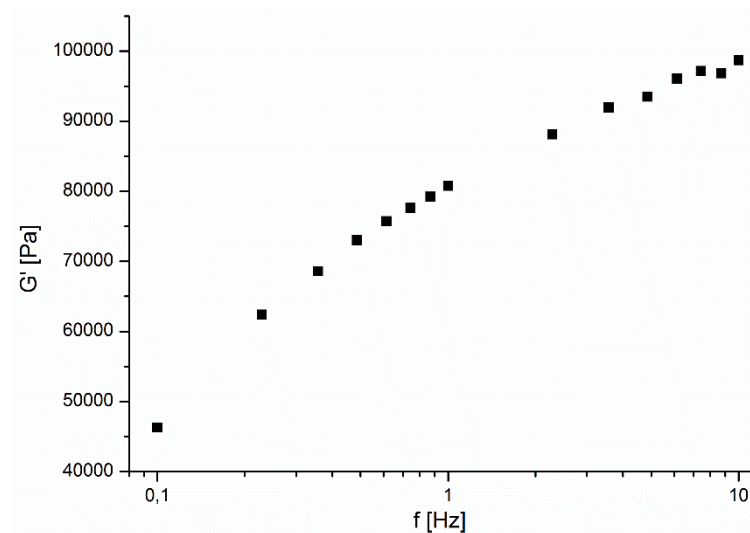


Abbildung X: Beispiel einer Frequenz-Sweep-Messung eines P407 Hydrogels. Dargestellt ist das Elastische Modul über der Frequenz. Die oszillatorisch-rheologischen Messungen wurden bei $\tau=50$ Pa und 32° C durchgeführt.

XI. Vergleich der Methoden zur Bestimmung von T_{gel}

Tabelle I: Bestimmung von T_{gel} mittels Tube-Inversion oder Rheometer

P407 [%]	P188 [%]	T [° C] Rheometer	T [° C] Tube-Inversion
23,0432	0	17,9	25
15	1,667	33,79	40,5
23,0432	0	19,47	25
15,4288	18,5947	30,26	36,5
22,361	11,8678	26,78	25
22,8517	17,1483	19,01	25
22,8517	17,1483	20,63	25
15	12,667	34,86	40,5
21,9867	6,20641	27,28	25
21,9867	6,20641	27,57	25
15	25	25,34	31,3
15	25	25,03	31,3
15,625	6,14837	38,31	40,5

XII. Einfluss von Glycerin auf die Rheologie des P407-Hydrogels

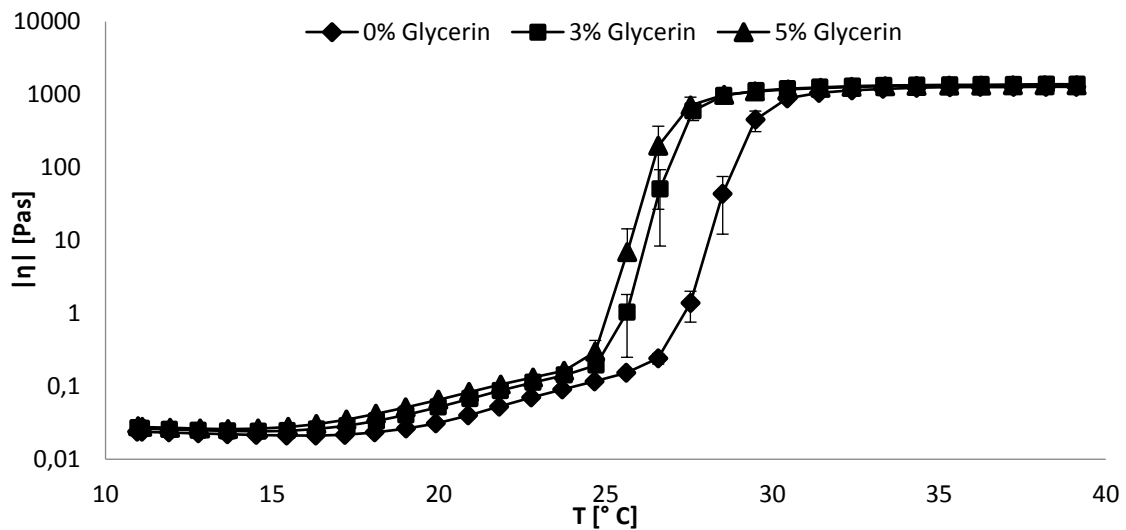


Abbildung XI: Einfluss von Glycerin auf die dynamische Viskosität eines 16% P407 Hydrogels. Die dynamische Viskosität wurde in einem Temperatur-Sweep im Oszillationsmodus mit $\tau=50$ Pa und $\omega=0,5$ Hz gemessen.

XIII. Einfluss von PEG auf die Rheologie des P407-Hydrogels

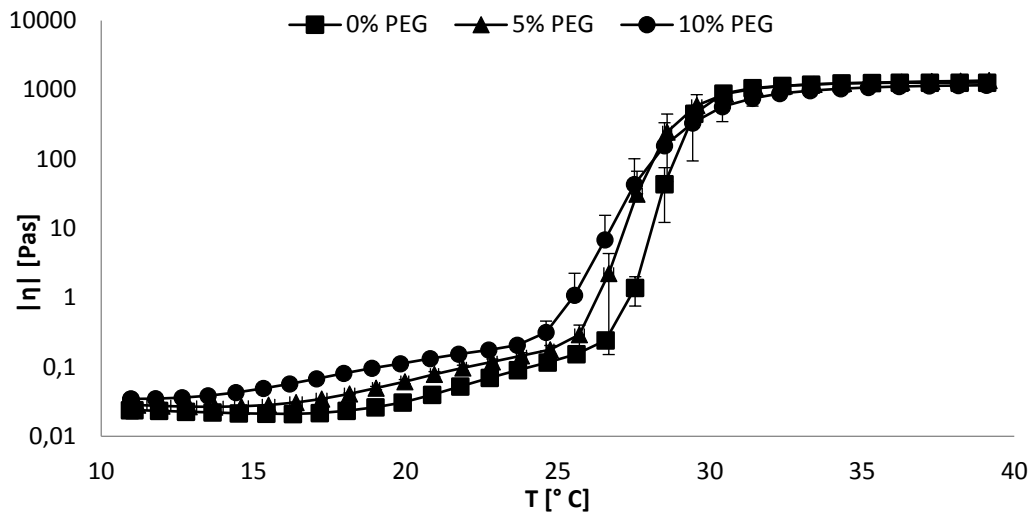


Abbildung XII: Einfluss von PEG 300/400 (1:1) auf die dynamische Viskosität eines 16% P407 Hydrogels. Die dynamische Viskosität wurde in einem Temperatur-Sweep im Oszillationsmodus mit $\tau=50$ Pa und $\omega=0,5$ Hz gemessen.

XIV. Kalibrierung der IC_{80} -Werte für IMPI-GST gegen das Sekretom von *P. aeruginosa*

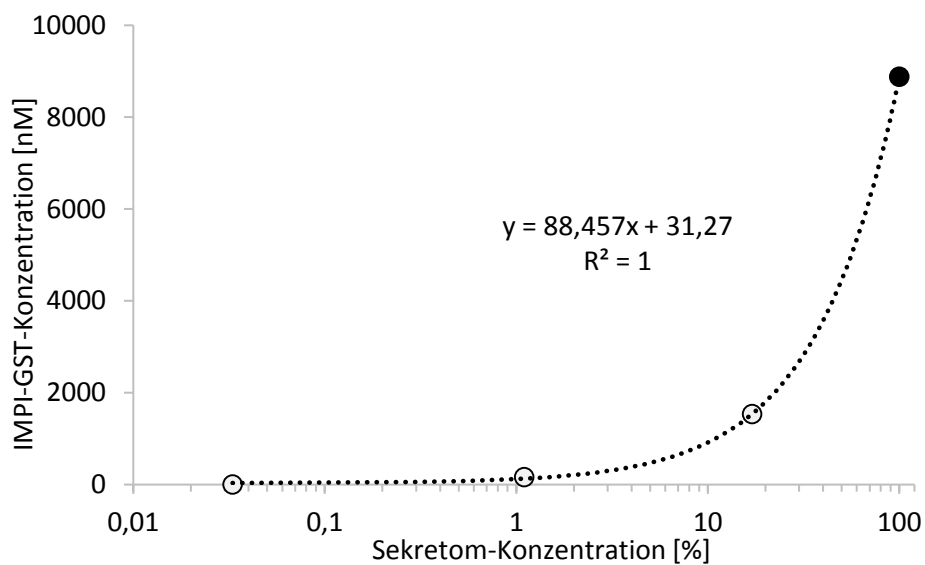


Abbildung XIII: Kalibriergerade der IC_{80} -Werte von IMPI-GST gegen das Sekretom. Dargestellt sind die gemessenen IMPI-GST-Konzentrationen in nM über der Sekretom-Konzentration (0,033%; 1,1%; 17%). Über die lineare Ausgleichsgerade wurde der IC_{80} -Wert bei 100% Sekretom (\bullet) angegeben.

XV. Einfluss der Proteine auf die Rheologie des Hydrogels

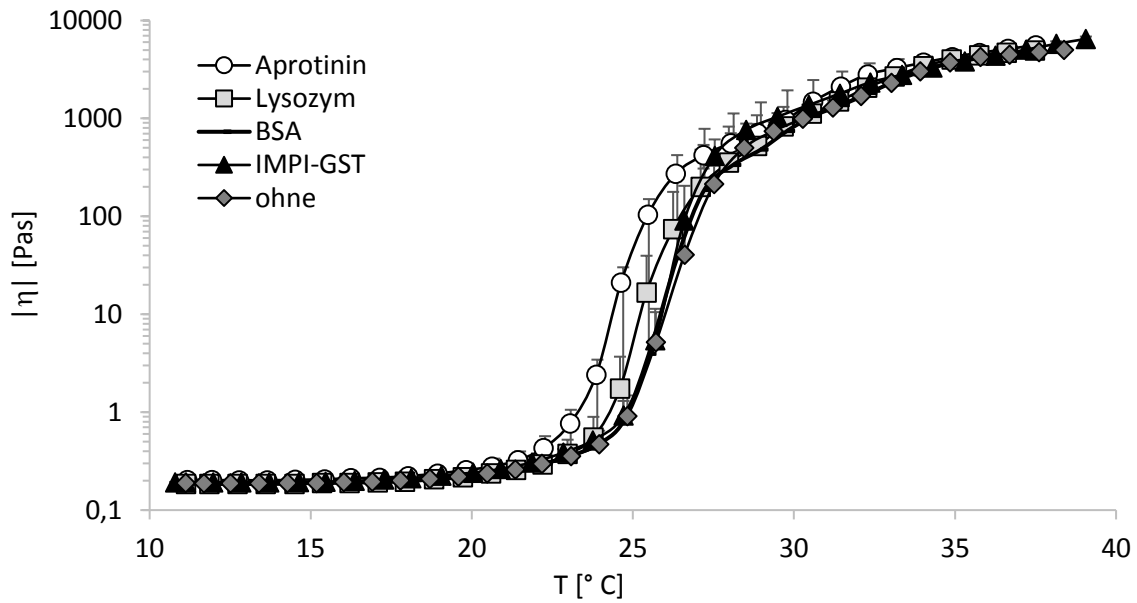


Abbildung XIV: Einfluss diverser Proteine auf die dynamische Viskosität eines Poloxamer-Hydrogels. Die dynamische Viskosität eines 16% w/w P407, 15% w/w P188, 3% w/w Glycerin, 0,2% w/w Kaliumsorbat, 0,1% w/w Zitronensäure in Aqua purificata ad 100 mit 13,5 μ M Aprotinin; Lysozym; BSA oder IMPI-GST wurden in einem Temperatur-Sweep im Oszillationsmodus mit $\tau=50$ Pa und $\omega=0,5$ Hz gemessen (MW \pm SD von mind. 2 unterschiedlichen Gelen, jeweils in 3-fach Bestimmung gemessen).

XVI. Ergebnisse des Keimbelastungstests

Tabelle II: Keimbelastungstests des Hydrogels mit Phenoxyethanol/Parbenen.

Versuchs-Dauer		Staphylococ. aureus	Escherichia coli	Pseudomon. aeruginosa	Candida albicans	Aspergillus brasiliensis
Ausgangsbelastung	KBE/g Probe	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$
1. Woche	KBE/g Probe	4960	3060	3570	1700	2480
	Reduktion %	99,8	99,8	99,7	98,3	94,9
	Zunahme %	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,03

Tabelle III: Keimbelastungstests des Hydrogels mit Kaliumsorbat / Zitronensäure

Versuchs-Dauer		Staphylococ. Aureus	Escherichia coli	Pseudomon. aeruginosa	Candida albicans	Aspergillus brasiliensis
Ausgangsbelastung	KBE/g Probe	$2,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$
1. Woche	KBE/g Probe	740	890	0	0	6
	Reduktion %	>99,9	>99,9	>99,9	> 99,9	> 99,9
	Zunahme %	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,03
2. Woche	KBE/g Probe	0	0	0	0	0
	Reduktion %	>99,9	>99,9	>99,9	> 99,9	> 99,9
	Zunahme %	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,03
3. Woche	KBE/g Probe	0	0	0	0	0
	Reduktion %	>99,9	>99,9	>99,9	> 99,9	> 99,9
	Zunahme %	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,03
4. Woche	KBE/g Probe	0	0	0	0	0
	Reduktion %	>99,9	>99,9	>99,9	> 99,9	> 99,9
	Zunahme %	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,03

Lebenslauf

Danksagung

Die Arbeit wurde an der Technischen Hochschule Mittelhessen, dem Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie, angefertigt. Daher möchte ich mich zuerst für die finanzielle Unterstützung, die Bereitstellung von Laboren, Geräten und Materialien (selbst in schwierigen Situationen) und die Möglichkeit an Konferenzen (insbesondere der Gordon Research Conference) teilnehmen zu können, bedanken. Ebenso danke ich dem LOEWE Zentrum für Insektenbiotechnologie für die Finanzierung und Bereitstellung des Themas. Ohne die Kooperation des LOEWE Zentrums, insbesondere durch Herrn Prof. Dr. Andreas Vilcinskas, der IMPI entdeckt und erforscht hat, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Zuerst bei Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen für seine Bereitschaft mich als externe Doktorandin über die Philipps-Universität Marburg zu promovieren und mich in seiner Arbeitsgruppe zu betreuen. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Frank Runkel für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können sowie für seine Unterstützung und Förderung. Sein Vertrauen und die vielen Freiheiten, die mir geboten wurden, haben maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen.

Weiterer Dank gilt der AG Czermak für die Produktion von IMPI. Dabei hervorheben möchte ich Hagen Müller, Christine Schreiber und hauptsächlich Daniel Hoffmann. Frau Dr. Denise Salzig danke ich für die konstruktiven, wissenschaftlichen und privaten Gespräche. Bei Mark Salzig vom Fraunhofer IME bedanke ich mich für die Hilfestellung in Bezug auf den Protease-Assay sowie bei Frau Dr. Anne Pöppel für die Herstellung des Sekretoms und die sehr gute Zusammenarbeit. Der Metzgerei Manz in Hüttenberg danke ich für die freundliche Bereitstellung der Schweineohren und dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt, für die Nutzung der Labore und Geräte zur Anfertigung der Gewebe-Schnitte.

Allen Mitgliedern der AG Runkel danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima, die unzähligen Hilfestellungen und den wissenschaftlichen Austausch. Besonderer Dank gilt:

- Frau Dr. Peggy Schlupp, die mich wissenschaftlich in der Zellkultur betreut, mich zu jeder Zeit beraten und stets gewissenhaft korrigiert hat.
- Frau Dr. Dorota Dobler für die wissenschaftliche Unterstützung in der Galenik.
- Herrn Dr. Thomas Schmidts für seine Unterstützung.

- Frau Dr. Christina Zinecker für die unkomplizierte administrative Betreuung.
- Den Bacheloranten Azemina Hankiç und vor Allem Jacqueline Platzek und Axel Pössl für die erworbenen Ergebnisse und die sehr gute Zusammenarbeit.
- Sebastian Beer für seine Hilfe beim Mikroskopieren, aber besonders für den fachlichen, wie privaten Austausch und die schöne gemeinsame Zeit.
- Ekaterini Ntanos für die Zusammenarbeit in der Zellkultur.
- Frank Höfer für seine Hilfe an der HPLC und die stets gute Laune,
- sowie allen anderen Doktoranden: Kay Marquardt, Christopher Sack und der besten Bäckerin Anna Eicher für die hilfreichen, konstruktiven und lustigen Kaffee-Pausen und die gute Zeit!

Zusätzlich möchte ich Hannah Schäfer für die gewissenhafte Korrektur danken. Die Abende mit ihr und Christin Reuter haben mich immer aufgebaut und emotional unterstützt.

Im größten Maße danke ich Jörg, der vor Allem im letzten Jahr viel ertragen, mich immer unterstützt und stets motiviert hat. Ohne sein Verständnis, seine Kritik und seinen Rückhalt wäre mir diese Arbeit sehr viel schwerer gefallen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung erst ermöglicht und mich immer unterstützt haben. Obwohl mein Vater meine Promotion nicht mehr miterleben konnte, wäre sie ohne ihn nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Der Insekten-Metalloprotease-Inhibitor IMPI zur Therapie von Wundinfektionen - Präklinische Untersuchungen und Formulierungsdesign“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 27.04.2015



Michaela Eisenhardt