



**Untersuchung toxikologischer Effekte von Penicillin G
auf das initiale Lymphgefäßsystem und
auf die Epithelregeneration der humanen Haut**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Ingrid Hünerbein

geb. am: 2. Juni 1977 in: Naumburg (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Neubert
2. Prof. Dr. W. C. Marsch
3. Prof. Dr. C. S. Leopold

Halle, 29. April 2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung und Zielstellung | 1 |
| 2. Theoretische Grundlagen | 4 |
| 2.1 Lymphgefäßsystem | 4 |
| 2.2 Lymphangiogenese | 5 |
| 2.3 Marker für Lymphendothelzellen | 7 |
| 2.3.1 Lymphendothelzell-spezifischer Marker LYVE-1 | 7 |
| 2.3.2 Lymphendothelzell-spezifischer Marker Podoplanin (gp36) | 8 |
| 2.3.3 Lymphendothelzell-spezifischer Marker Prox-1 | 9 |
| 2.4 Lymphödem | 9 |
| 2.5 Erysipel und sein Erreger: Streptococcus pyogenes | 10 |
| 2.6 Penicillin G und Therapie des Erysipels | 11 |
| 2.7 Chorioallantoismembran als Modell (HET-CAM-Modell) | 12 |
| 2.8 HaCaT-Zelllinie im Wundheilungsmodell | 13 |
| 3. Material und Methoden | 15 |
| 3.1 Material | 15 |
| 3.1.1 Antikörper | 15 |
| 3.1.2 Chemikalien | 15 |
| 3.1.3 Lösungen | 18 |
| 3.1.4 Geräte | 19 |
| 3.1.5 Verbrauchsmaterial | 21 |
| 3.2 Methoden | 23 |
| 3.2.1 Auswahl lymphspezifischer Antikörper – Immunhistochemische Färbung (ABC-Methode) | 23 |
| 3.2.2 HET-CAM-Modell und Inkubation mit VEGF-C | 24 |
| 3.2.3 Videokapillarmikroskopie | 25 |
| 3.2.4 Isolierung von Lymphendothelzellen aus humanem Vorhautgewebe | 25 |
| 3.2.5 Kultivierung von Lymphendothelzellen | 27 |
| 3.2.6 Identifizierung und Charakterisierung von Lymphendothelzellen | 27 |
| 3.2.6.1 Durchflusszytometrie | 27 |
| 3.2.6.2 Immunfluoreszenz-Färbungen | 28 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------------------|---|-----------|
| 3.2.6.3 | Nachweis von CD31 und LYVE-1 mittels Western Blot | 29 |
| 3.2.7 | Pharmakokinetische Modellberechnungen zu Penicillin G | 30 |
| 3.2.8 | Inkubation mit Penicillin G | 31 |
| 3.2.9 | Bestimmung der Proliferation unter Penicillin G-Einfluss | 32 |
| 3.2.10 | Bestimmung der Vitalität unter Penicillin G-Einfluss | 32 |
| 3.2.11 | Wirkung von Penicillin G auf HaCaT-Zellen im Epithelisierungsmodell | 33 |
| 3.2.11.1 | Kultivierung von HaCaT-Zellen | 33 |
| 3.2.11.2 | Beschichtung der Kulturgefäße | 33 |
| 3.2.12 | Imitation eines Reepithelisierungsprozesses der Epidermis unter Penicillin G | 34 |
| 3.2.13 | Bestimmung der Proliferation unter Penicillin G-Einfluss | 35 |
| 3.2.14 | Bestimmung der Vitalität unter Penicillin G-Einfluss | 35 |
| 4. Ergebnisse | | 36 |
| 4.1 | Nachweis von Lymphendothelzellmarkern im Gewebe | 36 |
| 4.1.1 | Nachweis von Lymphendothelzellmarkern in humanem Gewebe | 36 |
| 4.1.2 | Nachweis von Lymphendothelzellmarkern in der CAM | 40 |
| 4.2 | Einfluss von VEGF-C auf die CAM | 42 |
| 4.2.1 | Nachweis mittels ABC-Methode | 42 |
| 4.2.2 | Nachweis mittels Videokapillarmikroskopie | 43 |
| 4.3 | Identifizierung von Lymphendothelzellen | 44 |
| 4.3.1 | Wahl der geeigneten Isolierungsmethode | 44 |
| 4.3.2 | Identifizierung mittels durchflusszytometrischer Bestimmung | 46 |
| 4.3.3 | Identifizierung mittels Immunfluoreszenz | 46 |
| 4.3.4 | Identifizierung mittels Western Blot | 47 |
| 4.4 | Darstellung pharmakokinetischer Modellberechnungen zu Penicillin G | 48 |
| 4.5 | Einfluss von Penicillin G auf Lymphendothelzellen | 51 |
| 4.5.1 | Einfluss von Penicillin G auf die Proliferation von Lymphendothelzellen | 51 |
| 4.5.2 | Einfluss von Penicillin G auf die Vitalität von Lymphendothelzellen | 53 |
| 4.6 | Einfluss von Penicillin G auf HaCaT-Zellen | 55 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------------------------------|---|-----------|
| 4.6.1 | Einfluss von Penicillin G auf die Reepithelisierung im Modell mit HaCaT-Zellen | 55 |
| 4.6.2 | Einfluss von Penicillin G auf die Proliferation von HaCaT-Zellen | 61 |
| 4.6.3 | Einfluss von Penicillin G auf die Vitalität von HaCaT-Zellen | 63 |
| 5. Diskussion | | 66 |
| 5.1 | Auswahl lymphspezifischer Marker | 66 |
| 5.2 | Darstellung angiogenetischer Vorgänge im HET-CAM-Modell | 67 |
| 5.3 | Isolierung und Charakterisierung von Lymphendothelzellen | 69 |
| 5.3.1 | Isolierung von Lymphendothelzellen | 69 |
| 5.3.2 | Charakterisierung von Lymphendothelzellen | 70 |
| 5.4 | Pharmakokinetische Modellberechnungen zu Penicillin G | 71 |
| 5.5 | Einflussnahme von Penicillin G auf Lymphendothelzellen | 72 |
| 5.5.1 | Einfluss von Penicillin G auf die Proliferation von Lymphendothelzellen | 72 |
| 5.5.2 | Einfluss von Penicillin G auf die Vitalität von Lymphendothelzellen | 73 |
| 5.5.3 | Schlussfolgerung | 74 |
| 5.6 | Darstellung eine Reepithelisierungsmodells mittels HaCaT-Zellen unter Penicillin G | 74 |
| 5.7 | Einfluss von Penicillin G auf HaCaT-Zellen | 75 |
| 5.7.1 | Reepithelisierungsmodell | 75 |
| 5.7.2 | Einfluss von Penicillin G auf die Proliferation von HaCaT-Zellen | 76 |
| 5.7.3 | Einfluss von Penicillin G auf die Vitalität von HaCaT-Zellen | 76 |
| 5.7.4 | Schlussfolgerung | 77 |
| 6. Zusammenfassung | | 78 |
| 7. Literaturverzeichnis | | 80 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| ABC | Avidin-Biotin-Complex |
| AEC | 3-Amino-9-ethylcarbazol |
| ASCO | American Society of Clinical Oncology |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AWMF | Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlich Medizinischen Fachgesellschaften |
| BEC | Blood Endothelial Cell |
| BfR | Bundesinstitut für Risikobewertung |
| BrdU | 5-Brom-2'-deoxyuridin |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| c ₁ | Konzentration im Kompartiment 1 |
| c ₂ | Konzentration im Kompartiment 2 |
| CAM | Chorioallantoismembran |
| CD | Cluster of Differentiation |
| cm | Zentimeter |
| cm ² | Quadratcentimeter |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| E | Einheit |
| ECGM | Endothel cell growth medium |
| EDTA | Ethylendiamino-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| E/ ml | Einheit pro Milliliter |
| FACS | Fluorescence activated cell sortin |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FKS | fetales Kälberserum |
| h | Stunde |
| HaCaT | Human adult low calcium high temperature |
| HE | Hämalaun |
| HET-CAM | Hen`s Egg Test – Chorio Allantois Membran |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| ICAM | Intercellular adhesion molecule |
| I.E. | Internationale Einheit |
| IFN | Interferon |
| IgG | Immunglobulin G |
| Il-1 | Interleukin-1 |
| i.m. | intramuskulär |
| i.v. | intravenös |
| k ₁₂ | Geschwindigkeitskonstante: Kompartiment 1 zu 2 |
| k ₂₁ | Geschwindigkeitskonstante: Kompartiment 2 zu 1 |
| k ₁₀ | Geschwindigkeitskonstante: Kompartiment 1 zu Elimination |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| l | Liter |
| LEC | Lymphatic endothelial cell |
| LS | Large size (Trennsäule) |
| LYVE | Lymphatic vessel hyaluronan receptor-1 |
| mA | Milliampère |
| Mab | Monoclonal Antibody |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| Mio | Million |
| min | Minute |
| MS | Medium size (Trennsäule) |
| n | Anzahl |
| nm | Nanometer |
| OP | Operation |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PBST | Phosphate-buffered saline mit Tween 20 |
| PDGF | Platelet derived growth factor |
| PE | Phycoerythrin |
| PECAM | Platelet endothelial cell adhesion molecule |
| PFA | Paraformaldehyd |
| prf | phenolred-free |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| SFM | Serumfreies Medium |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin |
| TGF α | Transforming growth factor α |
| U/ min | Umdrehungen pro Minute |
| UV | ultraviolett |
| V ₁ | Verteilungsvolumen im Kompartiment 1 |
| V ₂ | Verteilungsvolumen im Kompartiment 2 |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| VEGFR | Vascular endothelial growth factor receptor |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZEBET | Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |

1. Einleitung und Zielstellung

Das Lymphgefäßsystem ist als unidirektionales Drainagesystem des Körpers für den Transport und die Resorption der Lymphe verantwortlich. Der so genannte Halbkreislauf beginnt im interstitiellen Bindegewebe mit initialen Lymphgefäßen in der Peripherie des Körpers und mündet in Lymphsammelgefäße, die vereint den Ductus thoracicus bilden. Die Lymphe, bestehend aus eiweiß-, fett- und zellhaltiger Flüssigkeit, wird in den Kapillaren aufgenommen und in das venöse System transportiert [Földi 1999, Weissleder 1996, Zöltzer 2003].

Defekte der Struktur und Funktion führen oft zur Minderung der Transportkapazität und damit zum Lymphödem und können ihre Ursache in primären Schädigungen, wie z.B. Lymphgefäßhypoplasien, oder sekundären Schädigungen, wie z.B. Traumata, haben [Herortz 2004]. Unabhängig von der Ursache ist das ödematisierte und perfusionsbeeinträchtigte Gewebe anfällig für Infektionen. So zeigt sich im Zusammenhang mit einem Lymphödem oft das klinische Bild eines Erysipels. Diese auch als Wundrose bekannte Entzündung ist eine bakterielle Infektion, verursacht durch β -hämolisierende Streptokokken der Lancefield-Gruppe A [Fritsch 2004]. Charakteristisches Symptom am Hautorgan ist ein flammendrotes Erythem mit zungenförmigen Ausläufern.

Konform den Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Arbeitsgemeinschaft für Dermatologische Infektologie (ADI) erfolgt die Therapie des Erysipels mit Penicillin G. Dabei werden im Mittel intravenöse Dosierungen von drei Mal 5-10 Mio IE pro Tag appliziert [AWMF 2006]. Die Entzündung weist zudem eine hohe Rezidivrate auf, die insbesondere im Zusammenhang mit der Dauer des Lymphödems korreliert [Baddour 1982]. Aus therapeutischer Sicht wird daher bei chronischen Formen auch eine prophylaktische, zyklische oder im Einzelfall auch dauerhafte intravenöse Antibiotika-Gabe in Erwägung gezogen [Allard 1999]. Diese therapeutischen Maßnahmen zielen rein auf die Behandlung der Infektion und zeigen keine relevanten Effekte auf das Lymphödem. Häufig wird sogar bei rezidivierenden Erysipelen und damit wiederholter Gabe von Penicillin G auch in Hochdosisschemata oder unter Penicillin G-Prophylaxe eine Verschlechterung des Lymphödems beobachtet [Vignes 2006].

Trotz begleitender Komplexer Physikalischer Entstauungstherapie (KPE) gelingt es häufig nicht, die Progression des Ödems aufzuhalten bzw. die Erysipelrezidive zu verhindern. Bislang ist unklar, warum es zu dieser Progression kommt.

Manche Autoren vermuten, dass durch den chronischen Ödemzustand im Gewebe und mit den Veränderungen im Mikrokompartment der extrazellulären Matrix eine Dysfunktion von

Fibroblasten und damit eine chronische Fibrosierung initiiert wird, die den Lymphabfluss erschwert und die Aufnahmekapazität der initialen Lymphgefäße reduziert. Eine weitere Ursache könnte im entzündlichen Szenario liegen, da hier die Ultrafiltrationsrate des hämovaskulären Kapillarsystems erhöht wird und dadurch die lymphpflichtige Last steigt. Sowohl der Stauungszustand an sich, aber auch die Induktion durch bakterielle Antigene oder Autoantigene könnten ursächlich die Entzündung initiieren. Hierbei scheinen sich komplexe Pathomechanismen gegenseitig zu akzelerieren. Der erhöhte Gewebsturgor bedingt eine Differenzierungsstörung der Epidermis, die in eine Störung der Barrierefunktionalität mündet und zur Ausbildung des Symptoms „Trockene Haut“ führt. Diese komplexe Reduktion der Barrierefunktion wird zudem durch eine verminderte Expression antimikrobieller Peptide bedingt, so dass wirtsspezifische Konditionen entstehen, die eine streptogene Infektion begünstigen, die wiederum eine entzündliche Gewebsreaktion zur Folge hat.

Eine bisher wenig diskutierte Theorie geht von einer toxischen Schädigung der Lymphendothelzellen bzw. der Keratinozyten durch das Antibiotikum Penicillin direkt oder seiner Metabolite aus [Shenoy 1999, Vignes 2006]. Dieser Frage will die experimentelle Strategie in dieser Arbeit nachgehen und pharmakokinetische und toxikologische Belege dafür erarbeiten.

Um dieser Zielstellung zu genügen, wurde auf folgende Detailfragen fokussiert:

Welche spezifischen Zelloberflächenmarker sind geeignet, um kutane mikrovaskuläre Endothelzellen an humanem und aviärem Gewebe zu identifizieren?

1. Mit welchen pharmakokinetischen Bedingungen für Penicillin G ist im ödematisierten Gewebe zu rechnen?
2. Lassen sich mikrovaskuläre Lymphendothelzellen aus humaner Haut isolieren, kultivieren und charakterisieren? Lassen sich zytotoxische Effekte von Penicillin G nachweisen?
3. Lassen sich zytotoxische Effekte von Penicillin G an Keratinozyten nachweisen?
4. Lassen sich an einem in-vivo-Modell (HET-CAM-Modell) Effekte von Penicillin G auf lymphangiogenetische Vorgänge darstellen und charakterisieren?
5. Lassen sich an einem Epithelisierungsmodell Effekte auf die Proliferation und Layerformation darstellen und quantifizieren?

Als Schlussfolgerung aus diesen Überlegungen und als Zielstellung haben sich für die Arbeit folgende Schwerpunkte ergeben:

- Auswahl lymphendothelzell-spezifischer Marker für humanes Gewebe und für das HET-CAM-Modell
- Darstellung angiogenetischer Vorgänge am HET-CAM-Modell
- Isolierung und Charakterisierung von Lymphendothelzellen
- Pharmakokinetische Modellberechnungen für Penicillin G
- Einflussnahme von Penicillin G auf Lymphendothelzellen
- Darstellung eines Reepithelisierungsmodells mittels HaCaT-Zellen
- Einflussnahme von Penicillin G auf HaCaT-Zellen

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Lymphgefäßsystem

Im 17. Jahrhundert beschrieb Aselli erstmals die durch das milchige Aussehen bestimmten „lacteae venae“ [Alsellius 1627]. Thomas Bartholin prägte mit seiner Arbeit „Vasa lymphatica“ 1653 den Begriff „Lymphgefäß“. Gesammelt und transportiert wird die so genannte Lymphe oder Lymphflüssigkeit. Sie besteht aus interstitieller Flüssigkeit und makromolekularen Substanzen wie z.B. Proteine und Zellen [Herortz 2004, Amman-Vesti 2005]. So spielt das lymphatische System eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Flüssigkeitsgleichgewichts, der Homöostase und der Immunabwehr, aber auch bei der Verbreitung metastasierender Tumorzellen [Skobe 2000, von Andrian 2003, Stacker 2002].

Im menschlichen Körper finden sich zwei unterschiedliche Systeme. Zum linken Venenventrikel führt das größere System, das die beiden unteren Körperquadranten und den linken oberen umfasst, der Ductus thoracicus. Der rechte obere Körperquadrant wird vom kleineren Kreislauf, dem Ductus lymphaticus dexter, drainiert und führt zum Abfluss des rechten Venenventrikels [Herortz 2004].

Die kleinste anatomische Einheit des Lymphgefäßsystems sind die Lymphkapillaren, auch initiale Lymphgefäße genannt. Ihr Durchmesser beträgt durchschnittlich 0,05 mm.

Die Lymphkapillaren bilden im Interstitium ein fein verzweigtes Netzwerk. Ausgekleidet mit einer Endothelzellschicht fehlt ihnen sowohl teilweise oder ganz eine Basalmembran als auch eine glatte Muskelzellschicht. Mit der extrazellulären Matrix sind die Kapillaren über Ankerfilamente verbunden. Mittels Druckerhöhung im Interstitium erfolgt ein Zug auf die Ankerfilamente. Daraus resultiert wiederum, dass sich die Endothelzellen, die leicht überlappend angeordnet sind, voneinander entfernen. So entsteht eine Öffnung, eine so genannte „open junction“, durch die die Lymphe aufgenommen wird [Schmid-Schonbein 1990, Herortz 2004]. Die eichblattförmigen Lymphendothelzellen (LECs) treten somit in Kontakt zu allen in der Lymphe transportierten Stoffen.

Von den Kapillaren verläuft der Transport der Lymphe über die Präkollektoren (0,1-0,2 mm) und die Lymphsammelgefäße (0,5 mm) hin zum Ductus thoracicus bzw. zum Ductus lymphaticus dexter (2-4 cm), bis sie zurück in den venösen Blutkreislauf drainiert wird [Herortz 2004, Amman-Vesti 2005].

Funktionell eng adaptiert an das Lymphgefäßsystem sind die lymphatischen Organe Tonsillen, Thymusdrüse und Milz [Herortz 2004].

Zur Darstellung lymphatischer Strukturen kann in der klinischen Medizin Methylenblau injiziert werden. Dies wird besonders beim Nachweis möglicher Metastasierungswege nach einer Tumoroperation genutzt [Elö 1993, Märkl 2008]. Eine weitere Methode zur Identifizierung von lymphatischen Gefäßstrukturen ist die Injektion von FITC-Dextran, die so genannte Fluoreszenz-Mikrolymphographie. Sie beruht auf dem Transport großmolekularer Substanzen. Besonders bei Patienten mit Lymphödem ist der Lymphtransport behindert und eine Detektion in den oberen Hautschichten ist mittels Fluoreszenz-Auflichtmikroskop möglich [Bollinger 1981].

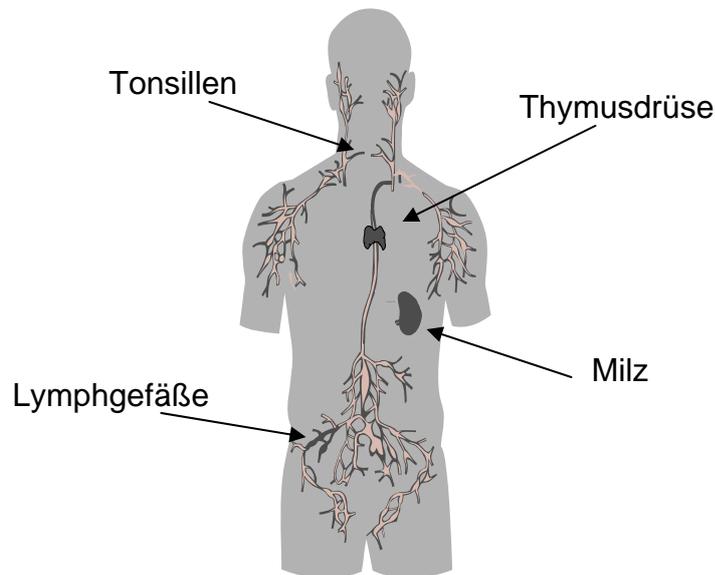


Abbildung 1: Zur Gesamtheit des lymphatischen Systems gehören außer den Lymphstrukturen selbst auch die Tonsillen, die Thymusdrüse und die Milz. Nach Thews, Mutschler, Vaupel 2007.

2.2 Lymphangiogenese

Zur Entwicklung des Lymphsystems existieren zwei Theorien. Florence Sabin postulierte 1902, dass sich während der Embryonalentwicklung der primäre Lymphsack aus vaskulären Endothelzellen bildet, die ihrerseits aus embryonalen Venen stammen. Weiterhin entwickelt sich das periphere lymphatische System durch Sprossung aus dem primären Lymphsack in das umgebende Gewebe [Sabin 1902]. Die zweite Theorie geht von einer unabhängigen Entwicklung von Blut- und Lymphgefäßsystem aus. Die Lymphbläschen entstehen demnach eigenständig aus Vorläuferzellen im Mesenchym. Erst sekundär wird eine Verbindung zwischen beiden Kreisläufen hergestellt [Huntington 1910].

Im Vergleich zum Blutgefäßsystem wurde der Entwicklung des Lymphsystems erst in den letzten 20 Jahren verstärkt Aufmerksamkeit geschenkt. Eine Erklärung dafür ist das Problem der eindeutigen histologischen Erkennung und Unterscheidung vom Blutgefäßsystem [Barsky 1983, Gale 1999].

Als einer der ersten identifizierten Lymphendothelzell-spezifischen Marker ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (VEGFR-3), ein Tyrosinkinase-Rezeptor, zu nennen [Kaipainen 1995]. Mitglieder aus der Glycoprotein-Familie VEGF wie z.B. VEGF-A waren als Mediatoren bei der Angiogenese der Blutgefäße bereits bekannt [Keck 1989, Leung 1989]. VEGF-C und D spielen über ihren Rezeptor VEGFR-3 eine entscheidende Rolle beim Wachstum und der Migration von Lymphendothelzellen [Cao 1998, Jeltsch 1997, Joukov 1996]. Karkkainen zeigte z.B., dass VEGF-C-negative Mäuse während der Embryonalentwicklung zwar initial Lymphendothelzellen bilden, diese aber nicht fähig sind zu migrieren bzw. einen primären Lymphsack zu bilden [Karkkainen 2004].

Dass beide Transportsysteme, Blutgefäßsystem und Lymphsystem, miteinander verbunden sind, sowohl in der Entstehung als auch in der Funktion, zeigen Arbeiten, die eine Einflussnahme von VEGF-C/ D auf den VEGFR-2 des Blutsystems beschreiben und auch eine Unterstützung der Lymphangiogenese durch VEGF-A darstellen [Achen 1998, Cursiefen 2004, Baluk 2005]. Die gegenseitige Beeinflussung und Entwicklung des Blut- und Lymphsystems beschreiben auch Nagy und Detmar und geben damit eine Bestätigung für die Theorie von Sabin [Nagy 2002]. Die nachfolgende Abbildung zeigt diese Zusammenhänge schematisch.

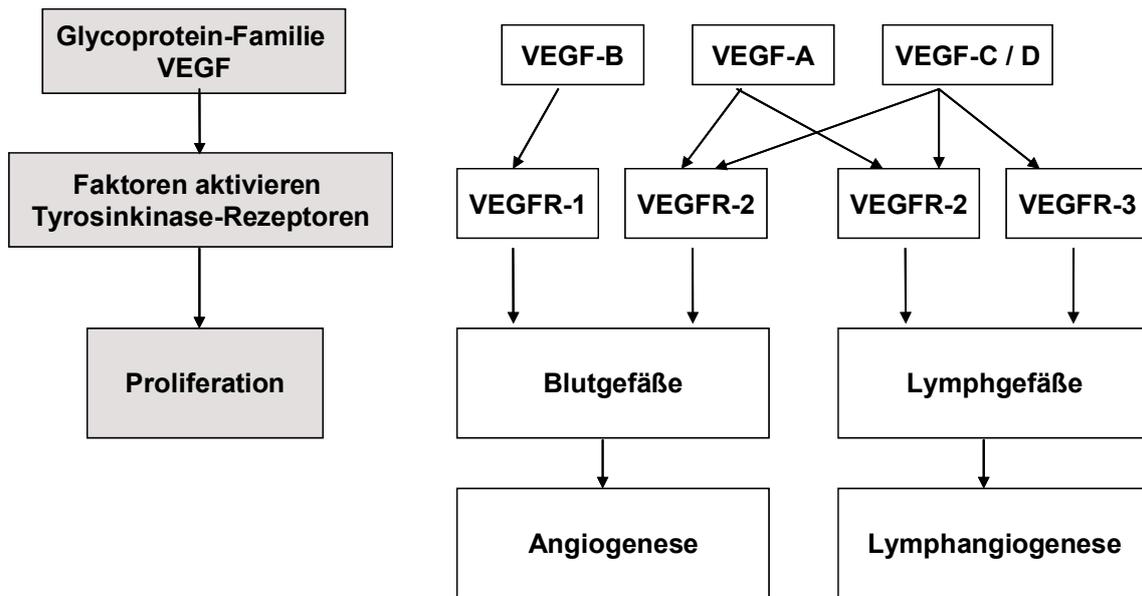


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptorbindungsstellen für die Blut- und Lymphgefäßentwicklung. Nach Hirakawa et al. 2004.

Für Angiogenese-abhängige Erkrankungen wie z.B. Tumore bietet der VEGF-Signalweg einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt [Folkman 1985, Jain 2006]. Als erster Wirkstoff, der die Mediator-Funktion von VEGF unterbindet, wurde der rekombinante, monoklonale Antikörper Bevacizumab zugelassen [ASCO 2003].

2.3 Marker für Lymphendothelzellen

Für die vorliegende Arbeit wurden Lymphendothelzellen aus humaner juveniler Vorhaut genutzt. Vor ihrer Verwendung musste ihre Identität festgestellt werden. Dazu spielten die Entstehungsgeschichte des Lymphsystems und die entsprechenden Marker eine wichtige Rolle.

2.3.1 Lymphendothelzell-spezifischer Marker LYVE-1

Der lymphatische Gefäß-Endothel-Hyaluron-Rezeptor (LYVE-1) ist ein transmembranäres Glykoprotein mit einer Bindungsdomäne für freies und gebundenes Hyaluron. Das Glucosaminoglykan spielt eine bedeutende Rolle bei Vorgängen der Zell-Migration und Zell-Differenzierung [Laurent 1992]. Über 80 % werden via Lymphsystem transportiert und in den Lymphknoten abgebaut [Fraser 1989]. Die genaue Aufgabe von LYVE-1 ist noch nicht

abschließend geklärt. Eine Beteiligung am Metabolismus des Hyalurons ist möglich. Weiterhin wird auch die Bindung von Hyaluron diskutiert, wodurch das Lumen der Gefäße ausgekleidet werden könnte. Das Anheften von Hyaluron-bindenden Zellen wie z.B. dendritische Zellen und Lymphozyten würde so ermöglicht [Jackson 2001].

LYVE-1 zeigt eine 41-prozentige Homologie zum Hyaluron-Rezeptor CD44 [Banerji 1999]. Im Unterschied dazu kommt es aber nur auf der extrazellulären Seite von Lymphgefäßen vor. Damit ist es für die Isolierung von LECs und auch für Lymphangiogenese-Untersuchungen, z.B. in der Tumorforschung, geeignet [Jackson 2001, Prevo 2001]. Zusammen mit Prox-1 (Kapitel 2.3.3) gehört LYVE-1 zu den ersten Markern, die bei der Entstehung des Lymphgefäßsystems exprimiert werden [Wigle 2002]. Eine Arbeit von Mouta et al. zeigt eine Ausnahme für das Vorkommen von LYVE-1. Es ist demnach auch auf hepatischen sinusförmigen Endothelzellen zu finden [Mouta 2001].

2.3.2 Lymphendothelzell-spezifischer Marker Podoplanin (gp36)

Zum ersten Mal wurde Podoplanin als Mucoprotein auf der Oberfläche von glomerulären Ratten-Epithelzellen, den Podocyten, gefunden [Breiteneder-Geleff 1997]. Bei Untersuchungen des Angiosarkoms, das sowohl Blut- als auch Lymphendothelzellen exprimiert, wurde immunhistochemisch Podoplanin spezifisch für das Endothel von Lymphkapillaren detektiert [Breiteneder-Geleff 1999]. Dass spezifische Marker gerade bei solch gering ausdifferenzierten Tumoren eine große Bedeutung für die Diagnostik haben, wurde schon Mitte der 1990er Jahre erkannt [Calonje 1995].

Auch Untersuchungen, nach denen Kaposi-Sarkom-Zellen ihren Ursprung im lymphatischen Endothelium haben, konnten mit dem Nachweis von Podoplanin in Kombination mit VEGFR-3 bestätigt werden [Beckstead 1985, Jussila 1998]. Unter dem Namen E11 zeigt sich die Aminosäure-Sequenz von Podoplanin auch bei Osteoblasten [Wetterwald 1996]. Eine weitere Verwandtschaft dieses Markers besteht zu den alveolären Epithelzellen vom Typ 1 und zu einem Rezeptor für den Influenza-Virus C bei der MDCK-Zelllinie (Madin-Darby canine kidney) [Rishi 1995, Zimmer 1995].

Eine genaue Funktion all dieser Podoplanin-Formen ist noch nicht abschließend geklärt. Eine mögliche Rolle bei inflammatorischen Prozessen ist denkbar: Die Oberfläche des Mucoproteins ist stark O-glycosyliert, wie es auch bei Rezeptoren für Selektine der Fall ist. Diese wiederum vermitteln die Adhäsion inflammatorischer Zellen wie z.B. Leukozyten. Eine ähnliche Aufgabe ist so auch für das lymphatische Endothel möglich [Sasseti 1998].

2.3.3 Lymphendothelzell-spezifischer Marker Prox-1

Ein wichtiger Marker für Lymphendothelzellen ist das Homoeobox-Protein Prox-1. Als Transkriptionsfaktor spielt es eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des Lymphgefäßsystems aus hämovaskulären Strukturen und ist damit eine weitere Bestätigung für die Theorie von Sabin zur Entstehung [Wigle 1999, Petrova 2002]. Prox-1 kommt in einer Subpopulation von Endothelzellen vor, die sich durch den Reiz dieses Proteins zu lymphatischen Strukturen entwickeln [Wigle 2002]. Außerdem kommt Prox-1 in embryonalen Geweben wie der Linse, der Lunge, der Leber sowie der Niere vor. Wichtig für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war auch die Erkenntnis, dass Prox-1 auf der Proteinebene eine Übereinstimmung von 94 % zum Huhn zeigt [Zinovieva 1996]. Detektierbar ist der Marker im Zellkern. Somit kann er nicht für eine Isolierung von LECs herangezogen werden.

In einer Arbeit von Wilting et al. wird Prox-1 zur Identifizierung sowohl von gesundem als auch von erkranktem humanem lymphatischem Gewebe genutzt. Der Marker zeigte sich dort in Kombination mit CD34 oder CD 31 und VEGFR-3 als eindeutig lymphspezifisch [Wilting 2002].

2.4 Lymphödem

Das Lymphödem ist im interstitiellen Bindegewebe lokalisiert und zeigt sich als Hautschwellung, verursacht durch einen Rückstau der lymphpflichtigen Last. Die Transportkapazität des Systems ist eingeschränkt und die Lymphe kann nicht in ausreichendem Maße in die Blutbahn zurücktransportiert werden [Bölter 1985, Werner 2001]. Die Ursachen für diese Funktionsstörung sind vielfältig. Zum einen können funktionelle Störungen des Lymphsystems auftreten, z.B. aufgrund einer nicht korrekt arbeitenden Muskelpumpe oder einer zu hohen Permeabilität der Lymphgefäßwand. Zum anderen spricht man von organischen Schädigungen, die sich wiederum in eine primäre und eine sekundäre Form unterteilen lassen. Von primär spricht man bei einer angeborenen Funktionsbeeinträchtigung oder bei Fehlentwicklungen durch Lymphknotenfibrose, Minderanlage der Gefäße oder Lymphgefäßerweiterung. Sekundäre Lymphödeme haben ihre Ursache in der anatomischen Veränderung des Lymphgefäßsystems im Laufe des Lebens [Földi 1998, Földi 1999, Herpertz 2004]. Lymphknoten und Lymphbahnen können unter anderem durch Operationen (Tumor-OP, Bypass-OP), posttraumatisch, durch Bestrahlung,

rheumatische Erkrankungen sowie durch bakterielle und parasitäre Infektionen geschädigt werden [Kissin 1986, Petrek 1998, Piso 1998, Radtke 1996, Timi 1999].

Zur Therapie des Lymphödems können Basismaßnahmen wie krankengymnastische Übungen, Hautpflege und Kompressionskleidung für Arme und Beine herangezogen werden. Ein medikamentöser Einsatz von Benzopyronen ist bei Casley-Smith beschrieben. Mit der Aktivierung von Makrophagen soll extralymphatisch die Absorption von Gewebeprotein beschleunigt werden [Casley-Smith 1993].

Der Standard in der Behandlung von Lymphödemem ist derzeit die Komplexe Physikalische Entstauungstherapie. Sie beinhaltet einen kombinierten Einsatz von Lymphdrainage, Kompressionsverband und intermittierender maschineller Kompressionsbehandlung [Daane 1998, Dicken 1998, Hwang 1999, Johansson 1998].

2.5 Erysipel und sein Erreger: Streptococcus pyogenes

Als Begleiterscheinung eines Lymphödems kann es auf der Haut zur Ausbildung eines Erysipels kommen. Dabei handelt es sich um eine bakterielle Infektion mit typischen Hautrötungen, die in den oberen Hautschichten und Lymphwegen aufgrund eines Epitheldefekts auftreten kann [Fritsch 2004].

Die gerötete, indurierte Hautverdickung kann sich, auch in Kombination mit weiteren Symptomen einer Entzündung wie Fieber, Schüttelfrost und Schmerzen, in wenigen Stunden von einer minimalen Hautläsion dramatisch ausbreiten. Patienten mit einem bestehenden Defekt im Lymphsystem sind potentiell Erysipel-gefährdet. Das Lymphsystem ist in seiner Funktion eingeschränkt, auch was den Transport und die Immunabwehr von Erregern in den Lymphknoten betrifft [Fritsch 2004]. Die chronisch rezidivierende Form tritt hauptsächlich bei chronisch venöser Insuffizienz, bei kongenitalen Lymphödemem und bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit auf. Dauer und Häufigkeit des Erysipels bestimmen maßgeblich die Ausbildung von Lymphödemem durch die direkte toxische Wirkung des Erregers [Baddour 1982]. Rezidive sind eine häufige Komplikation. Sie treten in 23-34 % der Fälle auf und betreffen fast immer die Beine [Crickx 1993, Jorup-Rönström 1987, Ströberl 1985]. Wegen der akuten Entzündung verstärkt sich das Lymphödem und begünstigt damit wiederum ein Rezidiv [Allard 1999].

Der bakterielle Erreger dieser Infektion, *Streptococcus pyogenes*, gehört zu den β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe A. Im Direktpräparat lassen sich nach Gramfärbung circa 1 μm große, runde Kokken erkennen, die teilweise in Ketten angeordnet

sind [Mersch-Sundermann 1989]. Vor allem im Kindesalter ist der Erreger für Erkrankungen wie Tonsillopharyngitis und Scharlach verantwortlich [DGPI 1997]. Auf der gesunden Haut kommt er normalerweise nicht vor. Durch Schmier- und Tröpfcheninfektion kann das Bakterium aber nach Verletzung oder bestehender dermaler Grunderkrankung, wie z.B. dem Lymphödem, die Ursache für die Ausbildung eines Erysipels sein [AWMF–Leitlinie 2006, Brett 1998].

Da *Streptococcus pyogenes* Penicillin-empfindlich ist, stellt dieser Arzneistoff das Mittel der ersten Wahl bei der Erysipel-Therapie dar [AWMF–Leitlinie 2006].

2.6 Penicillin G und Therapie des Erysipels

Als eines der ältesten Antibiotika, isoliert aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum*, gehört Penicillin G (Benzylpenicillin) zur Gruppe der β -Lactam-Antibiotika. Paul Ehrlich beobachtete 1928, dass Bakterienkolonien in Anwesenheit des Pilzes in ihrem Wachstum gehemmt wurden [Mutschler 2008]. Penicillin G wirkt durch Öffnung und Bindung des β -Lactam-Rings an das aktive Zentrum der Transpeptidase als irreversibler Inhibitor der Zellwandsynthese. Der Wirkungstyp ist bakterizid, nur proliferierende Keime werden erreicht [Lüllmann 2003, Mutschler 2008].

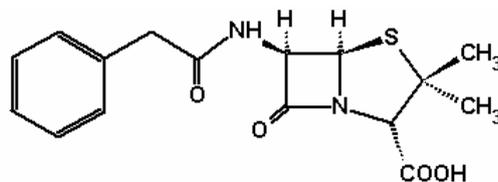


Abbildung 3: Strukturformel von Penicillin G (Benzylpenicillin) mit dem namensgebenden Benzylring und dem für die Wirkung essentiellen β -Lactam-Ring.

Da Penicillin G nicht säurestabil ist, wird es bei der Therapie des Erysipels intramuskulär (i.m.) oder intravenös (i.v.) appliziert. Die Dosierung erfolgt traditionell in biologischen Einheiten. Dabei gilt, dass 1 mg Benzylpenicillin-Natrium 1.670 Einheiten entspricht. Die applizierten Dosen reichen von 0,2 Mio Einheiten bis 10 Mio Einheiten pro Tag [Simon 2000, Fachinformation „Penicillin Grünenthal“ 2002].

Die Therapie des Erysipels sollte aus den Komponenten Antibiose, Lymphdrainage und Verhinderung einer Reinfektion durch die Suche möglicher Eintrittspforten für den Erreger und anderer Risikofaktoren bestehen (Allard 1999). Für die antibiotische Therapie muss folgendes beachtet werden: Zum Erreichen einer antibakteriellen Wirkung muss die

Konzentration des Antibiotikums am Wirkort die minimale Hemmkonzentration (MHK) übersteigen oder zumindest erreichen. Für *Streptococcus pyogenes* liegt die MHK bei 0,001-0,5 E/ ml [Simon 2000]. Der Erreger des Erysipels befindet sich hauptsächlich im Interzellularraum und in den Lymphgefäßen der betroffenen Region [Sjöblom 1992].

Ödeme und Entzündungen des Lymphgefäßsystems erschweren das Erreichen eines ausreichenden Wirkspiegels [Kremer 1991]. In einer Studie von Allard et al. zeigten sich ein langsames Abklingen der lokalen Entzündung und ebenfalls ein langsamer Rückgang pathologisch erhöhter Parameter. Das führte zu dem Schluss, dass ein einmaliger Therapiezyklus nicht zur vollständigen Elimination des Erregers führt, sondern dieser vielmehr in den interstitiellen Kompartimenten persistiert.

Auch die prophylaktische Penicillin-Gabe über Monate konnte ein Rezidiv nach Beendigung der Therapie nicht verhindern. Als Ursache wird vermutet, dass wegen der Ödem-bedingten Dermato-Lipo-Sklerose keine kurativen Wirkspiegel im Gewebe aufgebaut werden können [Allard 1999].

2.7 Chorioallantoismembran als Modell (HET-CAM-Modell)

Das "Hen's Egg Test-Chorio Allantois Membran"-Modell ist eine Alternative zum Draize-Test und hat seinen Ursprung in der Suche nach Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch. Für diese Methoden wurde von der ZEBET das von Russel und Burch 1959 entwickelte Prinzip „Replacement, Reduction, Refinement“ festgelegt. Standardmäßig wird der HET-CAM-Test für die Bestimmung der Toxizität bzw. des irritativen Potentials chemischer Substanzen und potentieller Wirk- und Hilfsstoffe eingesetzt [BfR 2003, Liebsch 2002, Lüring 2003]. Schon Ende der 1950er Jahre untersuchte die US-Armee nach diesem Verfahren das Wachstumsverhalten von Viren [Hahon 1958, Hahon 1959].

Die Chorioallantoismembran zeigt eine gut entwickelte Vaskularisation. So lassen sich nach der Applikation einer Substanz Veränderungen im mikrovaskulären System gut darstellen und damit konzentrationsabhängige Toxizitäten bestimmen [Dannhardt 1996, Djabari 2002, Huschka 1998, Vindardell 2000]. Da man bei der CAM in frühen Entwicklungsstadien, bis zum 10. Tag, nur eine geringe Innervierung annimmt, gilt diese Versuchsanordnung als schmerzfrei und steht weder ethisch noch juristisch dem Tierschutzgesetz entgegen [BfR 2003, Lüpke 1992]. Das komplexe physiologische System der CAM ist weiterhin geeignet zur Darstellung von Vorgängen der Angiogenese und Metastasierung [Quigley 1998, Ribatti 1997a, Ribatti 1999]. An der Membran lassen sich sowohl direkte Einflüsse von Tumorzellen

auf das Epithel des Chorions und auf das Blutgefäßsystem verdeutlichen als auch anti-angiogenetische Untersuchungen und Zytostatika-Testungen durchführen [Armstrong 1982, Brooks 1994, Presta 1999, Tsoyoglou 1994, Vacca 1999]. Wichtig für diese Untersuchungen sind das Vorhandensein von VEGF-Rezeptoren, den entsprechenden Wachstumsfaktoren (siehe 2.2) und ihr Einfluss auf das Blut- und Lymphgefäßsystem. Wilting et al. zeigte unter anderem, dass VEGFR-3 von den Lymphendothelzellen der CAM exprimiert wird, während VEGFR-2 sowohl bei Lymph- als auch bei Blutendothelzellen vorkommt [Wilting 1992]. Eine weitere Veröffentlichung aus dieser Arbeitsgruppe dokumentiert die Induktion der Angiogenese und Lymphangiogenese in der CAM durch VEGF-A und VEGF-C [Oh 1997]. Damit ergibt sich im HET-CAM-Modell ein ähnliches Zusammenspiel von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und ihrer Mediatoren wie im humanen Gewebe. Die Stimulierung der CAM mit VEGF-Varianten ermöglicht es so, spezielle angiogenetische Einflüsse auf das Blut- und/oder Lymphgefäßsystem darzustellen [Wilting 1991, Wilting 1992, Wilting 1993, Wilting 1996, Wilting 1997].

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde mit VEGF-C-Stimulierung eine Angiogenese forciert, um ein geeignetes Modell für Beeinflussung des Lymphsystems mit Benzylpenicillin zu erhalten.

2.8 HaCaT-Zelllinie im Epithelisierungsmodell

Die Zelllinie HaCaT wurde 1988 in der Arbeitsgruppe um Norbert Fusening aus einer Stanzbiopsie isoliert und etabliert. Sie stammt aus der Peripherie eines primären, malignen Melanoms. Die epitheliale Zelllinie ist immortalisiert, nicht tumorigen und ihr Cytochrom-P450-Expressionsmuster ähnelt nativem humanem Gewebe [Boukamp 1988, Breitkreutz 1989, Ryle 1989].

Weiterhin entspricht die Enzymausstattung und Regenerationsfähigkeit der Zelllinie den Eigenschaften von Keratinozyten [Capone 2000, Maas-Szabowski 2003]. Injiziert man die Zelllinie subkutan in die Haut von Nacktmäusen, bildet sich eine nahezu physiologische Epidermis aus [Schoop 1999, Spötter 2003]. Damit zeigt die HaCaT-Zelllinie eine Ähnlichkeit zu Keratinozyten in vivo, die mit bis zu 90 % den Hauptteil der Epidermis bilden. Dank dieser Merkmale eignen sich HaCaT-Zellen sehr gut für die Darstellung von Epithelisierungsmodellen [Kehe 1999, Breitkreutz 1993, Breitkreutz 1998, Scharffetter-Kochanek 1992].

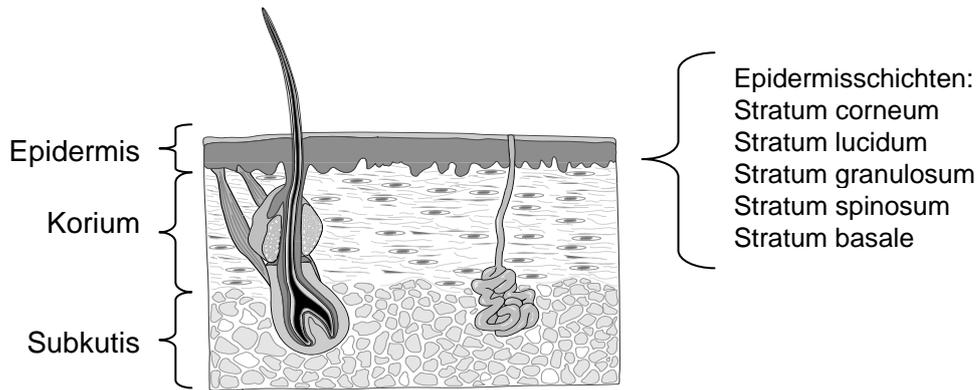


Abbildung 4: Aufbau der Haut im senkrechten Schnitt mit den drei Schichten Epidermis (Oberhaut), Korium (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut), mit einer detaillierten Bezeichnung der fünf Epidermisschichten (nach Mutschler 2006).

Die Wundheilung ist ein komplexer, dynamischer Vorgang. Sie besteht aus der exudativen oder inflammatorischen, aus der proliferativen und aus der regenerativen Phase [Hatz 1994, Voggenreiter 2004]. Der Vorgang der Reepithelisierung gehört in die Phase der Regeneration und beginnt am Wundrand. Durch mitogen- und motogen-stimuliertes Aufheben von Zell-Zell- und Zell-Basalmembran-Interaktionen sowie durch Ausbilden von Aktinfilamenten bei den Keratinozyten wird ein Migrationsreiz in das Wundgebiet möglich [Li 2007, Zaidel-Bar 2004]. Die Wanderung der Zellen geschieht auf der Basalmembran. Ist diese zerstört, bildet sich eine provisorische Wundmatrix aus Fibronectin, Kollagen und Fibrin.

Die Keratinozyten ihrerseits bilden eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie IL-1, IFN, TGF α , ICAM und PDGF zur Wiederherstellung einer intakten Epidermis [Lee 1991, Maas-Szabowski 1996, Phillips 1995, Pittelkow 1989]. Die migrierenden Zellen sind in ihrer Proliferation gehemmt. Aufgrund der Mitose am Wundrand entstehen neue Epithelzellen und die gebildeten Keratinozyten folgen der Migrationsrichtung. Ist die Wundfläche mit einem kontinuierlichen Zell-Monolayer bedeckt, wird die Proliferation durch Kontaktinhibition gestoppt. Die Zellen verankern sich über Desmosomen (β -Integrine) wieder untereinander und mit der Basalmembran. Abschließend differenzieren die Zellen aus und bauen so schrittweise eine neue Epidermis auf [Hatz 1994, Mackenzie 1993].

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

| | |
|--|--|
| CD31, Anti-human | Relia Tech, Braunschweig, Deutschland |
| CD31 Micro Bead Kit | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland |
| D2-40, Mouse, Mab | DCS Innovative Diagnostic-Systeme GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Dynal Pan Mouse IgG | Dynal, Oslo, Norwegen |
| Dynabeads Biotin Binder | Dynal, Oslo, Norwegen |
| Dynabeads CD31 | Dynal, Oslo, Norwegen |
| IgG, Anti-Rabbit, biotinyliert | DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland |
| IgG1, Mouse, Negative Control | DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland |
| IgG, F(ab)2, Anti-Mouse, PE-konjugiert | Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland |
| IgG (H+L), Anti-Mouse, FITC-konjugiert | Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland |
| IgG (H+L), Anti-Rabbit, FITC-konjugiert | Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland |
| IgG (H+L), Anti-Rabbit, Texas Red konjugiert | Abcam, Cambridge, Großbritannien |
| LYVE-1, Anti-Human | Relia Tech, Braunschweig, Deutschland |
| LYVE-1, Anti-Human, biotinyliated | Relia Tech, Braunschweig, Deutschland |
| LYVE-1, Rabbit, polyclonal | Abcam, Cambridge, Großbritannien |
| PECAM-1, (CD31) | Santa Cruz Biotechnologie Inc., CA, USA |
| Podoplanin, Anti-Human (gp36) | Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Prox-1, Anti-Human | Relia Tech, Braunschweig, Deutschland |
| Prox-1, polyclonal | Acris GmbH, Hiddenhausen, Deutschland |
| VHL (LYVE-1) | Santa Cruz Biotechnologie Inc., CA, USA |

3.1.2 Chemikalien

| | |
|---------------|--|
| ABComplex HRB | DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Accutase | PAA GmbH, Pasching, Österreich |
| Acrylamid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|--|--|
| AEC Substrate Chromogen | DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Agarose LE | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland |
| Albumin Bovine Fraction V | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Ammoniumperoxodisulfat | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Antibiotika/Antimykotika-Mix | PAA GmbH, Pasching, Österreich |
| 1000 I.E. Penicillin (Base) | |
| 10000 µg / ml Streptomycin (Base) | |
| 25µg / ml Amphotericin B | |
| Antibody Diluent | DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Bromphenolblau | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Dabco | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| DAPI | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Deoxycholinsäure | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| 1,4-Dithiothreit | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Endothelial Cell Basal Medium MV (prf) | Promo Cell, Heidelberg, Deutschland |
| Endothelial Cell Growth Medium MV | Promo Cell, Heidelberg, Deutschland |
| Endothelial Cell Growth Medium MV 2 | Promo Cell, Heidelberg, Deutschland |
| Ethanol 96%, absolut | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Fetal Bovine Serum (FKS) | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Fibronectin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Hämalaun, sauer nach Mayer | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| HepesBSS | Promo Cell, Heidelberg, Deutschland |
| Igepal | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Keratinocyte SFM, Serum free | Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Kollagen IV | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Labeling and Detection Kit III | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| Laminin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|-------------------------------------|--|
| Magermilchpulver | Nestlé, Frankfurt, Deutschland |
| 2-Mercaptoethanol | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Methanol | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Microbeads, Goat Anti-Rabbit | MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland |
| Mowiol | Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Natriumazid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| PageRuler Prestained Protein Ladder | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland |
| Penicillin G | Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Phenylmethylsulfonylfluorid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Ponceau S Lösung | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Protease Inhibitor Cocktail | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Protein Assay | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Roti-Lumin 1 und 2 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Rotiphorese 10x SDS-PAGE | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Rotiphorese Gel 30 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Rotihistol (Xylol) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Rotisol (absoluter Alkohol) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Salzsäure, 32% | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Saponin | Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Supplement für Keratinocyte SFM | Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Supplement für Endothelzellmedien | Promo Cell, Heidelberg, Deutschland |
| Target Retrieval Solution | DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland |
| TEMED | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| TRIS | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Trypsin-EDTA | Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Tween 20 | Calbiochem, EMD Biosciences, La Jolla, CA, USA |

| | |
|-----------------|---|
| β-Tubulin, Ab-6 | Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland |
| VEGF, human | R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland |
| VEGF-C, human | R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland |

3.1.3 Lösungen

| | |
|------------------------------|---|
| APS 10% | 1g APS in 10 ml Aqua dest. |
| Blotting-Puffer | 80 ml Rotiphorese 10xSDS Page, 200 ml Methanol, 720 ml Aqua dest. |
| Coomassie-Entfärberlösung | 100 ml Eisessig, 300 ml Methanol, ad 1000 ml Aqua dest. |
| Coomassie-Färbelösung | 0,25 g Coomassie-Blau 0,5%, 250 ml Methanol 50%, 3,5 ml Essigsäure 7% ad 500 ml Aqua dest. |
| Formalinlösung 4% | 100 ml Formalin 37%, 900 ml PBS |
| Glycerol; 30% | 1,76 ml Glycerol 85 % ad 5 ml Aqua dest. |
| Laufpuffer | 100 ml Rotiphorese 10xSDS Page ad 1000 ml Aqua dest. |
| Fixativ für BrdU-Assay | 28 ml Ethanol 96%, Aqua dest. 9,9 ml, HCl 32% 2,1 ml |
| Fixativ für Immunfluoreszenz | 4 g Paraformaldehyd, 100 ml PBS |
| Gentianaviolettlösung 0,1% | Gentianaviolett 0,5g, Ethanol absolut 10 ml, Aqua dest. 490 ml |
| Natriumcitratlösung 1M | Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 29,41 g, Ethanol absolut 500 ml, Aqua dest. 500 ml |
| PBS-ABC | PBS mit 1mM CaCl ₂ + 1mM MgCl ₂ |
| PBS-Puffer | 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ x2 H ₂ O ad 1000 ml Aqua bidest. pH 7,4 (mit 1 N NaOH bzw. 1N HCl) |
| PBS-Puffer mit BSA, Saponin | PBS pH 7,4, 0,2% BSA, 0,2 % Saponin |
| PBS-Puffer mit FKS | PBS pH 7,4, 2% FKS |

Material und Methoden

| | |
|-----------------------|---|
| PBS-Puffer mit PFA | PBS pH 7,4, 4% PFA |
| PBST-Puffer | 1 ml Tween 20, 1000 ml PBS |
| Permeabilitätslösung | 0,2 g BSA, 0,2 g Saponin, 100 ml PBS |
| Propidiumjodidlösung | 100 µg Propidiumjodid, 1 ml PBS |
| PUCK-EDTA | 0,4g KCL, 8,0g NaCl, 0,35g NaHCo ₃ , 1,0g D-Glucose, 0,25g EDTA-Dinatrium, 0,005g Phenolrot ad. 1000ml Aqua dest. |
| 4x Protein-Ladepuffer | 2,2 ml Aqua dest., 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl pH6,8, 2,4 ml Glycerol 30%, 1,6 ml SDS 10%, 0,4 ml 2-Mercaptoethanol, 0,4 ml Bromphenolblau 0,05% |
| RIPA-Puffer | 584,4 mg 100mM NaCl, 606,5 mg 50 mM TRIS, 500 mg Deoxycholat 0,5%, 500 mg SDS 0,5%, 0,5ml Igepal ad 100 ml Aqua dest (pH 8,0) |
| Sammelgel | 0,68 ml H ₂ O, 0,17 Acrylamid 30%, 0,13 ml TRIS 1 M, 0,01 ml SDS 10%, 0,01 ml Ammoniumperoxodisulfat 10%, 0,001 ml TEMED |
| Trenngel | 1,9 ml H ₂ O, 1,7 Acrylamid 30%, 1,3 ml TRIS 1,5 M, 0,05 ml SDS 10%, 0,05 ml Ammoniumperoxodisulfat10%, 0,002 ml TEMED |
| TRIS-HCl | 0,5M: 60,57 g in 1000 ml Aqua dest. 1,5M: 181,71 g in 1000ml Aqua dest: |
| Tyrode-Eosin-Lösung | 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g CaCl ₂ , 0,1 g MgCl ₂ , 0,05 g NaH ₂ PO ₄ , 1,0 g NaHCO ₃ , 1,0 g Glucose, 0,625 g Eosin ad 1000 ml Aqua dest. |

3.1.4 Geräte

| | |
|-------------------|--|
| Absorptionsreader | Labsystems iEMS Reader MF, Helsinki, Finnland |
|-------------------|--|

| | |
|-------------------------------------|--|
| Absorptionsreader Software | Sero Calc Version 4.0 |
| Brutschrank | ReCon GmbH, Stadthagen, Deutschland |
| Dampfgartopf | Braun, Kronberg, Deutschland |
| ChemMate Slide Holder | DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Coverplates Shandon | Anatomical Pathology, Cheshire, Großbritannien |
| Durchflusszytometer | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Durchflusszytometer Software | PASCAL 3.22, Lysis II Version 1.1 CellFitt Version 2.01.2 |
| Dynal MPC-S | Dynal, Oslo, Norwegen |
| Elektrophoresekammer | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Feuchtekkammer | Lab Vision, Thermo Scientific, Fremont, CA, USA |
| Filmentwickler CP1000 AGFA | AGFA Gevaert N.V., 9462/206 , Deutschland |
| FLUOstar Galaxy | BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland |
| FLUOstar Galaxy Software | V4, 11-0/ Stacker Control V1.01-0 |
| Fuchs-Rosenthal-Kammer | Fein-Optik, Bad Blankenburg, Deutschland |
| Inkubation Container | DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Kamera Olympus DP10 | Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Laminarbox HS 12 | Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland |
| Mikroskop Standard 20 | Carl Zeiss, Jena, Deutschland |
| Mikroskop Olympus CK2 | Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Mikroskop Olympus IX2 (Fluoreszenz) | Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Mikroskop Software Cell R | Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Mini&Midi MACS Starting Kit | MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland |

| | |
|-----------------------------|---|
| Mini-PROTECAN Tetra Cell | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| PowerPac Basic | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA |
| Semi-Dry Blot-Apparatur | Hoefer SemiPor, Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA |
| UV mini 1240 Spektrometer | Shimadzu, Tokyo, Japan |
| Vortex genie 2 | Scientific Industries, Bohemia, NY, USA |
| Waage MC5-OCE | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| Waage Kern 870 | Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland |
| Wärmeschrank | Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland |
| Wasserbad | Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland |
| Zentrifuge, Biofuge primo R | Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland |

3.1.5 Verbrauchsmaterial

| | |
|--|--|
| Chamber Slides, Lab-Tek II, 2-well | Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland |
| Cutfix Einmalskalpell | Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Deckgläschen | Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland |
| Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml) | Eppendorf.Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Falcon Tubes | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Filterpapier | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Hyperfilm ECL | Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA |
| Immobilon-P (PVDF-Membran) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| LS-Columns | MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland |
| MS-Columns | MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| Objektträger | Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland |
| Parafilm „M“ | Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA |
| Schraubverschluß-Röhrchen, 15 ml, 50 ml | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Zellkultur Flasche, T25 | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Zellkultur Multiwell Platten, 24-well | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Zellkultur-Petrischalen | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkultur-Testplatte, 6-well | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkultur-Testplattem, 96-well | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellsieb (70 µm, 100 µm) | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |

3.2 Methoden

Grundlage der Arbeit ist wie unter 1. beschrieben der Zusammenhang zwischen Lymphödem und Erysipeltherapie. Diese klinische Beobachtung wurde auf eine experimentelle Ebene übertragen. Daraus folgt ein Methodenaufbau, der sich als erstes auf die Suche nach geeigneten Lymphendothelzell-spezifischen Markern konzentriert. Anschließend wurde im HET-CAM-Modell die Angiogenese stimuliert, um ein mögliches vitales Modell zu entwickeln.

Die Methoden aus der dritten Phase der Arbeit beziehen sich auf die Isolierung humaner Lymphendothelzellen, deren Kultivierung und die Einflussnahme von Penicillin G auf Proliferation und Vitalität der Zellen. Im anschließenden Schritt werden vergleichend die Effekte des Antibiotikums auf HaCaT-Zellen im Epithelisierungsmodell untersucht.

3.2.1 Auswahl Lymphendothelzell-spezifischer Antikörper – immunhistochemische Färbung (ABC-Methode)

Immunhistochemisch wurde in den CAM-Präparaten das Lymphsystem nachgewiesen und der mögliche Einfluss von VEGF-C auf die lymphatischen Strukturen dargestellt. Die in Paraffin eingebetteten Präparate wurden mit einer Schnittdicke von 5 µm auf industriell beschichtete Objektträger gezogen und im Wärmeschrank für mindestens 1 h inkubiert.

Alle Färbungen fanden in wässrigem Milieu statt, so dass als erster Schritt die Präparate wieder entparaffiniert wurden. Dazu wurden die Objektträger 2x10 min in Xylol gebadet und anschließend 3x5 min in absolutem Alkohol. Um die Membranen zu permeabilisieren, wurden die Präparate für 30 min in einem Methanol-Wasserstoffperoxid-Gemisch inkubiert. Die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität erfolgte danach durch Spülen mit destilliertem Wasser.

Die Bindungsstellen der Zellen für die Antikörper, die so genannten Epitope, wurden durch eine Demaskierung zugänglich gemacht. Die Präparate wurden in einem Incubation Container, der mit Target Retrieval Solution (pH=9) gefüllt war, während 20 min im Dampfgartopf behandelt. Nach dem Abkühlen wurden sie mit PBS gespült und mit Coverplaces in die Sequenzkammern eingespannt. Um die Laufgeschwindigkeit zu kontrollieren, wurde erneut mit PBS gespült. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte mit 100 µl pro Objektträger bei 37 °C im Brutschrank für 1 h. Es wurde erneut mit PBS gespült und mit jeweils 100 µl eines biotinylierten, sekundären Antikörpers für 30 min

bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem anschließenden Waschschrift mit PBS wurde für 30 min ein AB-Komplex aufgetragen. Die Präparate wurden danach aus der Sequenzerkammer entnommen und kurz mit PBS gespült, woran sich ein Spülschritt mit einer Tween-TBS-Lösung anschloss. Die AEC-Färbung erfolgte mit einem AEC Substrate Chromogen mit jeweils drei bis vier Tropfen pro Objektträger. Die Farbbildung wurde visuell kontrolliert und dauerte maximal 10 min. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser gespült. Für die Gegenfärbung wurden die Objektträger für 10 sec in Hämalaun geschwenkt und unter fließendem Leitungswasser gebläut.

Abschließend wurden die Präparate mit vorgewärmter, flüssiger Gelatine eingedeckt und bis zu ihrer Auswertung dunkel gelagert.

| Primärer Antikörper | Verdünnung in Antibody Diluent | Sekundärer Antikörper | Verdünnung in Antibody Diluent |
|---|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Anti-human Prox-1, generiert in Kaninchen | 1:100 | Anti-Kaninchen IgG | 1:100 |
| Anti-human LYVE-1, generiert in Kaninchen | 1:100 | Anti-Kaninchen IgG | 1:100 |
| Anti-human D2-40, generiert in Maus | 1:80 | Anti-Mouse IgG | 1:100 |

Tabelle 1: Immunhistochemisch verwendete Antikörper und ihre entsprechenden Verdünnungen

3.2.2 HET-CAM-Modell und Inkubation mit VEGF-C

In dieser Arbeit wurden am Hen`s Egg Test (HET) Untersuchungen zum Einfluss des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors C (VEGF-C) auf das Lymphgefäßsystem durchgeführt. Befruchtete Hühnereier der Rasse New Hampshire wurden über sieben Tage bei 37 °C und 55 % Luftfeuchte bebrütet und alle 24 h um 180 Grad gewendet. Nach dieser Wachstumszeit wurden die Eier am schwächer konvexen Pol eröffnet und die Chorio-Allantois Membran (CAM) frei präpariert. 0,2 µg VEGF-C in PBS wurden punktuell auf die CAM aufgetragen, und die Applikationsstelle wurde mit einem Deckgläschen abgedeckt. Als Vergleich wurde auf dieselbe Weise ein Areal auf der CAM nur mit PBS behandelt. Die geöffneten Stellen wurden mit Parafilm abgedichtet, mit Aluminiumfolie lichtdicht verschlossen und für weitere 48 h inkubiert. Pro Versuchsdurchlauf wurden mindestens sechs Hühnereier präpariert. Nach dieser Inkubationsphase wurden zwei Eier mit Hilfe der Videokapillarmikroskopie (3.2.3) untersucht. Von den anderen Ansätzen wurde die CAM

abpräpariert und für die Einbettung in Paraffin in vierprozentige Formaldehydlösung eingelegt. Mittels immunhistochemischer Färbung wurden auch diese Präparate wie unter 3.2.1 beschrieben gefärbt.

3.2.3 Videokapillarmikroskopie

Die Videokapillarmikroskopie ermöglicht einen nicht-invasiven Einblick in obere Hautstrukturen oder Membranen. Durch eine Kaltlichtquelle wurde das zu untersuchende Gebiet maximal ausgeleuchtet. Mit Hilfe einer Videokamera wurde im „real time mode“ mit einer 200-fachen Vergrößerung das ausgeleuchtete Areal digital aufgezeichnet. Auf diese Weise ließen sich kapillare Strukturen und Perfusionsvorgänge darstellen.

Nach der Inkubation mit VEGF-C versus PBS wurde die CAM auf diese Weise bildanalytisch dargestellt und optisch der Unterschied zwischen den beiden Inkubationsvarianten ausgewertet.

3.2.4 Isolierung von Lymphendothelzellen aus humanem Vorhautgewebe

Für die Isolierung der LECs wurden die Vorhäute von Säuglingen und Kleinkindern von maximal fünf Jahren verwendet. Die Gewebeproben wurden mit einem Skalpell in ca. 5x5 mm große Stücke zerlegt. Diese wurden über Nacht bei 4 °C in Dispase inkubiert. Anschließend wurde die Epidermis abgetrennt und die Dermis mit HapesBSS gespült. Für den weiteren Verdau wurde die Probe mit 5 ml 0,05 % Trypsin/ 0,03 % EDTA 2 h lang bei 37 °C behandelt. Anschließend wurde das Trypsin/ EDTA-Gemisch abgesaugt und die Reaktion mit 2 ml FKS gestoppt. In einer Kulturschale mit ECGM-MV Medium wurden die Dermisstücke einzeln mit der stumpfen Seite des Skalpells ausgestrichen. Die so entstandene Zellsuspension wurde durch ein 70 µm Zellsieb gegeben, das mit 10 ml Medium nachgespült wurde. Bei 1450 U/ min wurde die Suspension 5 min zentrifugiert und nach Resuspension die Zellzahl bestimmt. Die Aussaat erfolgte zu $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Kulturflasche T25. Für 24 h wurden die Zellen kultiviert und danach der Überstand mit nicht-adhärennten Zellen abgenommen. Die adhärennte Zellmischung enthielt größtenteils Endothelzellen.

Für die weitere Isolierung sind in der Literatur hauptsächlich zwei Verfahren beschrieben. Beide beruhen auf dem Prinzip der magnetischen Isolierung mit den Antikörpern CD31 und LYVE-1. Sie unterscheiden sich aber in der Partikelgröße der so genannten Magnetbeads und

auch in der Gewinnung der Bead-markierten Zellen. Beide Isolierungsverfahren wurden getestet und verglichen.

Die Firma Dynal bietet ein System an, bei dem die Isolierungsschritte in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß ablaufen. Die kultivierte Zellmischung mit Endothelzellen wurde zwei Mal mit PBS gespült und dann mit Accutase für 7 min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden wieder mit PBS gespült und danach die Zellzahl bestimmt. Die Inkubation mit CD31-markierten Beads mit einer Partikelgröße von 4,5 µm Durchmesser erfolgte mit 25 µl auf 1×10^8 Zellen/ml für 20 min bei 4 °C. Anschließend wurde die Suspension im Magneten platziert, wobei sich die markierten Zellen an der Wand des Reaktionsgefäßes sammelten. Jeweils nach Entfernung des Magneten wurde drei Mal mit einem Milliliter ECGM-MV Medium gewaschen und die Zellen dann zu $0,3 \times 10^6$ in eine Kulturschale 60 cm² ausgesät. Nach maximal zwei Passagen bei einer Konfluenz von 70-80 % erfolgte die Isolierung über LYVE-1 Antikörper. Hierfür wurden Biotin-bindende Beads verwendet, die einen Durchmesser von 2,8 µm hatten und vor ihrer Anwendung mit biotinyliertem LYVE-1 markiert wurden (1,5 µg Antikörper auf 25 µl Beads). Für die Isolierung der Zellen wurden 25 µl Beads auf 1×10^7 Zellen eingesetzt. Bei 4 °C wurde die Mischung für 10 min inkubiert. Die anschließenden Spülschritte und die Kultivierung der Zellen erfolgten analog zum ersten Isolierungsschritt. Die Bindung zwischen Zellen und Beads löste sich durch Mediumwechsel bzw. durch Passagierung.

Die zweite Methode wird von Miltenyi Biotec angeboten. Die Beads liegen in einer stabilen kolloidalen Suspension vor und haben eine Größe von 50 nm. Aus der Kulturschale wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, gespült und die Zellzahl bestimmt. Für die CD31-Isolierung wurde das entsprechende Kit der Firma verwendet und die Zellsuspension entsprechend des Protokolls behandelt. Die Isolierung der markierten Zellen aus der Mischpopulation erfolgte auf einer Trennsäule, die mit einer Matrix aus Eisenpartikeln beladen war. Im magnetischen Feld wurden so die markierten Zellen in der Säule festgehalten, während die nichtmarkierten durch drei Spülschritte entfernt wurden. Außerhalb des magnetischen Felds wurde der verbleibende Säuleninhalt mit Hilfe eines Kolbens in ein Röhrchen gepresst. Es wurde die Zellzahl bestimmt und die Suspension zu $0,3 \times 10^6$ in eine Kulturschale 60 cm² angesetzt. Die ebenfalls im Abstand von zwei Passagen durchgeführte LYVE-1-Isolierung erfolgte in zwei Schritten: Die Zellen wurden zuerst mit einem Antikörper gegen LYVE-1 für 10 min auf Eis inkubiert, 2 µg auf 1×10^6 Zellen. Der nicht gebundene Antikörper wurde in einem Spülschritt ausgewaschen und die Zellsuspension mit 20 µl MicroBeads auf 1×10^7 Gesamtzellzahl auf Eis für 15 min inkubiert. Die markierten

Zellen wurden ebenfalls mit Hilfe einer Trennsäule gewonnen und nach der Isolierung zu $0,3 \times 10^6$ in eine Kulturschale 60 cm^2 ausgesät.

3.2.5 Kultivierung von Lymphendothelzellen

Die isolierten Zellen wurden zu $0,3 \times 10^6$ pro 60 cm^2 Schale in ECGM-MV2 Medium kultiviert, im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 . Bei einer Konfluenz von 70 bis 80 Prozent wurden die Kulturschalen zwei Mal mit PBS gespült und die Zellen mit 2 ml Accutase für 7 min inkubiert. Die entstandene Suspension wurde wieder mit PBS gespült und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden passagiert bzw. für Untersuchungen verwendet. Generell wurden die Zellen bis zur achten Passage genutzt.

3.2.6 Identifizierung und Charakterisierung von Lymphendothelzellen

3.2.6.1 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden die LECs auf charakteristische Marker hin untersucht und damit die Identität und Reinheit der Zellkultur bestimmt.

Die Zellen wurden wie unter 3.2.5 beschrieben von der Kulturschale gelöst und gezählt. Pro Messpunkt wurde 1 Mio Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in definierter Anzahl in ein Falcon-Röhrchen überführt und nach dem Zentrifugieren (1450 U/ min , 4 min) in $100 \text{ } \mu\text{l}$ FACS-Puffer aufgenommen. Als Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 wurde anti-human CD31 verwendet und als entsprechende Isotypkontrolle Maus-IgG. Anti-human LYVE-1 und anti-human Podoplanin wurden für die entsprechenden Lymphendothelzellmarker eingesetzt. Als Isotypkontrolle für LYVE-1 wurde Kaninchen-IgG verwendet, bei Podoplanin ebenfalls Maus-IgG. Mit jeweils $1 \text{ } \mu\text{g}$ pro 1 Mio Zellen des entsprechenden Antikörpers wurden die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit $200 \text{ } \mu\text{l}$ FACS-Puffer gewaschen und bei 1450 U/ min 4 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit $100 \text{ } \mu\text{l}$ FACS-Puffer aufgeklopft, und es folgte eine Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper. Für anti-human CD31 und für anti-human LYVE-1 war dieser FITC-markiert, für Podoplanin R-Phycoerythrin-markiert. Es wurde 15 min auf Eis inkubiert. Der Waschschrift wurde wiederholt und das Pellet in 1 ml FACS-Puffer mit Propidiumjodid, $1 \text{ } \mu\text{g}$ auf $100 \text{ } \mu\text{l}$ Gesamtlösung, aufgenommen. Bis zur Messung wurden die Proben abgedunkelt auf Eis gehalten.

3.2.6.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Für die immunhistochemische Identifizierung der Lymphendothelzellen wurden Zweikammer-Objektträger, sogenannte Chamber Slides, genutzt. Diese wurden mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ poly-D-Lysin beschichtet, über Nacht inkubiert und anschließend mit PBS gespült. Die Zellen wurden zu 8000 pro Kammer ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 bis 70 % verwendet. Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Zellen zur Fixierung mit $250 \mu\text{l}$ 4% Paraformaldehydlösung für 10 min inkubiert. Es wurde wieder mit PBS gespült und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für die Antikörper mit $250 \mu\text{l}$ 1 % BSA in PBS für 15 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Permeabilisierung der Zellmembran mit $250 \mu\text{l}$ einer PBS-Lösung, die 0,2 % BSA und 0,2 % Saponin enthielt. Die Inkubationszeit betrug drei Mal 5 min. An zwei Spülschritten mit PBS schloss sich die Inkubation der primären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur an. Jeweils eine Kammer wurde mit $75 \mu\text{l}$ des Antikörpers inkubiert. Die zweite Kammer eines Objektträgers wurde mit $75 \mu\text{l}$ einer Negativkontrolle behandelt. Danach wurden die Kammern zwei Mal mit PBS gespült und $75 \mu\text{l}$ des sekundären Antikörpers für 45 min bei Raumtemperatur und lichtgeschützt inkubiert. Das Inkubationsschema erfolgte wie in Tabelle 2 festgelegt. Nach der sekundären Antikörperinkubation wurden die Zellen erneut zwei Mal mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit DAPI für 10 min bei Raumtemperatur, ebenfalls lichtgeschützt. Die Kammeraufsätze der Objektträger wurde abgetrennt und die Präparate mit Mowiol/Dabco eingedeckt und im Dunkeln getrocknet.

| primärer Antikörper | Verdünnung | Negativkontrolle | sekundärer Antikörper |
|----------------------------|--|-------------------------|---|
| Anti-LYVE-1 | 1:100 in PBS mit 0,1 % BSA | Kaninchen IgG | Texas Red-konjugiertes Ziege anti-Kaninchen IgG |
| Anti-Prox-1 | 1:100 in PBS mit 0,1 % BSA und 0,1 % Saponin | Kaninchen IgG | Texas Red-konjugiertes Ziege anti-Kaninchen IgG |
| Anti-CD 31 | 1:50 in PBS mit 0,1 % BSA | Maus IgG | FITC-konjugiertes Kaninchen anti-Maus IgG |

Tabelle 2: Antikörper für die Immunfluoreszenz

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Olympus IX2. So konnte die Kernfärbung in einem Bild mit der jeweiligen Antikörperfärbung dargestellt werden.

3.2.6.3 Nachweis von CD31 und LYVE-1 mittels Western Blot

Der erste Schritt, um Proteine mittels Western Blot analysieren zu können, ist deren Auftrennung anhand ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld. Auf dieser Grundlage beruht die Elektrophorese, bei der sich die Proteine entlang eines SDS-Polyacrylamidgels auftrennen. Im Western Blot werden bei konstanter Stromstärke oder Spannung diese Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)- oder Nitrocellulose-Membran transferiert. Eine Visualisierung der Proteine erfolgt durch eine Detektion nach dem Bindungsprinzip Antigen-Antikörper. Die Methode sollte zum Nachweis der Endothel- bzw. Lymphendothelzell-spezifischen Marker CD 31 und LYVE-1 dienen.

Für die Proteinanalyse wurden LECs aus der Kulturschale abgelöst, die Zellzahl bestimmt und mit PBS gewaschen. Nach Zentrifugation und Aufnahme des Pellets in RIPA-Puffer wurde das Gemisch homogenisiert und stark geschert, um eine Denaturierung der Tertiär- und Quartärstruktur zu erreichen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach der Bradford-Methode im Spektrometer bei 595 nm. Zu den Proben zu 60 µg pro Slot (Ladetasche) wurde jeweils Protein-Lade-Puffer zugegeben und nach dem Mischen für 15 min bei 99 °C denaturiert. Das Trenngel wurde gegossen und, nach dessen Polymerisation, das Sammelgel mit 10 Slots (Ladetaschen). Das Auftragsvolumen pro Proben tasche betrug 28 µl bei den Proben und 10 µl bei dem Proteinmarker. In einer vertikalen Elektrophoresekammer erfolgte die Auftrennung bei konstanten 200 V.

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde ein SemiDry Blotter verwendet. Das Gel, die verwendete Membran sowie die Papierfilter wurden in Transferpuffer getränkt und im Sandwichverfahren luftblasenfrei aufeinander gelegt. Bei konstanten 150 mA über 30 min wurden die Proteine auf die Membran transferiert. Um die Effizienz des Transfers zu bestimmen, erfolgte im Anschluss eine 15-min-Färbung der Membran mit Ponceau S-Lösung. Die Färbung wurde mit deionisiertem Wasser wieder ausgespült. Um für die nachfolgende Antikörperinkubation unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde diese mit 5 % Trockenmilch in PBST für 1 h bei Raumtemperatur behandelt. Der Primärantikörper wurde für 2 h ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Waschschr it t mit 3x5 min in PBST, bevor mit dem

sekundären Antikörper für 1 h inkubiert wurde. Abschließend wurde die Membran erneut 3x5 min in PBST gespült.

Bei allen Inkubations- und Waschschrinen wurde die Membran leicht geschüttelt.

| Primärer Antikörper | Verdünnung in PBST | Sekundärer Antikörper | Verdünnung in PBST |
|--|---------------------------|---|---------------------------|
| Anti-PECAM (CD31), monoklonal, generiert in Maus | 1:200 | HRP-konjugiertes Ziege anti-Maus IgG | 1:5000 |
| Anti-LYVE-1, monoklonal, generiert in Maus | 1:200 | HRP-konjugiertes Ziege anti-Maus IgG | 1:5000 |
| Anti-β-Tubulin, monoklonal, generiert in Maus | 1:2500 | HRP-konjugiertes Ziege anti-Maus IgG | 1:5000 |

Tabelle 3: Antikörper für den Western Blot

Für die Detektion wurde die Membran 1 min mit Peroxidase-Substrat, Roti-Lumin, behandelt und dann für sechs bis 8 min mit einem Röntgenfilm in einer Filmkassette inkubiert. Anschließend wurde der Film entwickelt. Alle Nachweise wurden mindestens als Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.2.7 Pharmakokinetische Modellberechnungen zu Penicillin G

Zur Darstellung der pharmakologischen Konzentrationsverläufe von Penicillin G unter Ödem-Bedingungen wurde das Programm Berkeley Madonna, Version 8.3.14, Methode RK 4 gewählt. Als Grundlage wurde ein Zwei-Kompartiment-Modell festgelegt, wobei bedingt durch den herrschenden ödematösen Zustand im zweiten Kompartiment von einem höheren Verteilungsvolumen ausgegangen wurde als im ersten Kompartiment. Kompartiment eins gilt dabei für einen gesunden Erwachsenen mit 70 kg Körpergewicht [Rumble 1986]. Bezogen auf die Anatomie und Verbindung von Blut- und Lymphgefäß wurde im Modell eines Gesunden in beiden Kompartimenten von einem identischen Verteilungsvolumen ausgegangen. Weiterhin wurde das Modell einer Mehrfachdosierung gewählt. Nachfolgender Algorithmus liegt den Berechnungen zu Grunde:

$$d/dt(A1) = -k_{10} \times A1 - k_{12} \times A1 + k_{21} \times A2 + \text{Dosierung}$$

$$d/dt(A2) = +k_{12} \times A1 - k_{21} \times A2$$

$$c = A1/V$$

$$c2 = A2/V2$$

Die verwendeten kinetischen Parameter wurden der Arbeit von Rumble et. al. entnommen und sind in Tabelle 5 zusammengefasst [Rumble 1986].

| Parameter | Größe | Einheit |
|---|------------------|------------------------------------|
| 1. i.v Gabe | 0 | h |
| Dosierungsintervall | 8 | h |
| Dosierung | 1800, 3000, 6000 | mg |
| Verteilungsvolumen V ₁ | 40 | l |
| Verteilungsvolumen V ₂ | 40, 70 | l |
| Geschwindigkeitskonstante k ₁₀ | 4,58 +/- 1,23 | 10 ⁻² min ⁻¹ |
| Geschwindigkeitskonstante k ₁₂ | 1,34 +/- 0,73 | 10 ⁻² min ⁻¹ |
| Geschwindigkeitskonstante k ₂₁ | 2,39 +/- 1,19 | 10 ⁻² min ⁻¹ |

Tabelle 4: Eingesetzte Parameter für die pharmakokinetischen Modellberechnungen

3.2.8 Inkubation mit Penicillin G

Entsprechend der Leitlinien zur Therapie des Erysipels wird Penicillin G intravenös in Dosen von 3x5 Millionen IE bis 3x10 Millionen IE/ Tag eingesetzt. In der Dauertherapie kommen auch intramuskulär verabreichte Dosen von 0,2 Millionen IE/ Tag zum Einsatz. Die daraus resultierenden Plasmaspiegel in mg/ l wurden als Grundlage für die Einwaage von Penicillin G gewählt. Plasmaspiegel von 1,5 mg/ l werden zum Beispiel bei der intramuskulären Gabe erreicht, intravenös können 10 Millionen IE zu einem Plasmaspiegel von 270 mg/ l führen. Der untersuchte Konzentrationsbereich umfasste diese Spanne. Darüber hinaus wurde mit fiktiven Penicillinspiegeln von 360 und 500 mg/ l gearbeitet, um die Wirkung eines eventuell kumulativen Effekts zu bestimmen. Die eingesetzten Konzentrationen wurden auf 100 ml Medium berechnet.

| Applikation | Penicillin in Millionen IE | Penicillin in mg | Plasmaspiegel in mg/ l | Berechnung in mg/ 100 ml |
|---------------|----------------------------|------------------|------------------------|--------------------------|
| i.m.-Gabe | 0,2 | 120 | 1,5 | 0,15 |
| | 0,5 | 300 | 5 | 0,5 |
| | 1 | 600 | 12 | 1,2 |
| | 5 | 3000 | 45 | 4,5 |
| i.v.-Gabe | 1 | 600 | 90 | 9,0 |
| | | | 180 | 18,0 |
| | 5 | 3000 | 234 | 23,4 |
| | 10 | 6000 | 270 | 27,0 |
| fiktive Größe | | | 360 | 36,0 |
| | | | 500 | 50,0 |

Tabelle 5: Einwaage von Penicillin G

3.2.9 Bestimmung der Proliferation unter Penicillin G-Einfluss

Zur Bestimmung der Proliferation wurde der „Labeling and Detection Kit III“ der Firma Roche verwendet und auf eine 24-Well Mikrotiterplatte umgerechnet. In diese wurden die LECs zu 8000 pro Well ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den entsprechenden Penicillin G-Konzentrationen über 24, 48 und 72 h inkubiert (siehe 3.2.12).

Während der S-Phase des Zellzyklus wird 5-Brom-2'-Deoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNS eingebaut. Dieser Einbau ist proportional zur Syntheserate und ermöglicht eine indirekte Aussage zur Proliferation. Die Versuchsanordnung basiert auf dem ELISA-Prinzip. Nach der Fixierung der Zellen und dem BrdU-Einbau erfolgte über mehrere Kopplungsschritte eine Markierung mit einem Peroxidase-Substrat. Die Extinktion wurde bei 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 492 nm im Absorptionsreader FLUOstar Galaxy gemessen. Es wurden mit jeder Penicillin G-Konzentration mindestens Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.2.10 Bestimmung der Vitalität unter Penicillin G-Einfluss

Grundlage der Vitalitätsbestimmung ist die Anfärbung des Gesamtproteins mit Gentianaviolett. Die LEC wurden wie unter 3.2.12 beschrieben kultiviert und behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen für 20 min mit 800 µl absolutem Methanol pro Well fixiert und anschließend die nicht-adhären Zellen, also die toten Zellen, vorsichtig mit Wasser von der Platte gespült. Die Färbung mit 400 µl Gentianaviolett pro Well über 15 min erfolgte im Dunkeln. Es wurde drei Mal vorsichtig mit Wasser gespült und die

Mikrotiterplatte im Dunkeln getrocknet. Der getrocknete Rückstand wurde in 400 µl pro Well einer 0,1 M Natriumcitratlösung aufgenommen. Nachdem eine einheitliche Färbung in jedem Well entstanden war, wurden die Extinktionen bei 620 nm im Absorptionsreader FLUOstar Galaxy bestimmt. Wiederum wurden mit jeder Penicillin G-Konzentration mindestens Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.2.11 Wirkung von Penicillin G auf HaCaT-Zellen im Epithelisierungsmodell

3.2.11.1 Kultivierung von HaCaT-Zellen

Die HaCaT-Zelllinie wurde bereits in Kapitel 2.8 beschrieben. Für die Untersuchungen der Reepithelisierungsphase unter Penicillin wurde die Zelllinie wie folgt vorbereitet:

In Zellkulturflaschen, T 25, wurden jeweils 0,2 bis 0,25 x 10⁶ Zellen ausgesät und mit Keratinozyten SFM-Medium kultiviert, im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂. Der Mediumwechsel fand alle zwei Tage statt. Bei vollständiger Konfluenz wurden die Zellen passagiert oder für Untersuchungen am Wundheilungsmodell verwendet.

Dazu wurde im ersten Schritt das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und zweimal mit 4 ml PUCK/ EDTA gespült. Im zweiten Schritt wurde mit 2 ml einer 0,05 %igen Trypsin PUCK/ EDTA Lösung pro Kulturflasche für 6-8 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die entstandene Zellsuspension wurde abgesaugt und mit 2 ml Medium versetzt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1510 U/ min für 6 min. Der Überstand wurde abpipettiert, die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und es wurde die Zellzahl bestimmt.

Ausgesät wurden die Zellen zu 0,2 x 10⁶ pro Well in 6-Well-Platten. Diese waren bereits wie unter 3.2.11.2 beschrieben beschichtet, um die in-vivo-ähnlichen Bedingungen einer Basalmembran darzustellen.

3.2.11.2 Beschichtung der Kulturgefäße

Die Beschichtung der Kulturgefäße erfolgte mit einer Mischung aus Laminin, Fibronectin und Kollagen IV. In PBS-ABC wurden jeweils 10 µg/ ml der Substanzen gelöst. Pro Well wurde 1 ml dieser Lösung in die Zellkultur-Testplatte zur Inkubation pipettiert. Die so beschichteten Platten wurden über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und anschließend wurde mit jeweils 3 ml PBS-FKS pro Well für 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Wiederum wurde die Lösung abgesaugt und es folgten zwei Spülschritte mit PBS.

Danach waren die Kulturgefäße auf die Aussaat der Zellen vorbereitet und konnten bis zur Verwendung mit Parafilm abgedichtet im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden.

3.2.11.3 Imitation eines Reepithelisierungsprozesses der Epidermis unter Penicillin G

Für die Untersuchungen am Epithelisierungsmodell wurden die HaCaT-Zellen nach der Aussaat kultiviert, bis ein Monolayer entstand. Danach erfolgte das Setzen einer standardisierten Läsion. Der Schwerpunkt lag dabei auf einem möglichst gleichmäßigen und geraden Wundverlauf. Außerdem sollte die Oberfläche des Kulturgefäßes nicht beschädigt werden, um den Heilungsverlauf auf diese Weise nicht zu beeinflussen. Diese Problematik wurde von Lutz Kloke in der Arbeitsgruppe bereits untersucht. Die von ihm entwickelte Apparatur zum Erzeugen einer Läsion wurde auch für den nachfolgend beschriebenen Versuch verwendet. Dabei handelt es sich um ein umgebautes Mikroskop, in dessen Revolverkopf eine gefederte Pipettenhalterung eingebaut ist. Durch den Objektträgertisch konnte die 6-Well-Platte fixiert und anschließend durch die Bewegung des Trägertisches in der x- und y-Ebene im jeweiligen Well in definierter Position eine Läsion gesetzt werden. Der dabei anfallende Zelldebris wurde vorsichtig abgespült und die Zellen mit neuem Medium versorgt. Um den Effekt von Penicillin G auf das Epithelisierungsmodell zu charakterisieren, wurde in Anlehnung an die Versuche mit LECs eine Auswahl mit entsprechenden Konzentrationen auch hier getestet. Außer der Nullkontrolle (ohne Penicillin) wurde mit den Plasmakonzentrationen 1,5 mg/l, 12 mg/l und 90 mg/l gearbeitet, dazu mit den fiktiven Konzentrationen 360 mg/l und 500 mg/l Penicillin G.

Die frisch erzeugte Läsion wurde unter dem Mikroskop fotografiert. Dieser Zeitpunkt galt als Nullwert für den weiteren Versuchsverlauf. Bildanalytisch dokumentiert wurde der Wundheilungsverlauf weiterhin nach 2, 4, 8, 12, 24 und 48 h. Außerdem erfolgte eine Auswertung digital über das Cell R Programm der Firma Olympus. Um immer wieder den gleichen definierten Bereich zu vermessen, waren zur Orientierung an der Unterseite der Kulturplatte Markierungen unter jedem Well angebracht. Auf diese Weise konnte nach jeder Inkubationszeit das jeweilige Foto geeicht und die verbleibende Läsionsfläche bestimmt werden. Die Ergebnisse ließen sich so bildtechnisch und graphisch darstellen.

Die Experimente zum Reepithelisierungsverhalten wurden sowohl mit der Kontrolle als auch mit den unterschiedlichen Penicillin G-Konzentrationen mit einer Anzahl von $n = 4$ durchgeführt und die entsprechenden Mittelwerte gebildet. Diese wurden in einem

nichtlinearen Kurven-Fit nach Hill dargestellt, um den mathematischen Verlauf der in-vitro-Reepithelisierung von HaCaT-Zellen zu dokumentieren.

3.2.12 Bestimmung der Proliferation unter Penicillin G-Einfluss

Die HaCaT-Zellen wurden zu 20.000 pro Well in einer 24-Well Mikrotiterplatte ausgesät. Diese wurden bei einer Konfluenz von 70-80 % mit 1,5 mg/l, 12 mg/l, 90 mg/l, 360 mg/l und 500 mg/l Penicillin G über 24, 48 und 72 h inkubiert. Die Proliferation wurde mit dem „Labeling and Detection Kit III“ der Firma Roche mittels BrdU-Einbau bestimmt, siehe 3.2.9. Die Extinktion wurde als Dreifachbestimmung pro Zeit und Konzentration vermessen und graphisch dargestellt.

3.2.13 Bestimmung der Vitalität unter Penicillin G-Einfluss

Die Aussaat der Zellen und die Inkubation erfolgten entsprechend der Proliferationsuntersuchungen, siehe 3.2.9.4. Das Gesamtprotein wurde mit Hilfe der Gentianaviolett-Färbung wie unter 3.2.10 beschrieben bestimmt. Die Extinktion wurde wiederum im Absorptionsreader bei 620 nm dreifach bestimmt und graphisch ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis von Lymphendothelzellmarkern im Gewebe

Der erste Abschnitt der Arbeit befasste sich mit dem immunhistochemischen Nachweis spezifischer Lymphendothelzellmarker in humanen Gewebeproben. Sowohl Lymphknoten- als auch Vorhautgewebe sind positiv für diese Marker. Beide dienten als Kontrolle für den Nachweis an der CAM.

4.1.1 Nachweis von Lymphendothelzellmarkern in humanem Gewebe

Die aus der Literatur bekannten Lymphendothelzell-spezifischen Marker LYVE-1, Podoplanin und Prox-1 wurden mit Hilfe der ABC-Methode in humaner Vorhaut und in Lymphknoten detektiert [Banerji 1999; Sacht 2003; Wigle 1999]. Die Präparate dienten als Vergleichsbilder für die entsprechende Detektion der Marker in der CAM.

Als Übersichtsfärbung wurde bei jedem Durchgang ($n = 6$) eine Hämalaun-Färbung mitgeführt. Die Markierung der Zellkerne durch die Blaufärbung zeigt die Struktur des Gewebes im Allgemeinen, wodurch man bereits auf dessen Herkunft schließen kann [Boenisch 2003]. Die Querschnitte zeigen jeweils angeschnittene Gefäße, die sowohl hämo- als auch lymphovaskulär sein können (Abbildung 5).

Ergebnisse

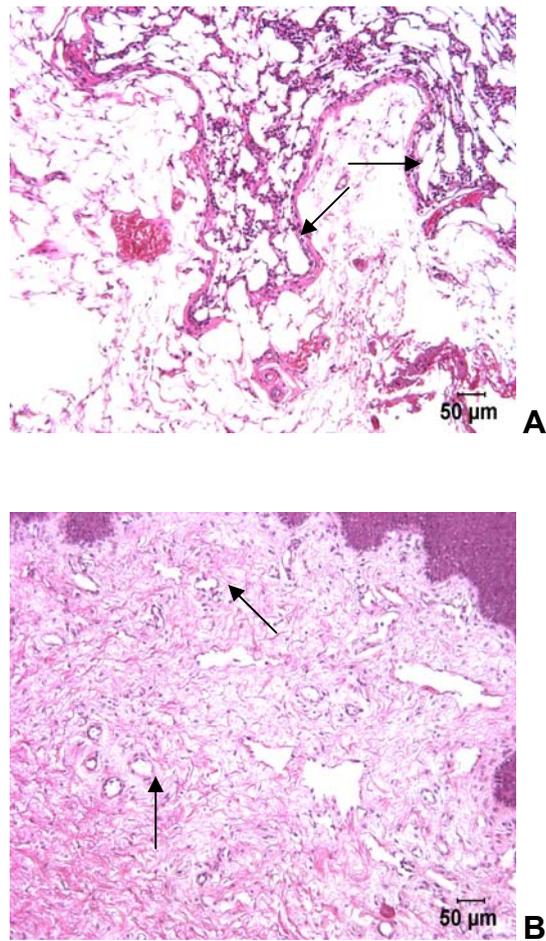


Abbildung 5: Lymphknotengewebe (A) und Vorhautgewebe (B) im Querschnitt in der HE-Übersichtsfärbung. Die Pfeile markieren die im Text beschriebenen Gewebeabschnitte.

Ergebnisse

Die Färbung mit den lymphendothelzell-spezifischen Markern fand entsprechend Kapitel 3.2.1 mit einer Demaskierung statt. Nach beschriebener Inkubation zeigte sich für den Hyaluronsäure-Rezeptor LYVE-1 im Querschnitt beider Gewebearten am Rand einiger Gefäße eine bräunlich-rote Färbung (Abbildung 6). Das Epitop befindet sich extrazellulär auf den Endothelzellen, welche die Lymphkapillaren auskleiden, und wird so durch die spezifische Antikörperbindung detektiert [Jackson 2001].

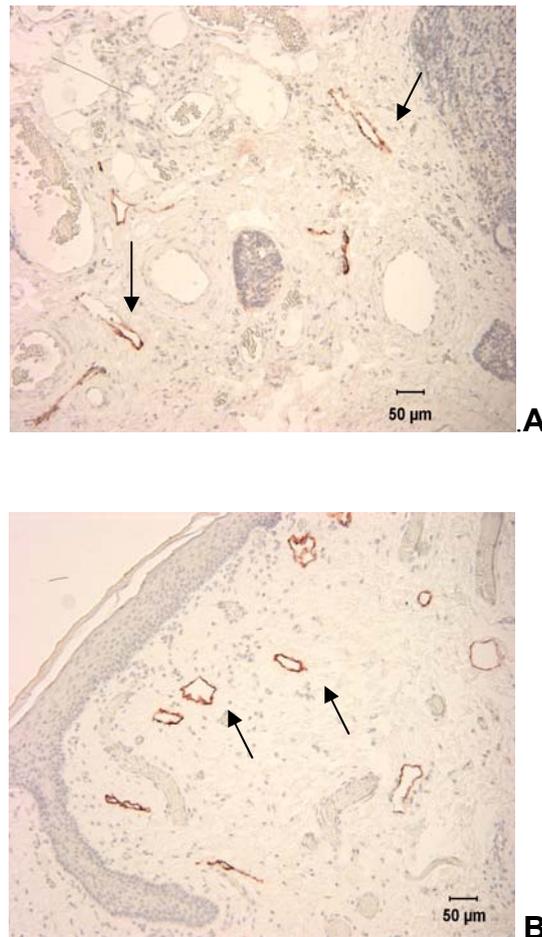


Abbildung 6: Lymphknotengewebe (A) und Vorhautgewebe (B) im Querschnitt nach einer ABC-Färbung mit Anti-LYVE-1-Antikörper. Die Pfeile markieren die im Text beschriebenen Gewebeabschnitte.

Ergebnisse

Das Membran-Mucoprotein Podoplanin, das ebenfalls extrazellulär vorkommt, ist ein weiterer Marker, um Blut- und Lymphendothel voneinander zu unterscheiden [Kerjaschki 2006]. In den Querschnitten von Lymphknoten- und Vorhautgewebe sind die so markierten LECs eindeutig zu identifizieren. Der braunrot gefärbte Kapillarrand bezeichnet damit einen lymphatischen Zugang im Lymphknoten, siehe Abbildung 7.

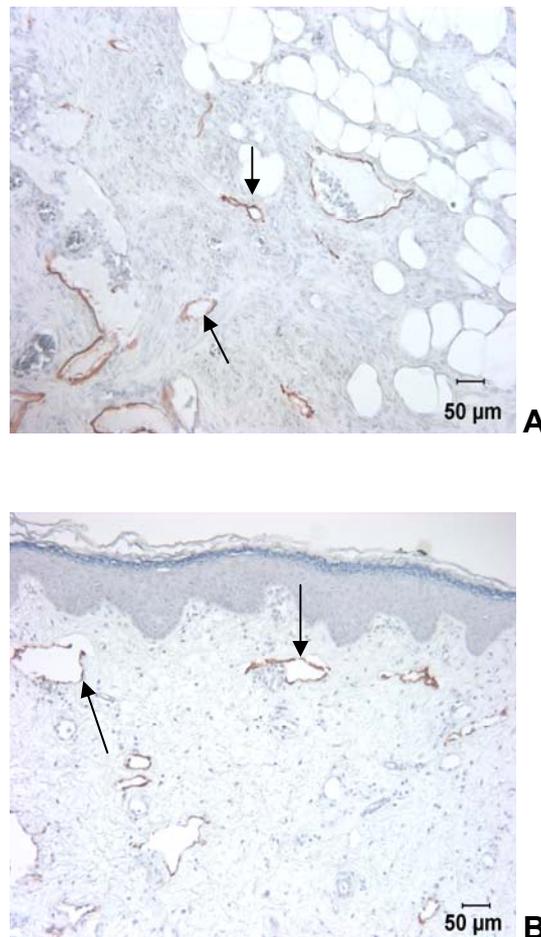


Abbildung 7: Lymphknotengewebe (A) und Vorhautgewebe (B) im Querschnitt nach einer ABC-Färbung mit Anti-Podoplanin-Antikörper. Die Pfeile markieren die im Text beschriebenen Gewebeabschnitte.

Wie bereits unter 2.3.3 erwähnt stellt das von einer endothelialen Subpopulation gebildete Prox-1 einen weiteren lymphendothelzell-spezifischen Marker dar [Wigle 2002]. Das Homeoboxgen, intrazellulär vorkommend im Zellkern, wurde ebenfalls immunhistochemisch nachgewiesen. Im Lymphknotengewebe sowie im Vorhautgewebe zeigt sich in LECs durch rote Färbung des Zellkerns das Vorhandensein von Prox-1 (Abbildung 8). Im Querschnitt wird so deutlich, dass sich in der Schnittebene unterschiedliche Lymphkapillaren befinden.

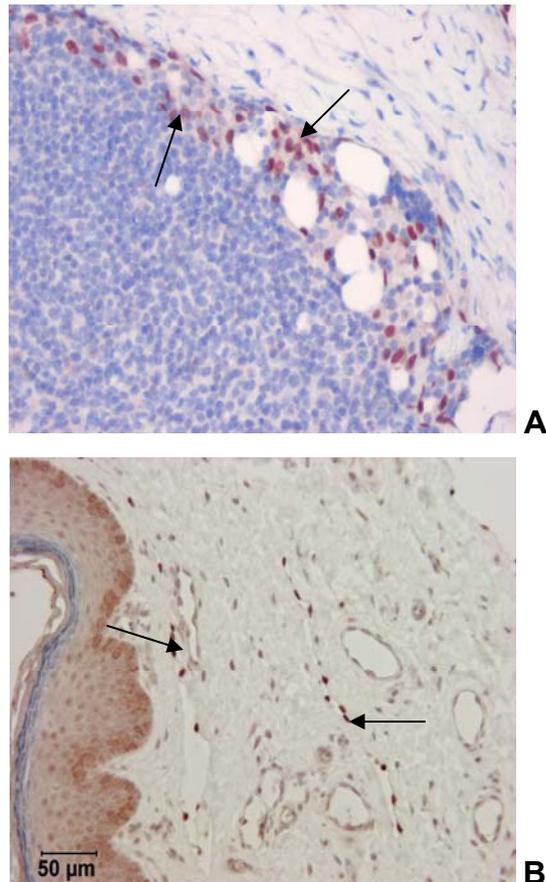


Abbildung. 8: Lymphknotengewebe (A) und Vorhautgewebe (B) im Querschnitt nach einer ABC-Färbung mit Anti-Prox-1-Antikörper. Die Pfeile markieren die im Text beschriebenen Gewebeabschnitte.

4.1.2 Nachweis von Lymphendothelzellmarkern in der CAM

Aufbauend auf den Ergebnissen aus den Färbungen von Lymphknoten- und Vorhautgewebe wurden die drei lymphendothelzell-spezifischen Marker LYVE-1, Podoplanin und Prox-1 nach der gleichen ABC-Methode auch an der CAM getestet. Das humane Prox-1-Protein zeigt 94 % Homologie zu dem des Huhns [Papoutsis 2001]. Das Prox-1 auch im Huhn vorkommt, zeigte eine entsprechende cDNA-Isolierung bereits in den 1990er Jahren [Tomarev 1996].

Ergebnisse

Aufgrund dieser Eigenschaft war es möglich, diesen Marker auch bei immunhistochemischen CAM-Untersuchungen anzuwenden. Für die Antikörper gegen LYVE-1 und Podoplanin gilt dies nicht. Die entsprechenden Färbungen nach der ABC-Methode ergaben immer ein negatives Ergebnis, siehe Abbildung 9.

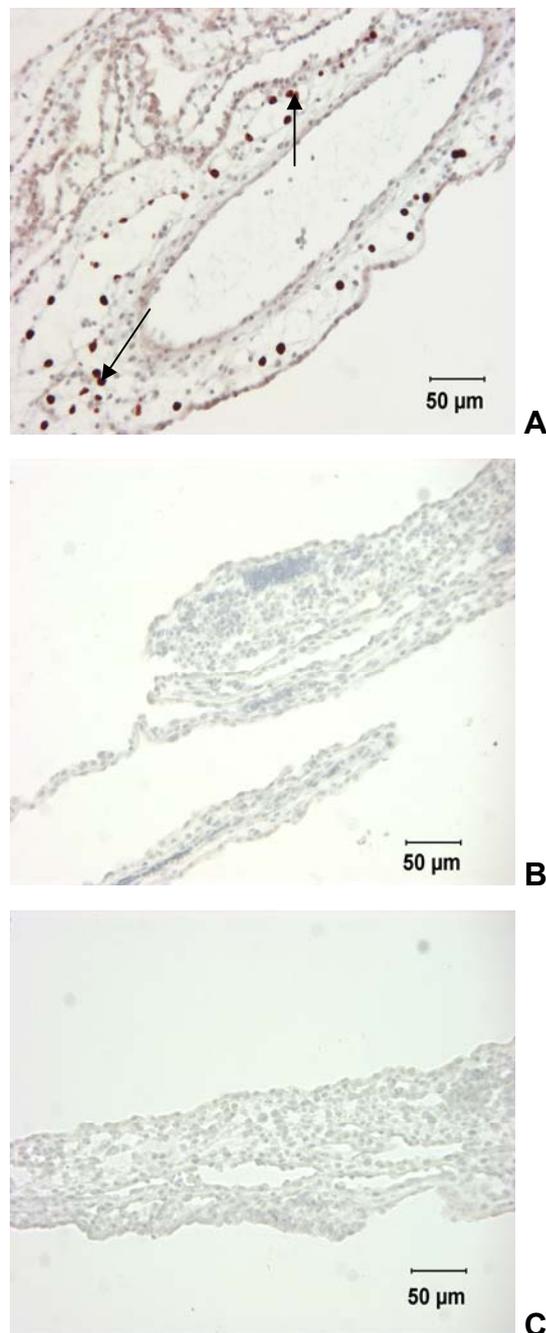


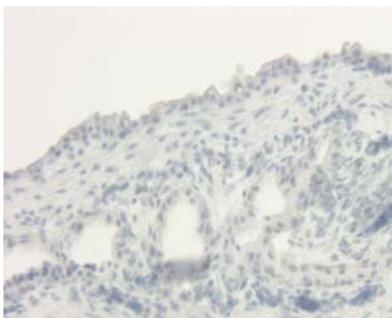
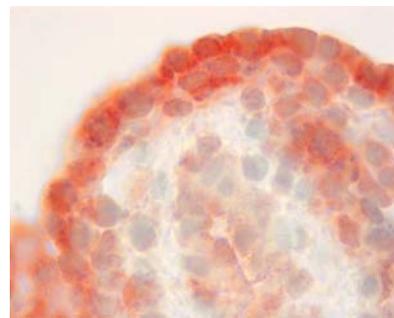
Abbildung 9: Die lymphendothelzell-spezifischen Marker zeigen nur für Prox-1 (A) eine positive Färbung an der CAM. Für LYVE-1 (B) und Podoplanin (C) bleibt die Reaktion mit den entsprechenden Antikörpern negativ. Die Pfeile markieren die im Text beschriebenen Gewebeabschnitte.

4.2 Einfluss von VEGF-C auf die CAM

Als Modell für Toxizitätsuntersuchungen hat der HET-CAM-Test seit langer Zeit eine Bedeutung [Dannhardt 1996; Luepke 1985]. Er ist ebenfalls geeignet, um Vorgänge der Angiogenese und Antiangiogenese darzustellen [Ribatti 1997 b]. Beides findet in dieser Arbeit Anwendung. Durch eine Angiogenesestimulierung mit VEGF-C sollte die physiologische Grundlage für eine Toxizitätsprüfung mit Penicillin G gelegt werden.

4.2.1 Nachweis mittels ABC-Methode

Nach der Inkubation mit VEGF-C im HET-CAM-Modell wurden die CAM entsprechend der unter 3.2.2 beschriebenen Methode behandelt und mikroskopisch ausgewertet. Dabei zeigte sich bei den VEGF-C behandelten Präparaten im Querschnitt gegenüber der Negativkontrolle, die nur mit PBS inkubiert wurde, eine Schleifenbildung. Diese konnten mit einem Antikörper gegen Prox-1 identifiziert werden. Da das Gen in der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle bei der Bildung des lymphatischen Systems spielt, ist es besonders zur Detektion geeignet [Wigle 2002]. Durch ein genau ausgerichtetes Einbetten der Proben in Paraffin und entsprechendes Aufziehen auf Objektträger bei der Herstellung der Färbepreparate wurde deutlich, dass sich diese Schleifen auf der äußeren Seite der CAM bildeten – d.h. der Seite, die mit dem VEGF-C behafteten Deckgläschen Kontakt hatte. So kann, wie in Abbildung 10 dargestellt, davon ausgegangen werden, dass im Vergleich zur wachstumsfaktorfreien Kontrolle die Schleifenbildung auf den Einfluss des VEGF-C zurückzuführen ist.

**A****B**

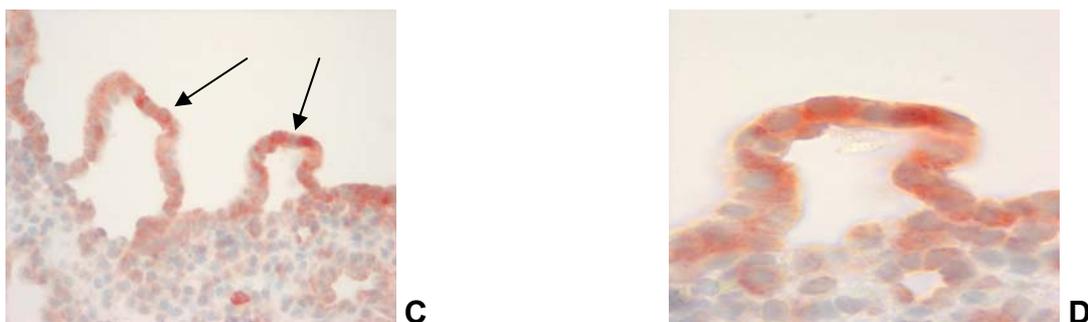


Abbildung 10: Im Querschnitt von A zeigt sich eine negative Färbung für Prox-1, es wurde kein Lymphgefäß angeschnitten. Die von Lymphgefäßen durchzogene CAM zeigt im Querschnitt eine positive Färbung für Prox-1. Im Vergleich zur unbehandelten Version B zeigen C und D nach Inkubation mit dem Wachstumsfaktor eine Schleifenbildung im lymphatischen Bereich. Die Pfeile markieren die im Text beschriebenen Gewebeabschnitte.

4.2.2 Nachweis mittels Videokapillarmikroskopie

Nach der Inkubationszeit von zwei Tagen wurde die CAM mit einer Kaltlichtquelle ausgeleuchtet. Das gut entwickelte Kapillarnetz wird auf diese Weise sichtbar (Abbildung 11).

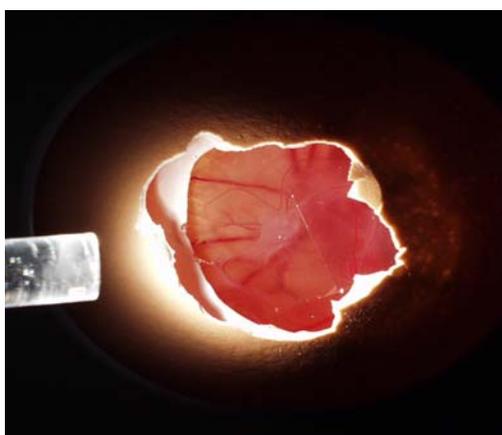


Abbildung 11: Ausleuchtung der inkubierten CAM mit einer Kaltlichtquelle.

Die Areale unter den Deckgläschen – unbehandelt versus behandelt – wurden per Videoaufnahme dokumentiert (Abbildung 12 A und B). Deutlich sind in beiden Bildern die Blutkapillaren zu erkennen. An diese Kapillaren legt sich ein weiß zu erkennender Bereich an, die Lymphwege. Dass sich die lymphatischen Bahnen sozusagen um die Blutgefäße schlingen, beschrieb Papoutsis et al. 2001. Im Unterschied zum nicht behandelten Gebiet zeigt sich bei dem mit VEGF-C inkubierten Bereich deutlich eine Zunahme der Kapillaren-Verzweigungen. Eine wachstumsfaktor- induzierte Angiogenese fand sowohl auf hämo- als

auch auf lymphovaskulärer Ebene statt. Der Versuch, anhand der Graustufung die Unterschiede zwischen beiden Arealen eindeutig zu quantifizieren, gelang nicht. Die Kontraste der Aufnahmen reichten nicht aus, um die einzelnen Gebiete eindeutig voneinander zu trennen.

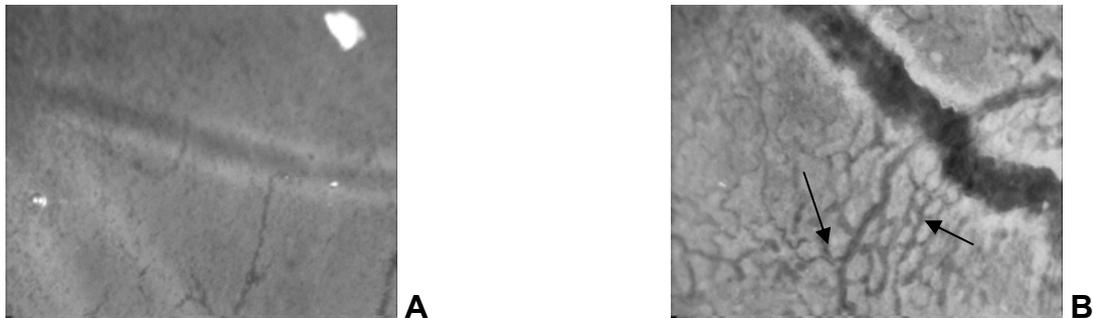


Abbildung 12: A zeigt die CAM im Videomikroskop nach zweitägiger Inkubation mit PBS (Kontrollbereich). Auf dem mit VEGF-C behandelten Gebiet (B) ist deutlich eine Angiogenese zu erkennen. Die Pfeile markieren die im Text beschriebenen Gewebeabschnitte.

4.3 Identifizierung von Lymphendothelzellen

Die Ergebnisse aus dem HET-CAM-Modell führten zur Suche nach einem anderen Testsystem, bei dem ebenfalls eine Komponente des Lymphsystems beteiligt ist. Direkten Kontakt mit der lymphpflichtigen Last haben die Lymphendothelzellen. Ihre Isolierung und entsprechende Toxizitätsuntersuchungen mit Penicillin G stellen den zweiten Teil der Arbeit dar.

4.3.1 Wahl der geeigneten Isolierungsmethode

Als optimale Methode für die Gewinnung von Lymphendothelzellen erwies sich beim Vergleich zwischen Dynal und Miltenyi Biotex das zweitgenannte Verfahren. Die LEC-Kultur erreichte einen höheren Reinheitsgrad. Als Ursache kann die unterschiedliche Beschaffenheit der Beads angesehen werden. Die homogene Bead-Suspension hat bei der Bindung an die Zellen Vorteile, weil nicht auf Rosettenbildung oder Absinken der Beads geachtet werden muss. So kann man für alle Zellen gleiche Bindungsbedingungen annehmen. Auch die Trennung der Zellsuspension über die Säule zeigt Vorteile im Vergleich zur Ansammlung der markierten Zellen an der Wand des Reaktionsgefäßes. Dort können wegen des magnetischen Felds im Pellet auch unmarkierte Zellen enthalten sein, die mitgerissen

wurden. Beim Auftragen auf die Säule verteilen sich in der Matrix hingegen nur markierte Zellen, die während der Spülschritte von den nicht-markierten befreit werden.

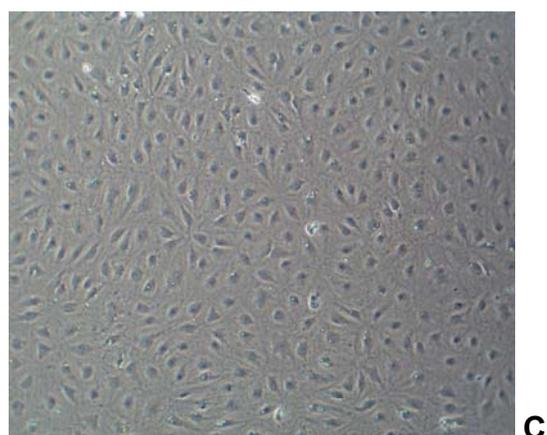
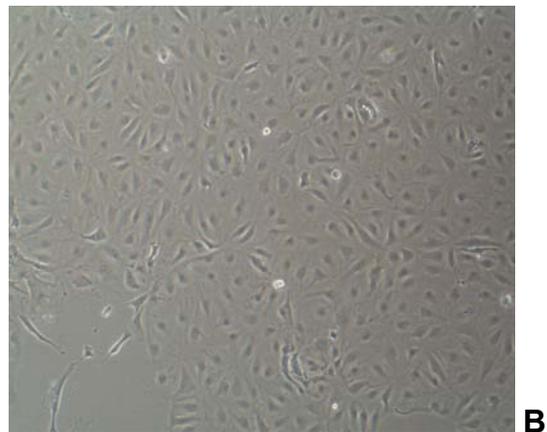
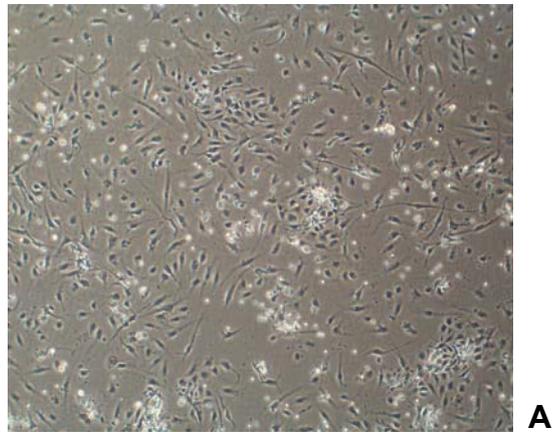


Abbildung 13: Dokumentation der Isolierung von LECs in drei Stufen nach dem Microbead-Verfahren von Miltenyi Biotec. (A) Kultur nach Collagenaseverdau. (B) Kultur nach CD 31-Isolierung. (C) Kultur nach LYVE-1-Isolierung.

4.3.2 Identifizierung mittels durchflusszytometrischer Bestimmung

Der Nachweis einer erfolgreichen magnetischen Separation von Lymphendothelzellen kann mittels FACS-Analyse erbracht werden [Norgall 2007]. Ein spezifischer Marker für Endothelzellen ist dabei das transmembranäre Glykoprotein CD31. Weiterhin wurde mit zwei lymphendothelzell-spezifischen Antikörpern, wie unter 3.2.4 beschrieben, inkubiert: zum einen gegen den Hyaluronsäuremarker LYVE-1 und zum anderen gegen das Mucoprotein Podoplanin. CD31 gilt dabei als Indikator für die Reinheit der Isolierung, LYVE-1 und Podoplanin zeigen den lymphatischen Anteil der Zellpopulation. In Abbildung 14 sind die jeweiligen Antikörperverteilungsmuster (n = 5) dargestellt. Entsprachen die isolierten Zellpopulationen dieser Verteilung, wurden sie für weitere Untersuchungen verwendet.

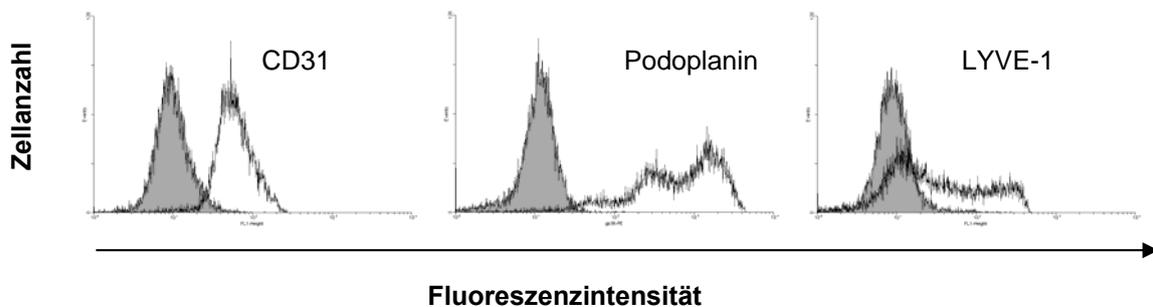


Abbildung 14: Identifizierung der LECs mittels FACS nach immunomagnetischer Separation mit dem Endothelzellmarker CD31 und den lymphspezifischen Markern Podoplanin und LYVE-1.

4.3.3 Identifizierung mittels Immunfluoreszenz

Wie bereits beschrieben befinden sich auf der Zelloberfläche der LECs die Markerproteine CD31 und LYVE-1. Für eine weitere Identitätsuntersuchung mittels Immunfluoreszenz wurden wiederum die dazu aus der Literatur bekannten Antikörper verwendet [Mäkinen 2001]. Die Auswertung erfolgte am Olympus IX2-Mikroskop mit Hilfe der Cell-R- Software.

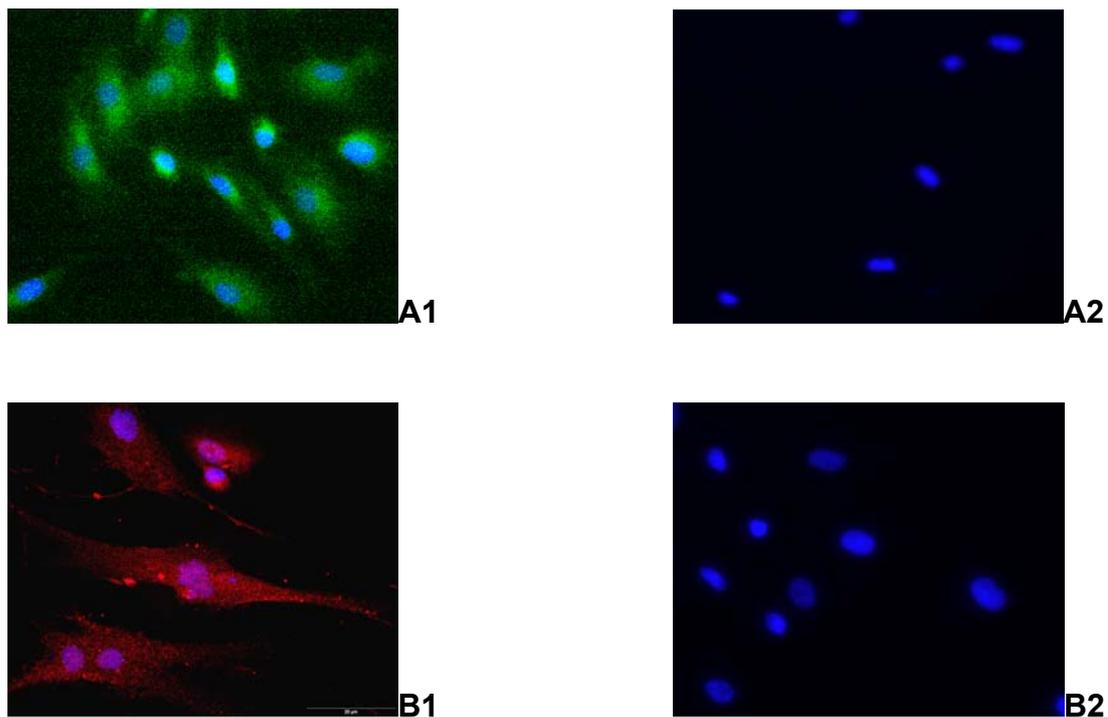


Abbildung 15: Identifizierung der LECs mittels Immunfluoreszenz durch CD31- (A1) und LYVE-1-Antikörper (B1) im Vergleich zur entsprechenden IgG-Negativkontrolle (A2 und B2).

Die Kernfärbung mit DAPI ist in allen Präparaten (Abbildung 15) deutlich dargestellt. Die Negativkontrollen zeigen jeweils ausschließlich die Kernfärbung (A2 und B2). Das Glykoprotein CD31 kommt auf allen Endothelzellen vor und ist auch in Abbildung A1 deutlich zu erkennen. Die Detektion der lymphendothelzell-spezifischen Bindungsstelle für LYVE-1 ist in Abbildung B1 eindeutig dargestellt.

4.3.4 Identifizierung mittels Western Blot

Um die Identität der Zellen auf Proteinebene zu bestätigen, wurden der lymphendothelzell-spezifische Marker LYVE-1 sowie der Endothelzellmarker CD31 im Western Blot dargestellt [Kriehuber 2001, Berman 1996]. Dazu wurden Zellpopulationen miteinander verglichen, die sich auf verschiedenen Isolierungsstufen befanden. β -Tubulin ist in allen Ansätzen als Ladekontrolle verwendet worden. In Abbildung 16 zeigt sich für die nicht-isolierten Zellpopulationen (1-3), die aber die Endothelzellen enthalten, eine schwache Bande bei 130 kDa, die CD 31 entspricht. Ebenso ist bei diesen drei Populationen der positive Anteil LYVE-1 zu erkennen. Die Proben 4 und 6 zeigen LECs nach der zweistufigen Isolierung mit CD31 und LYVE-1. Hier zeigt sich in Abhängigkeit der Gel-Beladung eine deutliche Bande

für CD31 und für den lymphendothelzell-spezifischen Marker. Bande 5 stellt den Rückstand nach einer LYVE-1-Isolierung dar, d.h. die für den Lymphendothelzellmarker negative Fraktion. Es zeigt sich deutlich, dass ein Gemisch unterschiedlicher Proteine abgetrennt wurde, das aber immer noch CD31- und LYVE-1-positive Zellen beinhaltet.

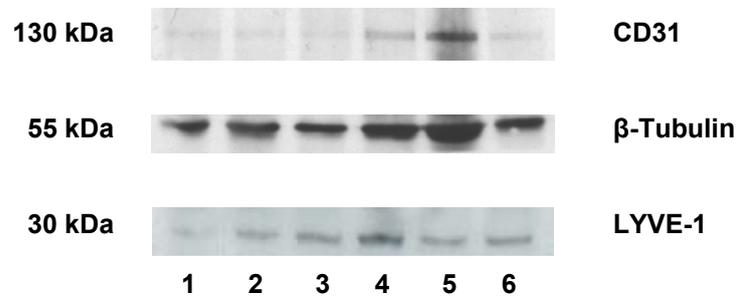


Abbildung 16: Darstellung des Endothelzellmarkers CD 31 im Western Blot, β -Tubulin als Ladekontrolle. Bande 1-3 zeigen die Zellmischung vor dem ersten Isolierungsschritt mit CD 31, Bande 4 und 6 LECs nach LYVE-1-Isolierung. Bande 5 zeigt die LYVE-1-negative Zellfraktion nach entsprechender Isolierung.

4.4 Darstellung pharmakokinetischer Modellberechnungen zu Penicillin G

Nach den in Kapitel 3.2.7 festgelegten Parametern erfolgte die Konzentrationsberechnung in zwei verschiedenen Varianten eines Zwei-Kompartiment-Modells. Die Penicillin G-Dosierungen von 1800 mg, 3000 mg und 6000 mg entsprechen dabei therapeutisch eingesetzten Dosierungen, siehe Kapitel 3.2.8.

Abbildung 17 zeigt die Penicillin G-Verteilung nach i.v.-Applikation im Modell eines Gesunden, $V_1 = 40$ l und $V_2 = 40$ l. Bei der niedrigsten Dosierung von 1800 mg nach 32 Stunden erreicht die Konzentration im ersten Kompartiment 54 mg/l im Stady state. Unter 50 mg/l sinkt die Konzentration bereits nach der zweiten Applikation nach acht Stunden nicht wieder ab. Im zweiten Kompartiment erreicht Penicillin G im Stady state Konzentrationen von 38 mg/l. Wird das Dosierungsintervall beendet, wie bei 144 Stunden zu sehen, sinkt der Wirkstoffspiegel schnell wieder ab, braucht aber im zweiten Kompartiment 36 Stunden, um vollständig eliminiert zu sein. Dieses Verhalten zeigt sich bei allen drei verwendeten Arzneistoffmengen.

Der zeitliche Konzentrationsverlauf entspricht bei einer Gabe von 3000 mg der vorangegangenen Darstellung. Die erreichten Wirkstoffspiegel im Stady state in den beiden Kompartimenten liegen dagegen höher. Für das erste Kompartiment liegt sie bei 89 mg/l, für

Ergebnisse

das zweite bei 64 mg/l. Eine nochmalige Steigerung zeigt sich bei der Applikation von 6000 mg. Nach dem Übergang in den gesättigten Zustand werden für das erste Kompartiment Konzentrationen von 179 mg/l erreicht und für das zweite 128 mg/l.

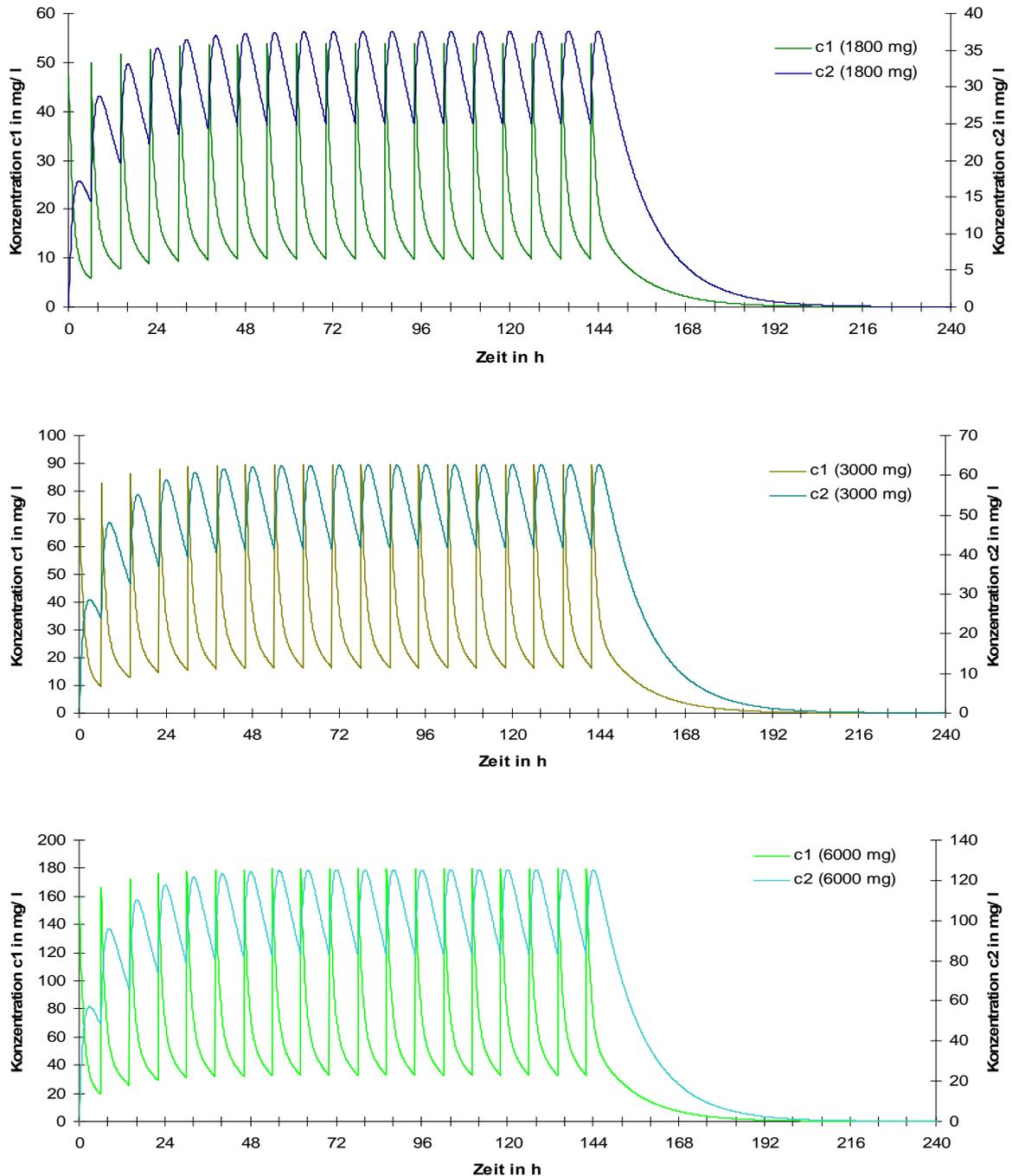


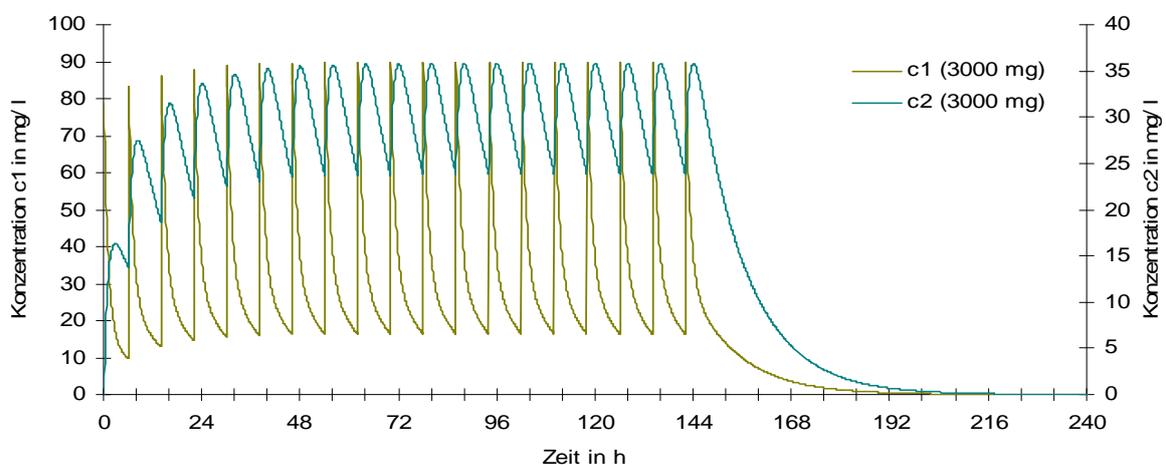
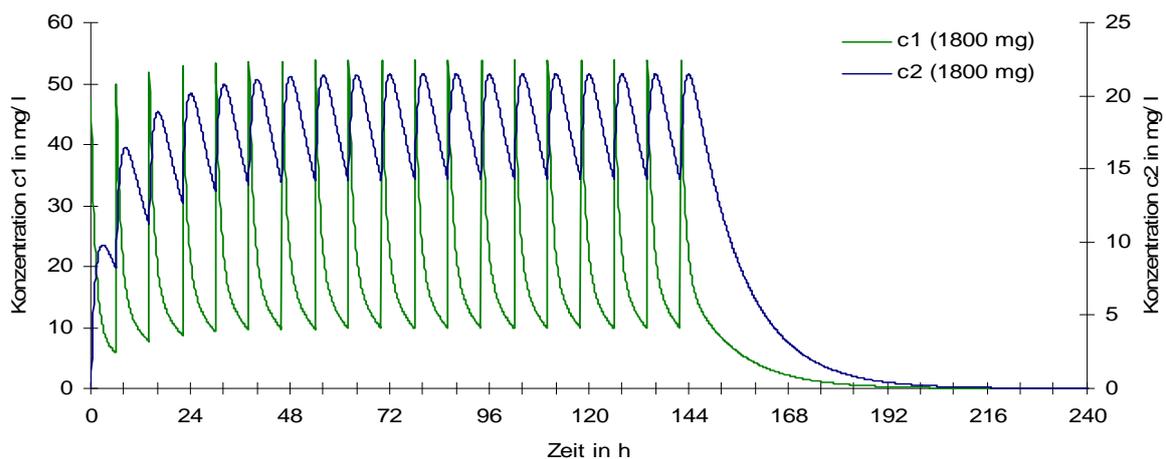
Abbildung 17: Konzentrationsverlauf von Penicillin G im Zwei-Kompartiment-Modell ($V_1 = 40$ l, $V_2 = 40$ l) bei Dosierungen mit 1800 mg, 3000 mg, 6000 mg.

Ergebnisse

In Abbildung 18 soll ein ödematöser Zustand und damit eine Zunahme des Verteilungsvolumens im zweiten Kompartiment ($V_2 = 70 \text{ l}$) dargestellt werden. Der Arzneistoff verhält sich im zeitlichen Verlauf entsprechend den Beschreibungen zu Abbildung 17. Die erreichten Konzentrationen im ersten Kompartiment im Steady state verhalten sich auch entsprechend. Für die Dosierung von 1800 mg ergibt sich eine Konzentration von 52 mg/l, für 3000 mg eine Konzentration von 90 mg/l und bei einer Dosierung mit 6000 mg werden Wirkspiegel von 180 mg/l erreicht.

Anders verhält es sich im zweiten, Ödem-imitierenden Kompartiment. Bei einer Penicillin G-Gabe von 1800 mg werden hier im Steady state nur Wirkspiegel von 22 mg/l erreicht. Entsprechendes zeigt sich für die Dosierung mit 3000 mg und 6000 mg. Hier ergeben sich im gesättigten Zustand Konzentrationen von 36 mg/l und 72 mg/l.

Im Vergleich der zweiten Kompartimente liegen damit die Penicillin G-Konzentrationen beim Modell eines Gesunden über denen in der Ödem-Darstellung.



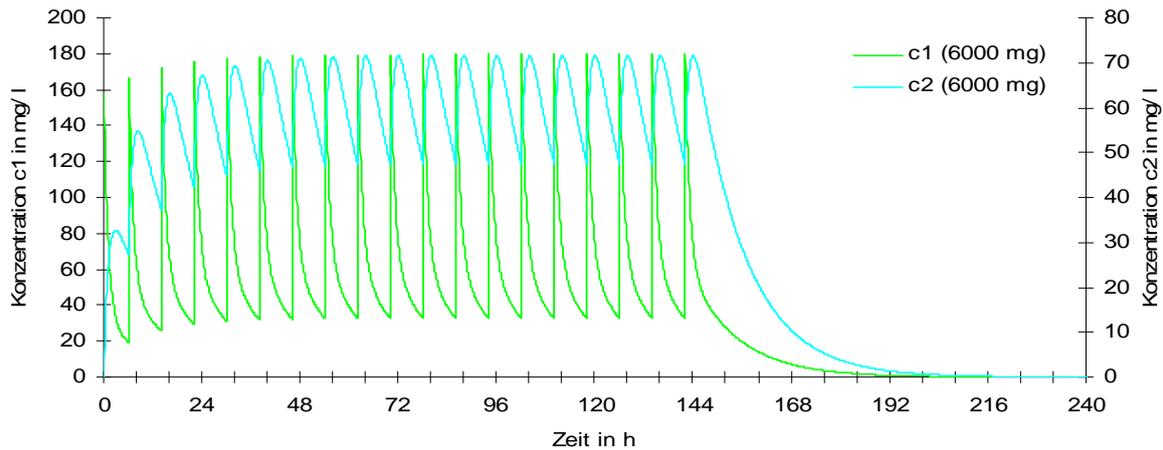


Abbildung 18: Konzentrationsverlauf von Penicillin G im Zwei-Kompartiment-Modell ($V_1 = 40$ l, $V_2 = 70$ l) bei Dosierungen mit 1800 mg, 3000 mg, 6000 mg.

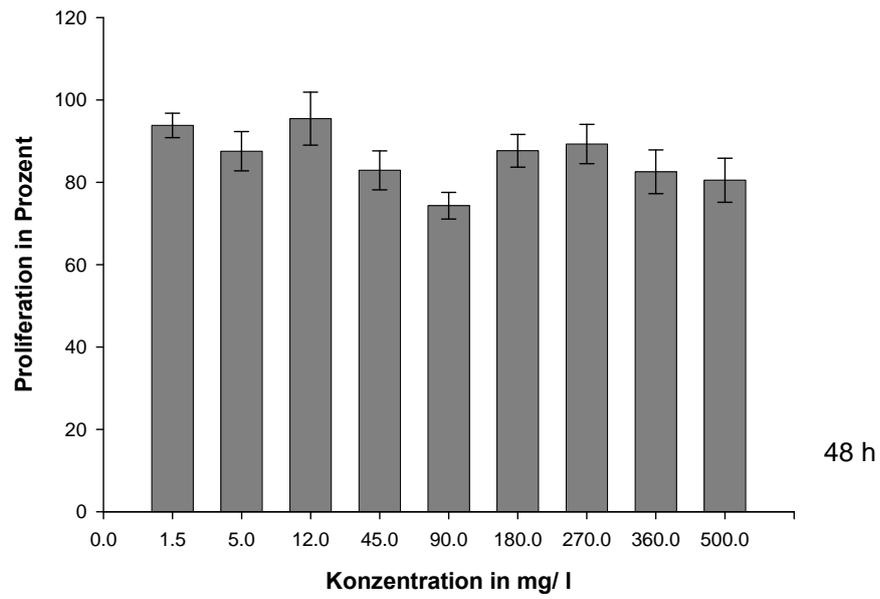
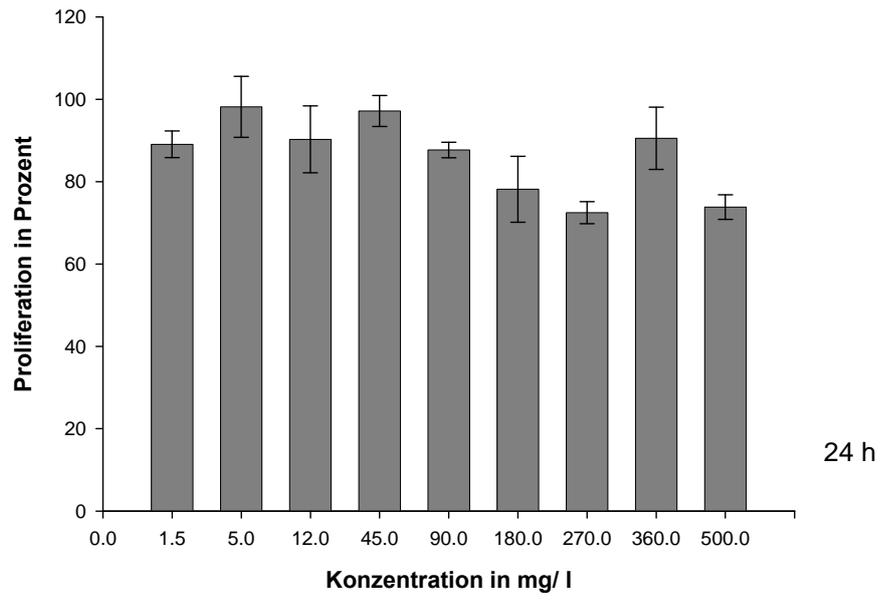
4.5 Einfluss von Penicillin G auf Lymphendothelzellen

Die isolierten und identifizierten LEC-Populationen wurden nun für die Fragestellung genutzt, welchen Einfluss die Therapie eines Erysipels mit Penicillin G auf die Lymphendothelzellen und damit auf den Zustand des Lymphsystems nimmt.

4.5.1 Einfluss von Penicillin G auf die Proliferation von LECs

Um die Proliferation von LECs unter dem Einfluss der unterschiedlichen Penicillin G-Konzentrationen zu bestimmen, wurden die gemessenen Extinktionswerte auf die Kontrolle normiert. Abbildung 19 zeigt die Änderung der Proliferation in Abhängigkeit der Konzentration zu drei unterschiedlichen Inkubationszeiten. Bei der Inkubationszeit von 24 Stunden ist mit zunehmender Konzentration des Antibiotikums eine deutliche, wenn auch unregelmäßige, Abnahme der proliferativen Aktivität zu erkennen. Bei 270 und 500 mg/l werden nicht einmal mehr 80 % der ursprünglichen Proliferationsrate erreicht. Die Untersuchungen nach 48 h zeigen ebenfalls einen Rückgang der Proliferation. Dieser liegt aber nur für die Konzentration von 90 mg/l über 20 %. Die Abnahme zeigt sich dementsprechend weniger deutlich. Nach 72 h wird keine Änderung der Proliferation bei steigender Penicillin G-Konzentration deutlich. Vielmehr befinden sich die Proliferationswerte der unterschiedlichen Konzentrationen in einem Bereich.

Ergebnisse



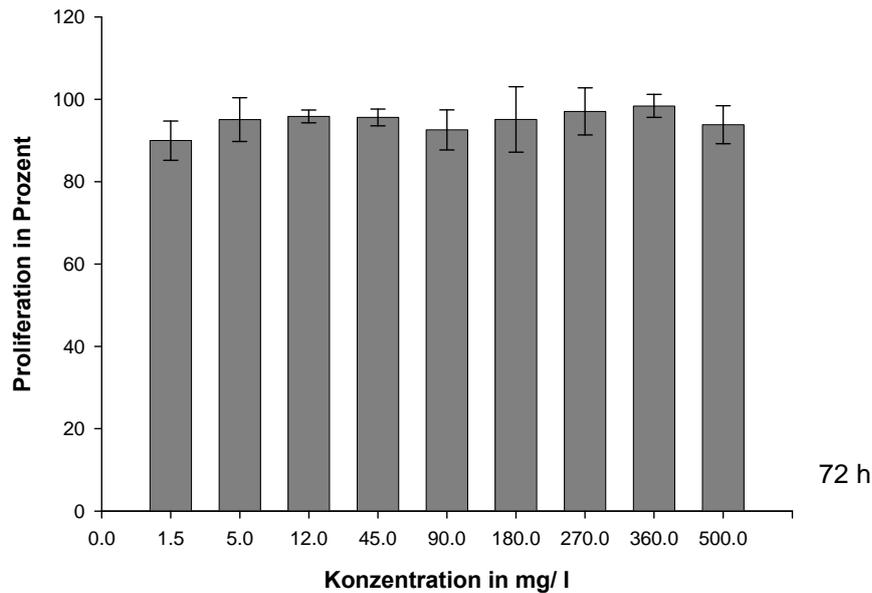
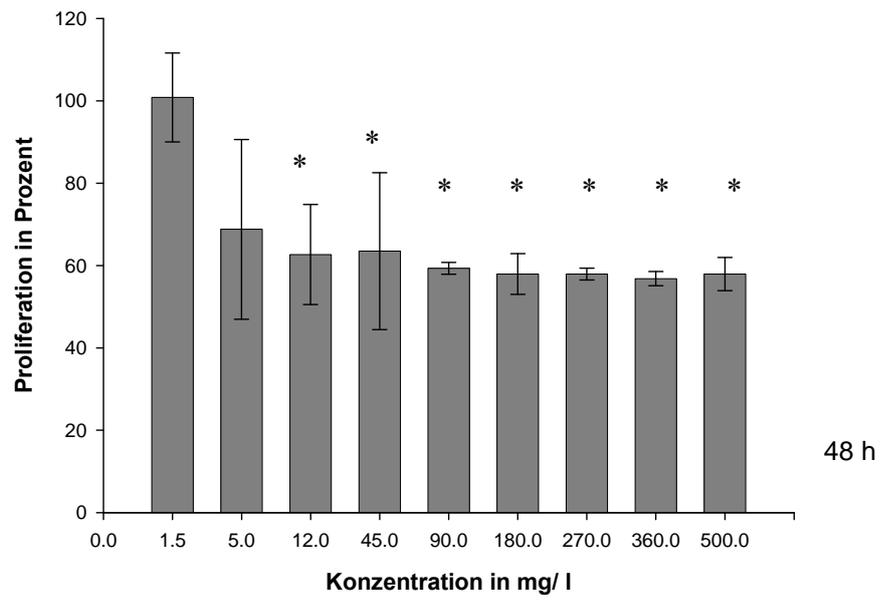
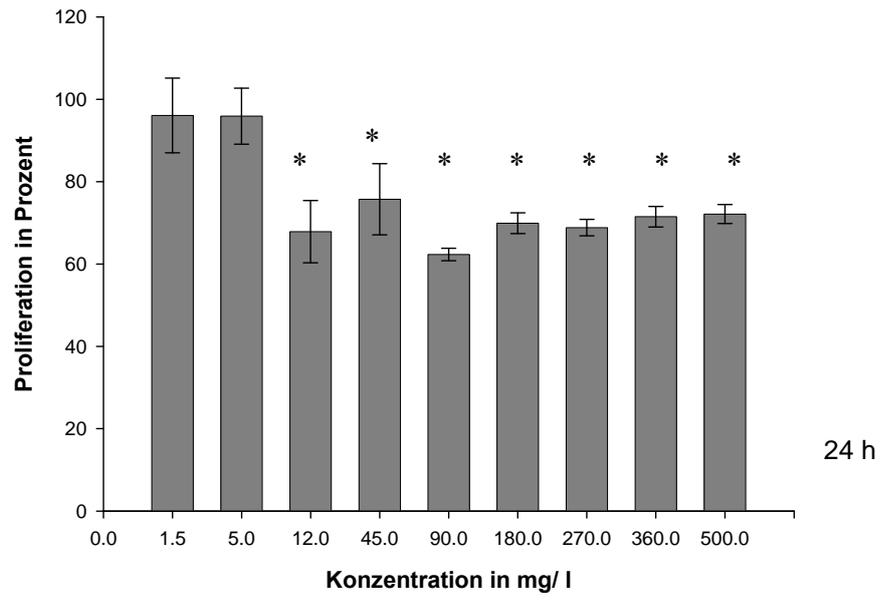


Abbildung 19: Änderung der Proliferation von LECs in Prozent in Abhängigkeit steigender Penicillin G-Konzentrationen in mg/l über 24, 48 und 72 h. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe der BrdU-Methode. Die Werte wurden auf die Nullkontrolle normiert (n=8).

4.5.2 Einfluss von Penicillin G auf die Vitalität von LECs

Für die Bestimmung der Vitalität wurden die Extinktionswerte, gemessen bei 620 nm, ebenfalls auf die Nullkontrolle normiert. Über den Beobachtungszeitraum von drei Tagen zeigt sich ein deutlicheres Bild in der konzentrationsabhängigen Beeinflussung der Vitalität als bei der Proliferationsuntersuchung. Nach 24 h sinkt die Proliferation ab einer Konzentration von 12 mg/l deutlich unter 80 %. Nach einem Zeitraum von zwei Tagen gilt dies auch für die Konzentration von 5 mg/l. Für die Konzentrationen ab 90 mg/l reduziert sich in diesem Zeitraum die Vitalität sogar um 40 %. Nach der dritten Messzeit von 72 h liegt auch der Wert für die Vitalität der geringsten Penicillin G-Konzentration (1,5 mg/l) unter 80 % gegenüber der Nullkontrolle. Damit zeigt sich in physiologischen Konzentrationen bereits nach 24 h ein toxischer Effekt des Antibiotikums, der sich über die zwei nachfolgenden Tage noch deutlicher ausprägt.

Ergebnisse



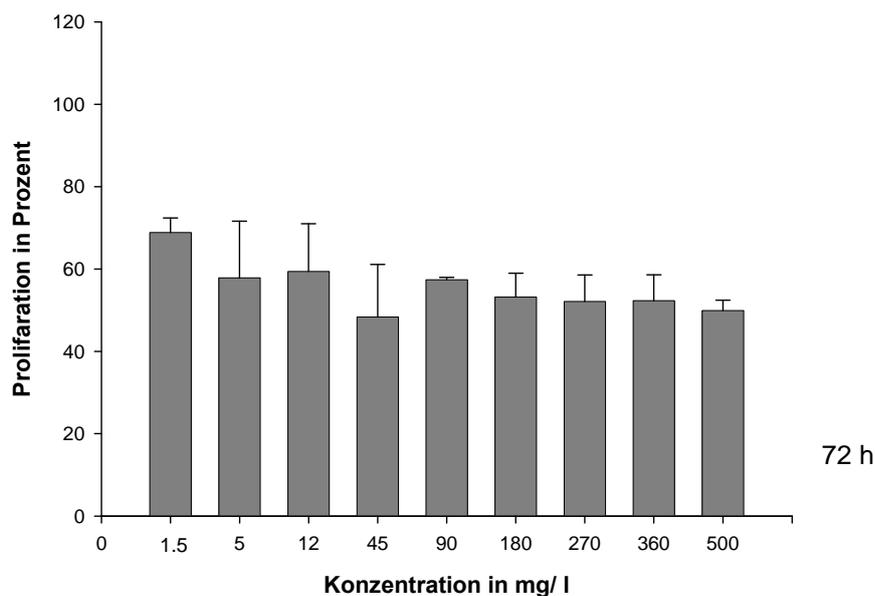


Abbildung 20: Änderung der Vitalität von LECs in Prozent in Abhängigkeit steigender Penicillin G-Konzentrationen in mg/l über 24, 48 und 72 h. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des Kristallviolett-Tests. Die Werte wurden auf die Nullkontrolle normiert (n = 6). * P < 0,05.

4.6 Einfluss von Penicillin G auf HaCaT-Zellen

Den Ergebnissen der LEC-Versuche unter Penicillin G sollte ein Modell gegenüber gestellt werden, das ebenfalls therapeutische Bedeutung hat. Die HaCaT-Zelllinie stellt dabei ein Epidermismodell dar, an dem die Reepithelisierung unter Penicillin G getestet wurde. Entsprechend den Versuchsansätzen zur Proliferation und Vitalität bei Lymphendothelzellen unter Penicillin G erfolgten die Untersuchungen auch an HaCaT-Zellen.

4.6.1 Einfluss von Penicillin G auf die Reepithelisierung im Modell mit HaCaT-Zellen

Wie unter 3.2.10.1 beschrieben wurden die Zellen in Kulturplatten gezüchtet, es wurde unter definierten Bedingungen eine Läsion gesetzt und über zwei Tage inkubiert. Innerhalb dieser zwei Tage wurde die Wiederherstellung der künstlichen Epidermisschicht bildanalytisch dokumentiert und ausgewertet. Mit Hilfe des Olympus IX2-Mikroskops und der Cell R-Software wurde bei fünf verschiedenen Penicillin G-Konzentrationen über den gesamten Inkubationszeitraum die noch nicht reepithelisierte Restfläche dargestellt.

Ergebnisse

Die graphische Auswertung der Bildanalytik erfolgte mit Hilfe des Programms Origin 7G. Die dabei gewählte Darstellung geschieht mittels Kurven-Fit nach Hill. Durch Integration der Daten der reepithelisierten Fläche lässt sich der Einfluss der unterschiedlichen Penicillin G-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle veranschaulichen. Dabei zeigt sich für alle verwendeten Konzentrationen von 1,5 bis 500 mg/l kein negativer Einfluss von Penicillin G auf die zu reepithelisierende Fläche. Vielmehr lässt sich tendenziell ein positiver Effekt des Antibiotikums auf die Defektheilung erkennen, wie in Abbildung 21 bis 26 dargestellt. Die sechs Messpunkte der Graphik entsprechen den in der Tabelle darunter pro Messzeit (0 bis 48 h) aufgeführten Bildausschnitten.

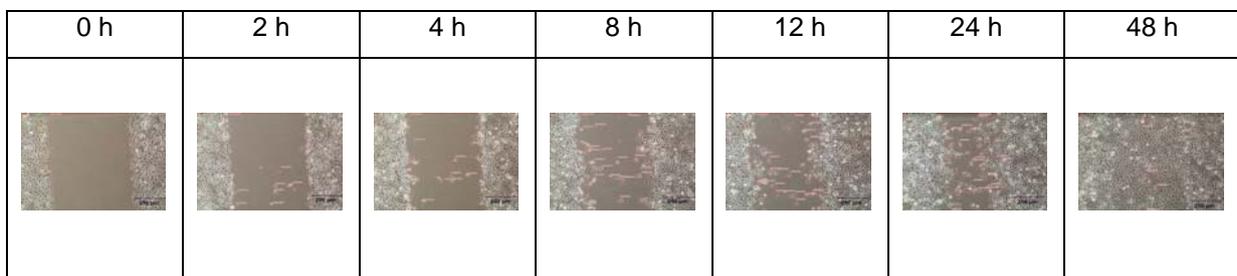
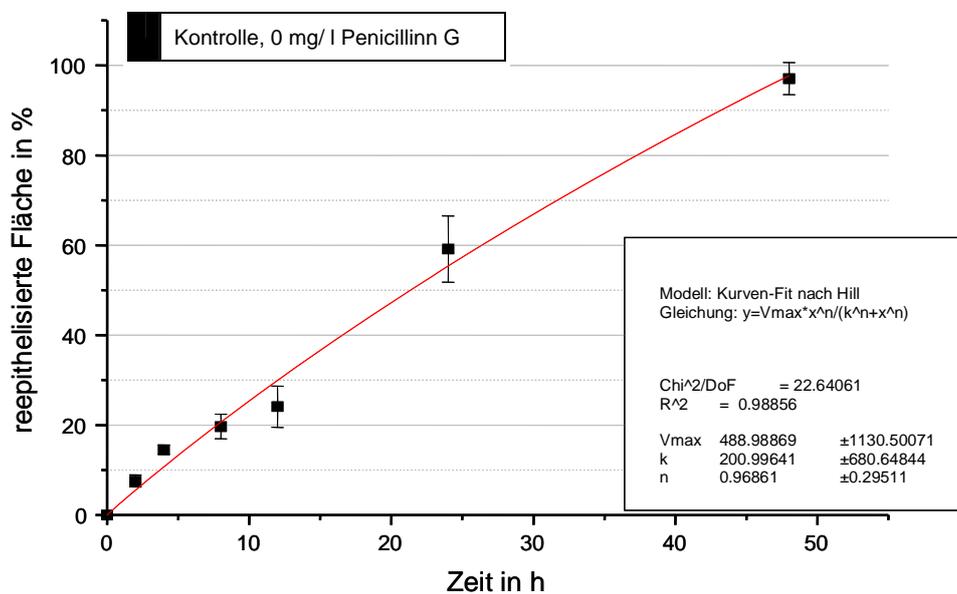
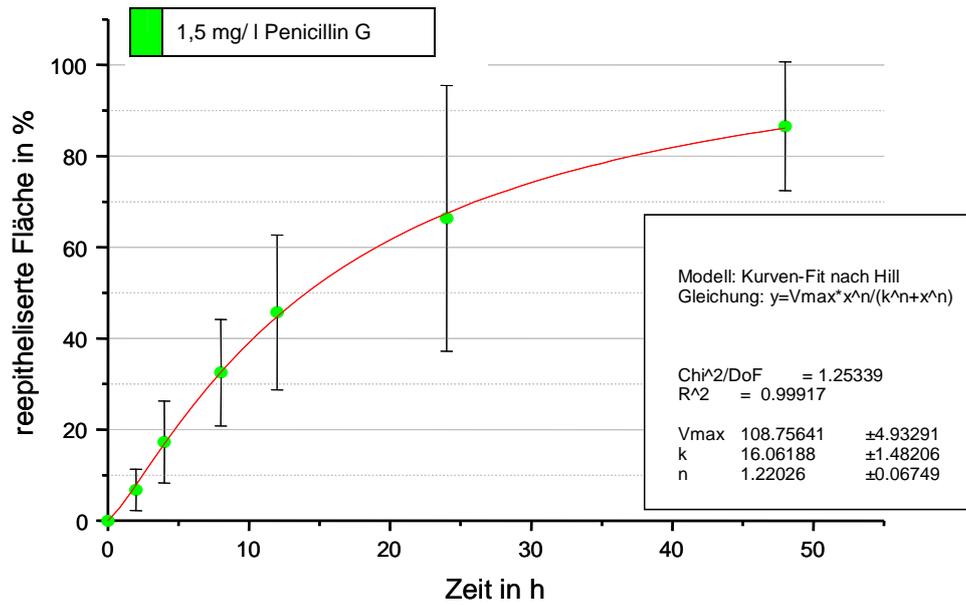


Abbildung 21: Als Kontrolle wurde über einen Zeitraum von 48 h ohne Zugabe von Penicillin G die noch nicht reepithelisierte Fläche bildanalytisch vermessen. Die Graphik zeigt mittels Kurven-Fit nach Hill den Verlauf der Reepithelisierung. Den Messpunkten bei 0, 2, 4, 8, 12, 24 und 48 h sind die entsprechenden Bilddokumentationen aus der Tabelle zuzuordnen. Sie zeigt den Reepithelisierungsvorgang in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Ergebnisse



| 0 h | 2 h | 4 h | 8 h | 12 h | 24 h | 48 h |
|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| | | | | | | |

Abbildung 22: Nach Zugabe von 1,5 mg/l Penicillin G wurde über einen Zeitraum von 48 h inkubiert. Die noch nicht reepithelisierte Fläche wurde bildanalytisch vermessen. Die Graphik zeigt mittels Kurven-Fit nach Hill den Verlauf der Reepithelisierung. Den Messpunkten bei 0, 2, 4, 8, 12, 24 und 48 h sind die entsprechenden Bilddokumentationen aus der Tabelle zuzuordnen. Sie zeigt den Reepithelisierungsvorgang in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei der eingesetzten Penicillin G Konzentration.

Ergebnisse

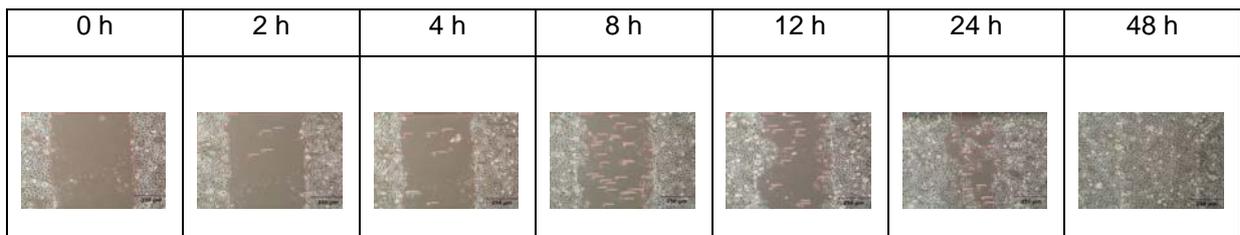
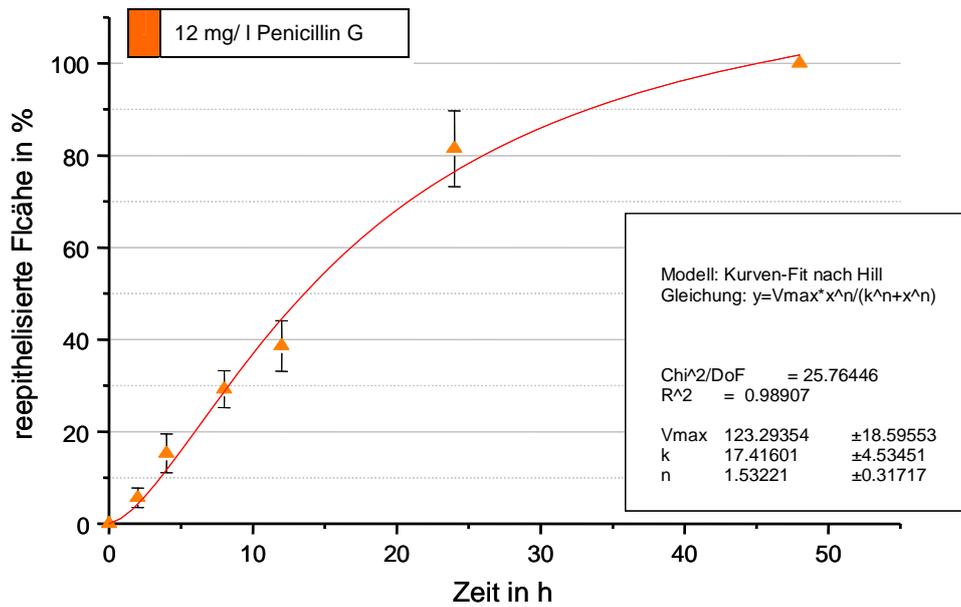
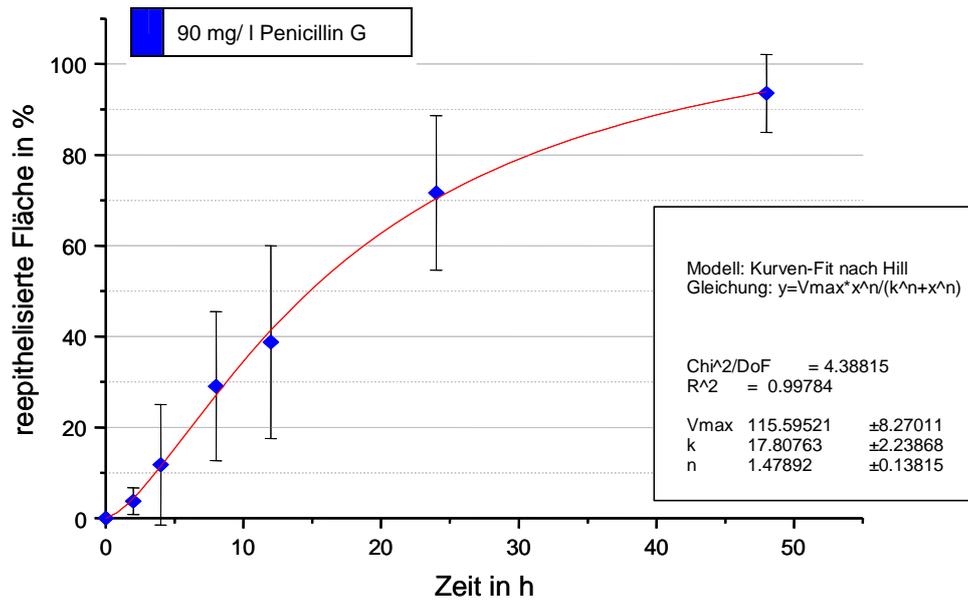


Abbildung 23: Nach Zugabe von 12 mg/l Penicillin G wurde über einen Zeitraum von 48 h inkubiert. Die noch nicht reepithelisierte Fläche wurde bildanalytisch vermessen. Die Graphik zeigt mittels Kurven-Fit nach Hill den Verlauf der Reepithelisierung. Den Messpunkten bei 0, 2, 4, 8, 12, 24 und 48 h sind die entsprechenden Bilddokumentationen aus der Tabelle zuzuordnen. Sie zeigt den Reepithelisierungsvorgang in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei der eingesetzten Penicillin G Konzentration.

Ergebnisse



| 0 h | 2 h | 4 h | 8 h | 12 h | 24 h | 48 h |
|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| | | | | | | |

Abbildung 24: Nach Zugabe von 90 mg/l Penicillin G wurde über einen Zeitraum von 48 h inkubiert. Die noch nicht reepithelisierte Fläche wurde bildanalytisch vermessen. Die Graphik zeigt mittels Kurven-Fit nach Hill den Verlauf der Reepithelisierung. Den Messpunkten bei 0, 2, 4, 8, 12, 24 und 48 h sind die entsprechenden Bilddokumentationen aus der Tabelle zuzuordnen. Sie zeigt den Reepithelisierungsvorgang in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei der eingesetzten Penicillin G Konzentration.

Ergebnisse

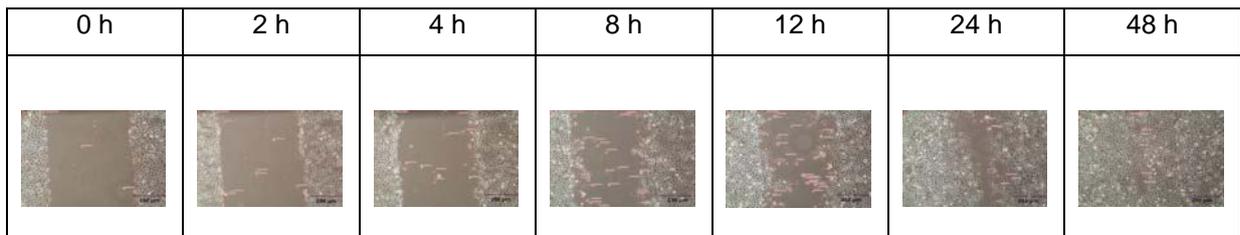
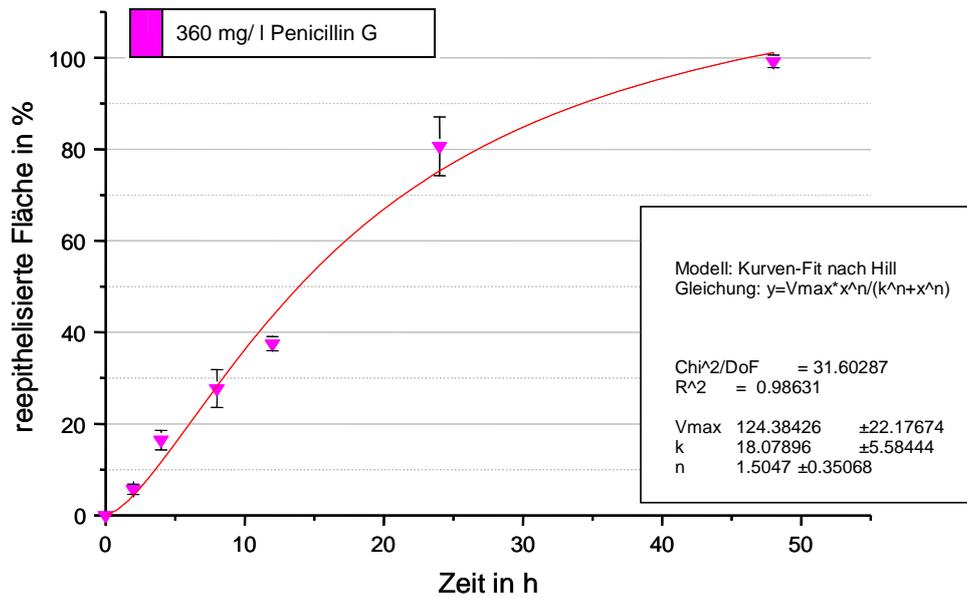


Abbildung 25: Nach Zugabe von 360 mg/l Penicillin G wurde über einen Zeitraum von 48 h inkubiert. Die noch nicht reepithelisierte Fläche wurde bildanalytisch vermessen. Die Graphik zeigt mittels Kurven-Fit nach Hill den Verlauf der Reepithelisierung. Den Messpunkten bei 0, 2, 4, 8, 12, 24 und 48 h sind die entsprechenden Bilddokumentationen aus der Tabelle zuzuordnen. Sie zeigt den Reepithelisierungsvorgang in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei der eingesetzten Penicillin G Konzentration.

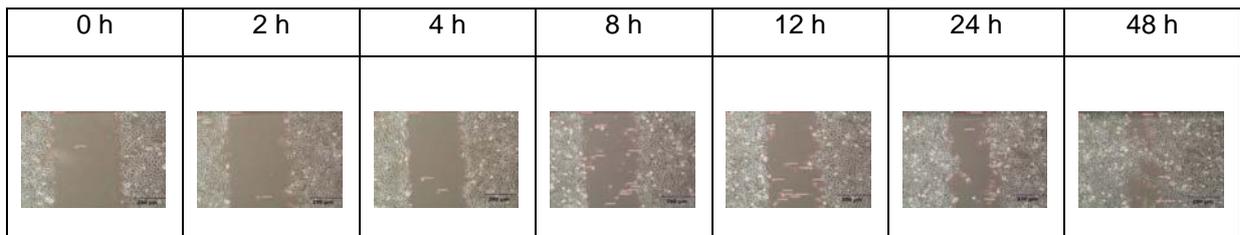
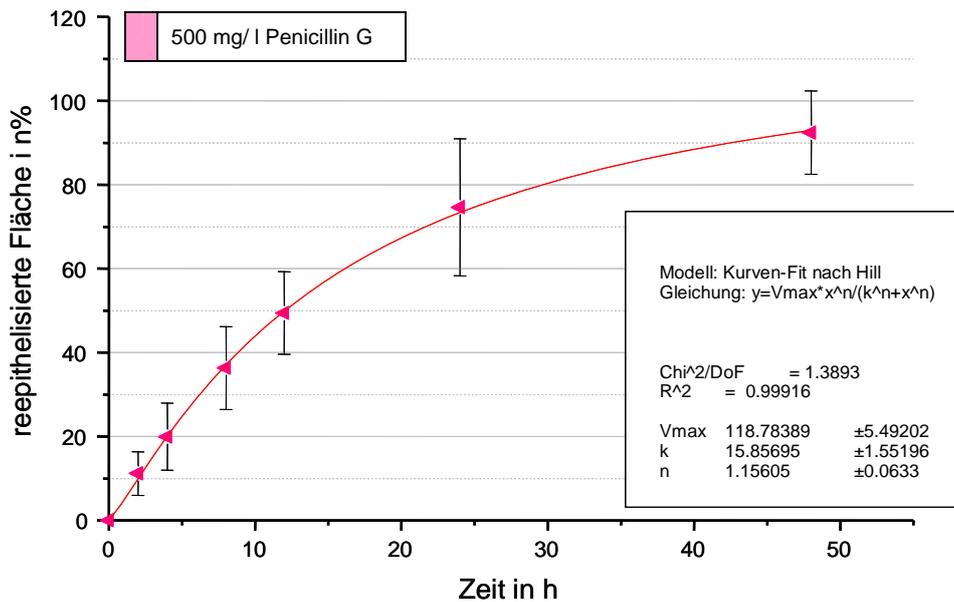


Abbildung 26: Nach Zugabe von 500 mg/l Penicillin G wurde über einen Zeitraum von 48 h inkubiert. Die noch nicht reepithelisierte Fläche wurde bildanalytisch vermessen. Die Graphik zeigt mittels Kurven-Fit nach Hill den Verlauf der Reepithelisierung. Den Messpunkten bei 0, 2, 4, 8, 12, 24 und 48 h sind die entsprechenden Bilddokumentationen aus der Tabelle zuzuordnen. Sie zeigt den Reepithelisierungsvorgang in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei der eingesetzten Penicillin G Konzentration.

4.6.2 Einfluss von Penicillin G auf die Proliferation von HaCaT-Zellen

Entsprechend den Proliferationsuntersuchungen an LECs wurden mit der HaCaT-Zelllinie im Konzentrationsbereich 1,5 bis 500 mg/l ebenfalls BrdU-Tests durchgeführt. Die Aussaat und Behandlung der Zellen erfolgten wie unter 3.2.10.4 beschrieben. Die verwendeten Konzentrationen wurden in größeren Abständen gewählt, da aufgrund des vorangegangenen Reepithelisierungsmodells keine Effekte in kleinen Konzentrationsabständen zu erwarten waren. Die Kontrolle, die kein Penicillin G enthielt, wurde bei jedem Durchgang (n = 5)

Ergebnisse

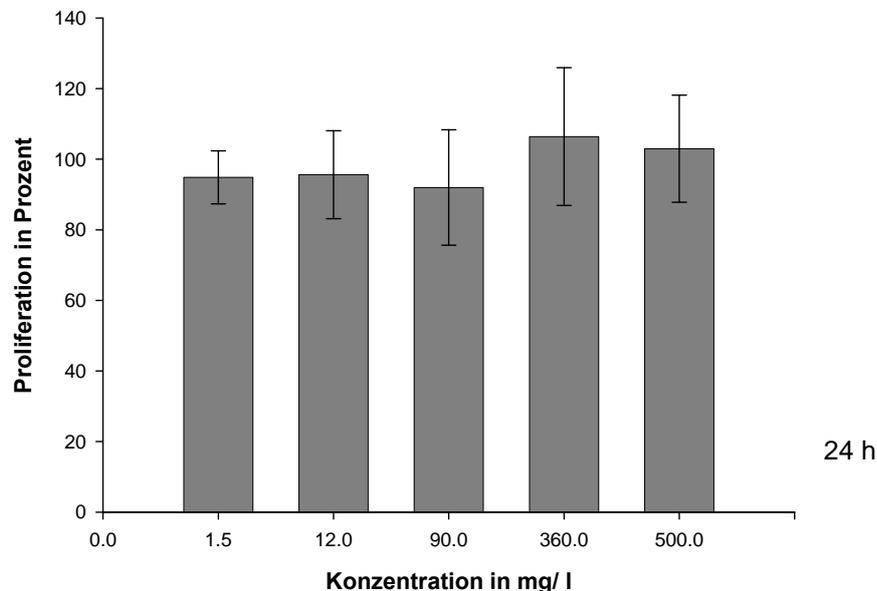
mitgeführt. Sie wurde, wie auch bei den LEC-Untersuchungen, auf 100 Prozent gesetzt und alle Messwerte wurden auf die Kontrolle normiert.

Nach 24 h zeigt sich kein signifikanter Einfluss auf die proliferative Aktivität bei den eingesetzten Konzentrationen. Penicillin G zeigt keinen Effekt auf die Vermehrung der Zellen.

Bei der Inkubation über 48 h ist bei steigender Penicillin G-Konzentration ein tendenziell positiver Einfluss bis zu einer Konzentration von 360 mg/l zu erkennen. Auf die höchste Konzentration von 500 mg/l trifft diese Aussage nicht mehr zu: Hier sinkt die Proliferationsrate in der Tendenz wieder ab. Signifikant sind diese Unterschiede allerdings nicht.

Nach drei Tagen zeigt sich, wie in Abbildung 22 gezeigt, bis zu einer Konzentration von 90 mg/l kein Einfluss des Antibiotikums. Erst ab einer Konzentration von 360 mg/l steigt prozentual die Proliferation an, was sich auch in der höchsten Penicillin G-Konzentration von 500 mg/l fortsetzt. Dies ist ebenfalls nur als Tendenz sichtbar. Ein signifikanter Unterschied ist nicht zu erkennen.

Damit lässt sich feststellen, dass Penicillin G auch bei unphysiologisch hohen Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Proliferation der HaCaT-Zellen hat.



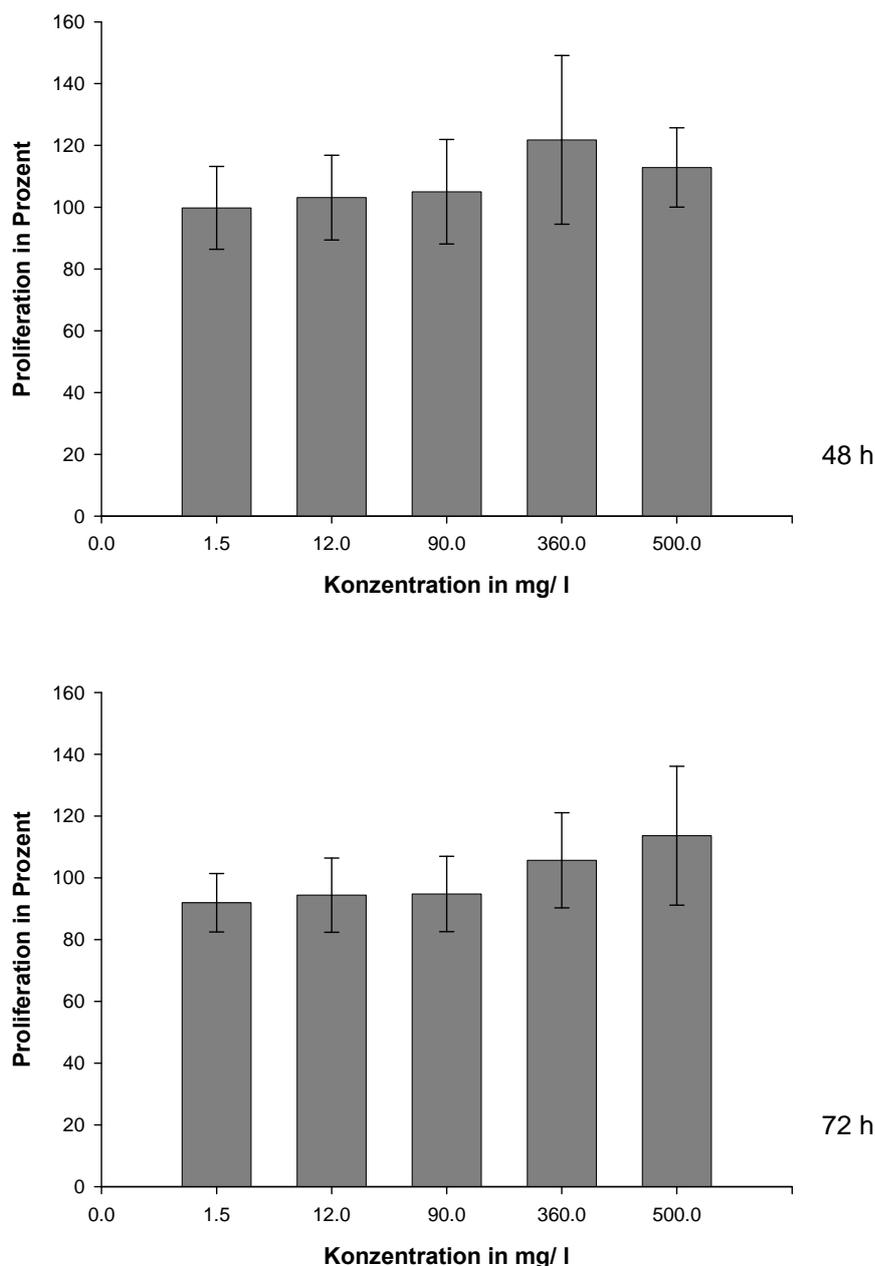


Abbildung 22: Einfluss von Penicillin G im Konzentrationsbereich von 1,5 bis 500 mg/l auf die Proliferation von HaCat-Zellen über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 h. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe der BrdU-Methode. Die Werte wurden auf die Nullkontrolle normiert (n = 6).

4.6.3 Einfluss von Penicillin G auf die Vitalität von HaCaT-Zellen

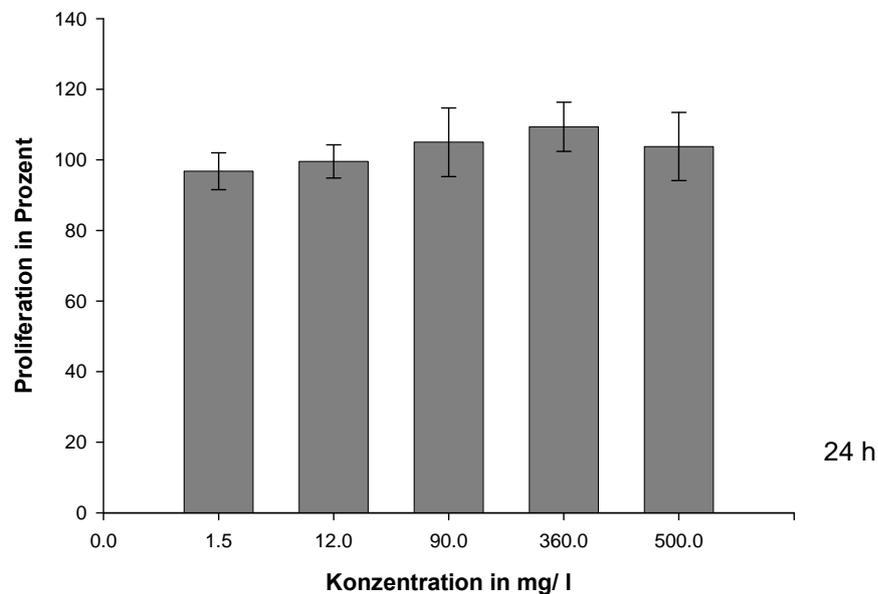
Der Einfluss von Penicillin G auf die Vitalität der HaCaT-Zellen erfolgte analog der Untersuchungen zu den LECs. Die verwendeten Konzentrationen lagen zwischen 1,5 und 500 mg/l, mit den gleichen Intervallen wie bei der Proliferationsuntersuchung von 12, 90 und 360 mg/l. Die Vitalität wurde über drei Tage bestimmt. Jeweils gegen eine Nullkontrolle ohne

Ergebnisse

Penicillin G wurde die Extinktion bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf den zu hundert Prozent gesetzten Nullwert normiert.

Wie in Abbildung 23 dargestellt, ist 24 h nach der Inkubation eine Tendenz für eine Steigerung der Vitalität bis zu 300 mg/l zu erkennen. Bei 500 mg/l sinkt die Vitalität leicht. Wie bei der entsprechenden Proliferationsuntersuchung sind die Unterschiede ebenfalls nicht signifikant. Ein entsprechendes Verhalten der HaCaT-Zellen unter Penicillin G-Einfluss ist auch nach 48 h zu erkennen. Nach 72 h ist kein Unterschied zwischen den einzelnen Antibiotikum-Konzentrationen und der Nullkontrolle zu erkennen.

Somit kann auch der Einfluss von Penicillin G auf die Vitalität der HaCaT-Zellen als nicht signifikant angesehen werden.



Ergebnisse

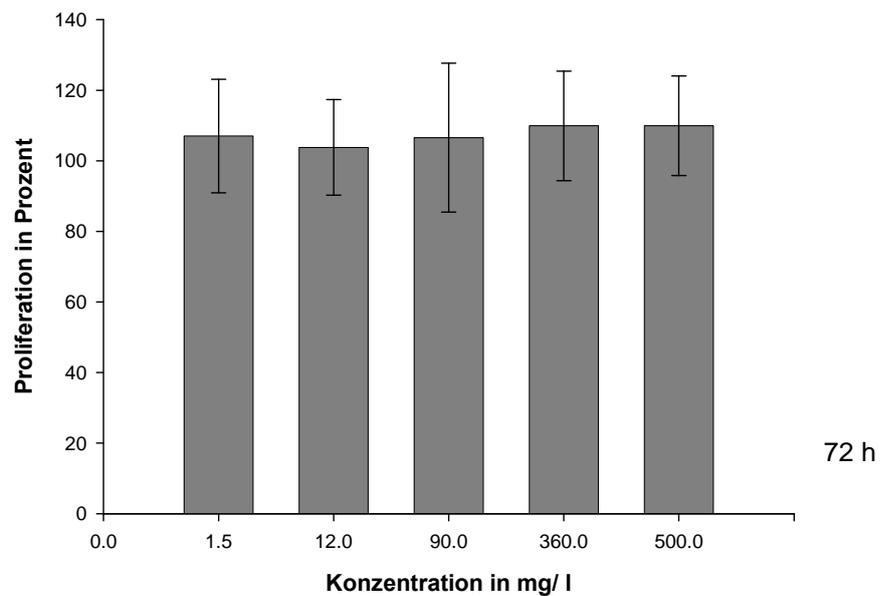
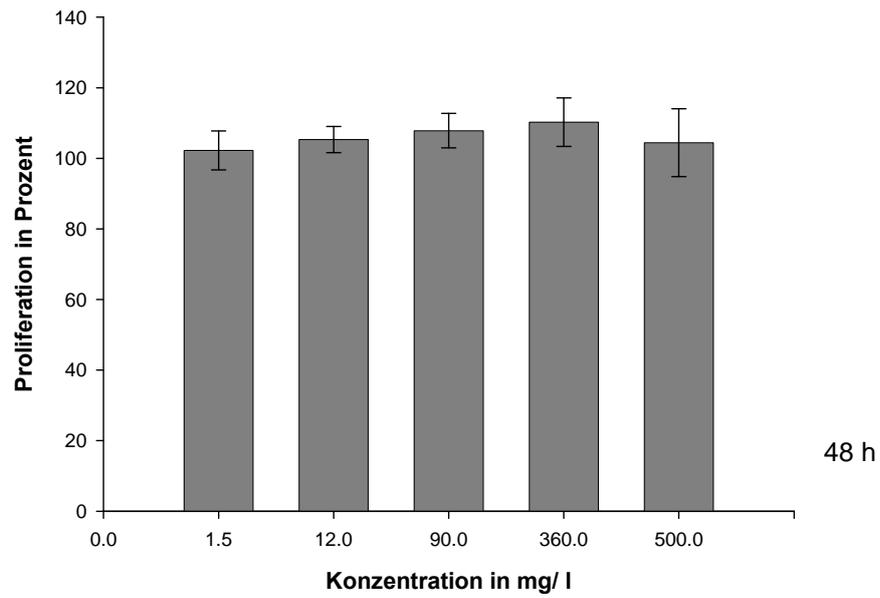


Abbildung 23: Einfluss von Penicillin G im Konzentrationsbereich von 1,5 bis 500 mg/l auf die Vitalität von HaCaT-Zellen über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 h. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des Kristallviolett-Tests. Die Werte wurden auf die Nullkontrolle normiert (n = 6).

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Gabe von Penicillin G eine toxische Wirkung auf Lymphendothelzellen ausübt. Die theoretischen Überlegungen zum Einfluss von Penicillin G wurden mit Hilfe pharmakokinetischer Berechnungen in einem Zwei-Kompartiment-Modell dargestellt. Auf experimenteller Ebene sollte dazu zum einen ein vitales Modell, das HET-CAM-Modell, etabliert werden, zum anderen sollte im zellulären Modell mit Hilfe von Lymphendothelzellkulturen der Einfluss des Antibiotikums auf Proliferation und Vitalität der Zellen untersucht werden. Zur Einordnung der erhaltenen Ergebnisse wurden Proliferations- und Vitalitätsuntersuchungen auch an der HaCaT-Zelllinie in einem Epithelisierungsmodell untersucht.

5.1 Auswahl lymphendothelzell-spezifischer Marker

Aus der Literatur sind für den immunhistochemischen Nachweis lymphendothelzell-spezifischer Strukturen die Marker LYVE-1, Podoplanin und Prox-1 bekannt [Laurent 1992, Breiteneder-Geleff 1999, Wigle 2002]. Des Weiteren ist bekannt, dass neben lymphatischem Gewebe auch die lymphatischen Strukturen des humanen Vorhautgewebes positiv für die drei Marker sind [Wilting 1993]. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen am HET-CAM-Modell dienten diese Kenntnisse zur Darstellung von Positivkontrollen für die immunhistochemischen Untersuchungen an CAM-Präparaten.

Die HE-Färbung erlaubt dank der Bläuung der Gewebequerschnitte eine eindeutige morphologische Zuordnung und einen ersten Eindruck, ob sich im vorliegenden Abschnitt Gefäßanschnitte befinden (Abbildung 5). Nach dieser Auswahl erfolgte die Färbung mit den lymphspezifischen Antikörpern, wobei sich die unter 3.2.1 beschriebene Methode als zuverlässig und reproduzierbar erwies. Für die extrazellulären Marker LYVE-1 und Podoplanin sowie für die Kernfärbung mit Prox-1 zeigte sich sowohl im Lymphknotengewebe als auch im humanen Vorhautgewebe eine charakteristische Färbung lymphatischer Strukturen (Abbildung 6, 7 und 8). Damit konnten die aus der Literatur bekannten immunhistochemischen Nachweise für lymphendothelzell-spezifische Strukturen bestätigt und die Methode zuverlässig etabliert werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen mit LYVE-1, Podoplanin und Prox-1 am Querschnitt der CAM zeigen im Vergleich zu den Kontrollbildern von Lymphknoten und humanem Vorhautgewebe ein anderes Färbeverhalten. Einzig Prox-1 zeigte eine positive Reaktion, die mit der von Papoutsis beschriebenen Sequenzhomologie von

94 % erklärt werden kann [Papoutsis 2001]. Eine Erklärung für die negative Reaktion der Antikörper gegen LYVE-1 und Podoplanin in der CAM besteht darin, dass die entsprechenden Sequenzen der Marker im humanen und aviären Gewebe, im Gegensatz zu Prox-1, nicht die ausreichende Homologie besitzen. Damit ist die Darstellung einer nachweisbaren Bindung der Antikörper an die aviären Markerstrukturen nicht möglich.

5.2 Darstellung angiogenetischer Vorgänge im HET-CAM-Modell

Wie Ribatti und Kollegen zeigen konnten, ist das HET-CAM-Modell, als vitales Modell, geeignet angiogenetische Vorgänge darzustellen [Ribatti 1997 b]. Ebenso ist es möglich, an der CAM die an der Angiogenese beteiligten VEGF-Rezeptoren mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren zu stimulieren [Oh 1997, Wilting 1992]. Die in dieser Arbeit durchgeführte Stimulierung der Angiogenese mittels VEGF-C sollte durch die Induktion der Lymphgefäßentwicklung ein Untersuchungsmedium für die Irritabilitätstestung von Penicillin G liefern. Eine Stimulierung mit VEGF-C bringt sowohl auf hämo- als auch auf lymphovaskulärer Ebene einen angiogenetischen Vorschub. Die Beeinflussung beider Systeme durch den Wachstumsfaktor erklärt sich aus der physiologischen Entwicklung [Achen 1998, Cursiefen 2004, Baluk 2005]. Interessanterweise könnte nach Angiogenese-Stimulierung histochemisch im Querschnitt eine prälymphatische Schleifen- bzw. Loopbildung an der Oberseite der CAM dargestellt werden. Diese war an CAM-Querschnitten, die nicht mit VEGF-C behandelt waren, nicht zu erkennen. Als Schlussfolgerung daraus kann von einem eindeutigen Zusammenhang zwischen der Angiogenesestimulierung und der Ausbildung der Loops ausgegangen werden. Der Nachweis, dass es sich dabei um lymphatische Strukturen handelt, gelang mittels immunhistochemischer Anti-Prox-1-Färbung. Möglich wurde dies durch die bereits erwähnte Homologie zwischen humanem Gewebe und Huhn [Ribatti 1997 b, Zinovieva 1996].

Wie in Abbildung 10 dargestellt zeigt sich keine Färbung in CAM-Bereichen, die nicht lymphatisch innerviert sind (A), wohingegen Abschnitte mit lymphatischen Strukturen eine rötliche, positive Färbung aufweisen (B). Dies lässt den Schluss zu, dass es an diesen lymphatischen Strukturen auch zu einer Angiogenese-Stimulierung kommt. Beweis dafür sind die Darstellungen (C) und (D). Hier ist zum einen die Loopbildung deutlich zu erkennen, zum anderen gelang durch die Darstellung mit Hilfe der Anti-Prox-1-Färbung der Nachweis, dass es sich um lymphatische Strukturen handelt. Somit ist ein erster Schritt zur Etablierung des HET-CAM-Modells für die Irritabilitätstestungen von Penicillin G getan.

Für LYVE-1 und Podoplanin konnten im Gegensatz dazu, wie unter 5.1 beschrieben, keine positiven Färbungen am CAM-Querschnitt gezeigt werden. Eine Bindung der jeweiligen lymphendothelzell-spezifischen Antikörper an die Strukturen der tierischen Membran war auch bei Variation der Inkubationsbedingungen nicht zu erreichen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nur mittels Prox-1-Färbung ein eindeutiger Nachweis der angiogenetischen Stimulierung an lymphatischen Strukturen möglich war und nicht alle drei, aus der Literatur bekannten, lymphendothelzell-spezifischen Marker an der CAM immunhistochemisch detektiert werden konnten.

Um die VEGF-C induzierte Vaskularisierung darzustellen und zu quantifizieren, wurde weiterhin die Videokapillarmikroskopie genutzt. Da sich das lymphovaskuläre System aus dem hämovaskulären entwickelt, wie bereits von Nagy und Kollegen gezeigt [Nagy 2002], ist auch die morphologische Nähe beider Strukturen nachzuvollziehen [Papoutsi 2001].

Die VEGF-C stimulierte CAM in Abbildung 12 (B) zeigt eindeutig eine erhöhte Vaskularisation gegenüber der unbehandelten CAM in Abbildung 12 (A). Im mit Wachstumsfaktor behandelten Areal lässt sich im Videofilm eine erhöhte Perfusion im Blutgefäßsystem erkennen. An die dunkleren hämovaskulären Strukturen schließen sich schwach sichtbar hellere Bereiche an, die nicht sichtbar perfundiert werden. Diese hell erscheinenden Abschnitte könnten als lymphatische Strukturen identifiziert werden. Eine genaue Zuordnung und Quantifizierung der einzelnen Strukturen gestaltete sich schwierig, da in den lymphatischen Kapillaren kein Lymphfluss zu erkennen ist und damit morphologisch keine eindeutige Abgrenzung zwischen hämo- und lymphovaskulären Strukturen festgelegt werden kann. Der Versuch, anhand der Graustufen die Unterschiede beider Strukturen zu unterscheiden und zu quantifizieren, gelang nicht. Die Bildkontraste reichten nicht aus, um die einzelnen Gebiete eindeutig voneinander zu trennen.

Die abschließende Überlegung zu dieser Untersuchung geht dahin, dass der Reifungsgrad des Gewebes in diesem Entwicklungsstadium zu gering ist, um eine Einflussnahme eindeutig zu charakterisieren. Gleichzeitig zeigt sich die CAM als komplexes System, bei dem z.B. ein möglicher Einfluss eines Antibiotikums genau lokalisiert werden muss, um eine nachhaltige Aussage zu treffen. Die Ergebnisse führten dazu, das HET-CAM-Modell zu verlassen und isoliert an einem anatomischen Baustein des Lymphsystems weiter zu arbeiten.

5.3 Isolierung und Charakterisierung von Lymphendothelzellen

5.3.1 Isolierung von Lymphendothelzellen

Bei der Gegenüberstellung der unter 4.3.1 beschriebenen Methoden wurde deutlich, dass das Verfahren nach Miltenyi Biotec zu einem höheren Reinheitsgrad und zu einer höheren Zellausbeute führt. Beides sind wichtige Voraussetzungen für die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse in einer Primärzellkultur. Der Vorteil der Miltenyi Biotec-Methode für die vorliegende Arbeit kann zum einen in der Größe der Beads gesehen werden und zum anderen in der Art der Trennung von Bead-markierten und nicht-markierten Zellen. Wie Groscurth et. al. im Elektronenmikroskop zeigen konnten, lagern sich die ferromagnetischen Partikel aus der kolloidalen Suspension nahezu gleichmäßig um die Zelle [Miltenyi Biotec GmbH 2007]. So entsteht bei Einhaltung der Inkubationszeit von 10 min aus den 50 nm messenden Partikeln eine Art Hülle um die Zelloberfläche, die eine gute Ausbeute bei der Isolierung ermöglicht.

Im Gegensatz dazu erkennt man die Beads von Dynal im Lichtmikroskop. Dieses zeigte auch die Rosettenbildung durch mehrere Beads an der Zelloberfläche, die aufgrund von Bindungen an Zellfragmente oder unspezifische Bindungen innerhalb der Beads verursacht sein kann. Aus Sicht dieser Arbeit ein weiterer Nachteil für die Dynabeads ist ihre Größe und die daraus resultierende Gefahr, im Medium-Zell-Gemisch zu sedimentieren. Um dies zu verhindern, muss die Suspension während der Inkubation immer leicht geschwenkt werden. Als Folge davon könnten Zelldefekte auftreten, die eine Bindung an die Beads und damit eine saubere Isolierung beeinträchtigen.

Die Trennung von markierten und nicht-markierten Zellen ist ein weiterer Unterscheidungspunkt der beiden Methoden. Bei dem Verfahren nach Dynal können im Reaktionsgefäß, verursacht durch das magnetisch Feld an der Wand des Reaktionsgefäßes, im Pellet auch unmarkierte Zellen enthalten sein, die mitgerissen wurden. Gleiches gilt für die bei der Inkubation entstandenen Zellfragmente. Somit kann die isolierte Fraktion auch nicht-erwünschte Zellen beinhalten.

Im Unterschied dazu erfolgt die Trennung der Zellsuspension nach Miltenyi Biotec über eine Säule mit einer Matrix aus Eisenpartikeln. Solange das magnetische Feld aufrechterhalten wird, binden die markierten Zellen während der Spülschritte an der Matrix. Ein Vorteil ist dabei, dass das Spülmedium die Säule wieder verlassen kann und dabei nicht-gebundene Zellen und Fragmente entfernt werden.

Somit zeigen sich für die vorliegende Arbeit klare Vorteile der Miltenyi Biotec-Methode, die ihre ausschließliche Anwendung rechtfertigen.

5.3.2 Charakterisierung von Lymphendothelzellen

Mittels Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz und Protein-Nachweis (Western Blot) wurden die isolierten Lymphendothelzellen identifiziert und charakterisiert.

Wie in der Literatur beschrieben kann der Erfolg einer Zellisolierung mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden [Norgall 2007]. Die Inkubation mit einem gegen das transmembranäre Glykoprotein CD31 gerichteten Antikörper zeigt eine nahezu vollständige Verschiebung des Peaks zu höheren Fluoreszenzwerten. Da CD31 als Indikator für die Reinheit einer Endothelzellkultur steht [Norgall 2007], kann im vorliegenden Fall von einer erfolgreichen Isolierungsmethode gesprochen werden (Abbildung 14).

Für den lymphspezifischen Marker Podoplanin zeigen sich, wie von Breiteneder-Geleff beschrieben, 100 % der Zellen positiv [Breiteneder-Geleff 1999], wenn auch in unterschiedlichem Maße. Eine Erklärung dafür könnten die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Podoplanin-Formen sein [Jussila 1998, Wetterwald 1996, Zimmer 1995].

Bezogen auf die vorliegenden Ergebnisse zeigt sich das Bild einer Lymphendothelzellmischung mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien und damit einer variierten Podoplanin-Expression.

Die Inkubation mit dem transmembranären Glycoprotein LYVE-1 zeigt eine geteilte Population, in der nur knapp die Hälfte der Zellen positiv für den Hyaluronsäure-Rezeptor ist. Begründen lässt sich dies mit dem von Mäkinen beschriebenen hauptsächlichen Vorhandensein von LYVE-1 in jungen LECs [Mäkinen 2001]. Damit zeigt sich auch hier das Bild einer geteilten Population.

Grundsätzlich ist es wichtig, durch Separation eine reine Endothelzellkultur und einen möglichst hohen Anteil an LECs zu erhalten. Mittels einer auf Lymphendothelzellen zugeschnittenen Kultivierung mit entsprechendem Medium (ECGM-MV2) und Wachstumsfaktor (VEGF) ließ sich das Verhältnis weiter zu Gunsten der lymphatischen Zellen verschieben [Norgall 2007]. Zusammenfassend kann von einer Lymphendothelzellkultur ausgegangen werden, die für die durchzuführenden Untersuchungen geeignet ist.

Ergänzend zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der isolierten Zellen wurde ein Nachweis mittels Immunfluoreszenz herangezogen. Da sowohl CD31 als auch LYVE-1

extrazellulär vorkommen, lässt sich auf diese Weise die charakteristische, lang gestreckte Form der Zellen gut erkennen, die typisch ist für isoliert vorkommende Endothelzellen [Kriehuber 2001]. Die Färbung mit DAPI markiert den Zellkern und zeigt, dass es sich bei der Färbung nicht um unspezifische Fragmente handelt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung stehen im Einklang mit den Resultaten aus der Durchflusszytometrie und sind eine weitere Bestätigung für die erfolgreiche LEC-Isolierung.

Mit Hilfe des Western Blots fand auf Proteinebene die Charakterisierung der isolierten Zellen statt. Die Arbeiten von Kriehuber und Berman stellten dabei die Eckpunkte für die Etablierung der Methode in der Arbeitsgruppe dar [Kriehuber 2001, Berman 1996]. Die Effizienz der Isolierungsmethode zeigt sich in Abbildung 16 deutlich beim Vergleich der nicht-isolierten Populationen (Bande 1-3) gegen diejenigen Zellkulturen, die bereits CD31- und LYVE-1 isoliert sind (Bande 4 und 6). Eine weitere Erkenntnis dieser Untersuchung ist in Bande 5 zu erkennen: Die LYVE-1 negative Fraktion zeigt einen hohen Anteil CD31 positiver Zellen, was darauf schließen lässt, dass nicht-lymphatische Endothelzellen erfolgreich abgetrennt wurden. Sie zeigt allerdings auch eine geringe, aber noch vorhandene LYVE-1 positive Fraktion, die bei der Isolierung nicht erfasst wurde. Eine mögliche Erklärung dafür kann wiederum im unterschiedlichen Entwicklungsstadium der Zellen liegen, da diese auch während der Isolierung nicht auf einer morphologischen Stufe fixiert sind.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass mit den drei verwendeten Methoden zur Charakterisierung und Identifizierung (Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz, Western Blot) eine Kombination herangezogen wurde, die den eindeutige Nachweis einer erfolgreichen LEC-Isolierung erbringen kann und damit die Grundlage für weitere Untersuchungen legt.

5.4 Pharmakokinetische Modellberechnung zu Penicillin G

Grundlage für das Modell war die Idee, die pharmakokinetischen Bedingungen für Penicillin G im ödematösen Gewebe theoretisch darzustellen. Die Applikation des Arzneistoffs erfolgte dabei intravenös. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das Zwei-Kompartiment-Modell für die Darstellung gewählt. Begründet wird dies mit den unterschiedlichen physiologischen und anatomischen Eigenschaften von Blut- und Lymphgefäßsystem [Herotz 2004].

Abbildung 17 zeigt den Konzentrationsverlauf im gesunden Gewebestand, in dem man von identischen Verteilungsvolumina im Blut- und im Lymphsystem sprechen kann. Je nach eingesetzter Dosierung beträgt im gesunden, lymphatischen Gewebe die Konzentration von

Penicillin G 38 mg/l (1800 mg), 64 mg/l (3000 mg), 128 mg/l (6000 mg). Dies entspricht Plasmaspiegeln, wie sie auch in der Literatur beschrieben sind und zu erwarten waren [Simon 2000].

Bei der Darstellung eines ödematösen Zustands (siehe Abbildung 18) wurde im zweiten Kompartiment ein erhöhtes Verteilungsvolumen angenommen. So sollten der Rückstau der lymphatischen Last und die eingeschränkte Transportkapazität des Lymphödems berücksichtigt werden. Im ersten Kompartiment zeigt sich im Vergleich zur Modellberechnung im gesunden Zustand kein nennenswerter Unterschied in den Konzentrationsverläufen. Davon war bei identischen Ausgangsparametern auszugehen.

Im zweiten Kompartiment liegen die Konzentrationsverläufe um etwa 30 % unter denjenigen im gesunden Modell-Gewebe. Das bedeutet, dass entgegen der Hypothese nicht von einer Kumulation des Arzneistoffs ausgegangen werden kann. Dies würde die Aussage von Kremer et. al. unterstützen, die ein erschwertes Erreichen von therapeutischen Wirkstoffmengen im ödematösen Lymphgewebe beschrieben haben [Kremer 1991].

Vielmehr führen die gleich bleibende Elimination des Arzneistoffs und die veränderten Gewebebedingungen zu einem geringeren Wirkstoffspiegel. Auch wenn die Kumulationstheorie anhand dieser Ergebnisse nicht untermauert werden kann, zeigt sich deutlich, welche Penicillin G-Konzentrationen bei unterschiedlichen Bedingungen im zweiten Kompartiment erreicht werden. Stellt man diese in einen Vergleich mit den Untersuchungen an Lymphendothelzellen, wird deutlich, dass die toxische Schädigung der Zellen aber weiterhin eine Rolle spielt, auf welche fokussiert werden sollte, siehe 5.5.1 und 5.5.2. Denkbar wäre dazu eine Untersuchung mittels Mikrodialyse, bei der direkt in vivo am ödematösen Gewebe eine Arzneistoffkonzentration gemessen werden kann. So könnte eine eindeutige Aussage zur Penicillin G-Konzentration in unterschiedlichen Gewebezuständen analysiert werden.

5.5 Einflussnahme von Penicillin G auf Lymphendothelzellen

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Einflussnahme des zur Therapie des Erysipels eingesetzten Penicillin G auf die Proliferation und Vitalität von Lymphendothelzellen. Über einen Zeitraum von drei Tagen wurden die Zellen wie unter 3.2.9 und 3.2.10 beschrieben behandelt und inkubiert.

5.5.1 Einfluss von Penicillin G auf die Proliferation von LECs

Nach einer 24-stündigen Inkubation mit dem Antibiotikum ergeben sich bei Konzentrationen von 1,5 bis 45 mg/l keine signifikanten Veränderungen in der Proliferation. Die LECs tolerieren die Anwesenheit von Penicillin G im angegebenen Bereich. Bei 90 mg/l und 180 mg/l sinkt die Proliferation tendenziell ab. Diese Veränderung ist nicht signifikant, lässt aber die Vermutung zu, dass die Zellen von der steigenden Penicillin G-Konzentration beeinflusst werden, auch wenn diese in therapeutisch zu erreichenden Wirkstoffspiegeln vorhanden ist. Ebenfalls noch im physiologischen Bereich liegt die Konzentration von 270 mg/l [Fachinformation „Penicillin Grünenthal“ 2002]. Der Rückgang der Proliferation um 30 % setzt den Trend aus den vorangegangenen Konzentrationen fort. Steigt die Penicillin G-Konzentration weiter an und erreicht unphysiologische Bereiche, zeigt sich ein geteiltes Bild. Ab 360 mg/l scheint die Proliferation wieder zuzunehmen. Dies kann aber als Effekt der Mikrotiterplatte gewertet werden, denn eine Ausnahmestellung dieser Konzentration, z.B. bei der späteren Untersuchung der Vitalität, kann nicht bestätigt werden. Die höchste verwendete Konzentration von 500 mg/l zeigt mit einer Abnahme um 25 % ebenfalls deutlich einen negativen Einfluss auf die Proliferationsrate. So kann davon ausgegangen werden, dass die Lymphendothelzellen diesen Konzentrationsbereich nicht mehr tolerieren.

Bezogen auf die physiologische Funktion der LECs und verglichen mit den Daten der Modell-Berechnung bedeutet dies eine schleichende Funktionseinschränkung. Zwar werden weiterhin Zellen generiert, ihre Gesamtzahl sinkt dabei allerdings stetig ab. Dafür spricht auch die Inkubation über weitere 24 h. Die Proliferationsrate sinkt bereits ab der ersten eingesetzten Konzentration von 1,5 mg/l tendenziell ab und verhält sich auch bei den nachfolgenden Konzentrationen entsprechend.

Nach drei Tagen ist bei allen Penicillin G-Konzentrationen ein Rückgang der Proliferation zu erkennen. Dieser ist allerdings nicht Antibiotikum-spezifisch. Da die Zellen nun bereits über 72 Stunden in der Platte gewachsen sind, entsteht eine Kontakthemmung unter den Zellen, die ein weiteres Proliferieren verhindert. Die Penicillin G-Effekte sind somit nicht eindeutig zu definieren.

So kann aus der Inkubation über zwei Tage festgehalten werden, dass die Lymphendothelzellen zwar weiterhin proliferieren, die Rate aber stetig abnimmt und es damit zu einer Funktionseinschränkung im Lymphgefäß kommen kann. Eine Verstärkung dieses Effekts durch Entzündung, Rückstau und eine eingeschränkte Transportkapazität im Ödemgewebe ist dabei vorstellbar. Der Einfluss von Penicillin G kann somit als zusätzlicher Faktor für die Verschlechterung eines Ödemstatus gesehen werden.

5.5.2 Einfluss von Penicillin G auf die Vitalität von LECs

Die Bestimmung der Vitalität, d.h. die Bestimmung des Gesamtproteins, zeigt nach einer Inkubation über 24 und 48 h kein signifikanter Effekt für die Konzentrationen von 1,5 und 5 mg/l. Die Zellen werden durch das Antibiotikum nicht beeinflusst. Steigt die Penicillin G-Konzentration um über das Doppelte, 12 mg/l, an, sinkt die Vitalität um 25 bis 30 %. Entsprechendes ist auch für die nachfolgenden Konzentrationen zu beobachten. Damit sind nach zwei Tagen Inkubation über ein Viertel der Zellen nicht mehr vital, auch in Konzentrationen, die im humanen Gewebe durchaus erreicht werden können. Wie schon für die Proliferation diskutiert, siehe Kapitel 5.5.1, kann dieses Verhalten als schleichender Rückgang der Vitalität gedeutet werden. Dieser könnte im Zusammenhang mit einer Entzündung, einem Rückstau der lymphpflichtigen Last und einer Einschränkung der Transportkapazität einen negativen Einfluss auf den Ödemzustand haben.

Eine weitere Abnahme der Vitalität im Vergleich ist nach 72 Stunden festzustellen. Bei diesem Effekt ist davon auszugehen, dass er nicht Antibiotikum-spezifisch ist. Nach der Inkubationszeit über drei Tage kann der Rückgang der Vitalität auch mit der nahezu vollständigen Konfluenz der Platte erklärt werden, bei der die Stoffwechselfunktionen der Zellen reduziert ablaufen.

5.5.3 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Penicillin G sowohl Einfluss auf die Proliferation als auch auf die Vitalität von Lymphendothelzellen nimmt. Diese Beeinflussung ist schwächer ausgeprägt als angenommen, konnte aber im Modell als einzelner Faktor auf die Zellen dargestellt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die aufgetretenen zelltoxischen Effekte in Kombination mit weiteren negativen Faktoren wie dem Rückstau der Lymphe und der eingeschränkten Transportkapazität die Ödemsituation weiter verschlechtern.

Daraus kann geschlossen werden, dass bei der Therapie des Erysipels mit Penicillin G die Proliferation und Vitalität der Lymphendothelzellen negativ beeinflusst wird. Diese zelltoxischen Effekte beeinträchtigen die Funktionalität und Morphologie des Lymphsystems, das durch die Ödemsituation bereits geschädigt ist. Auf Grund dieser Erkenntnisse ist eine Therapie der rezidivierenden Form des Erysipels in Kombination mit einem Ödem und der wiederholten Gabe von Penicillin G zu überdenken.

5.6 Darstellung eines Reepithelisierungsmodells mittels HaCaT-Zellen unter Penicillin G

Die Reepithelisierung der HaCaT-Zelllinie unter Penicillin G stellt sich wie in Abbildungen 21 bis 26 gezeigt dar.

Ab einer Regenerationszeit von fünf Stunden zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle bei allen Konzentrationen von 1,5 bis 500 mg/l eine vermehrte Migration der Zellen in das Läsionsgebiet hinein. Dabei verhalten sich die Zellen unabhängig von den eingesetzten Penicillin G-Konzentrationen ähnlich. Das geringste Wachstum, verglichen mit der Kontrollgruppe, zeigt sich bei der Konzentration von 1,5 mg/l. Hier wird nach 12 Stunden Inkubation das Maximum von 20 Prozent Differenz zwischen behandelter und unbehandelter Zellkultur erreicht. Im Mittel zeigen alle anderen Konzentrationen zwischen 5 und 40 h eine konstante Erhöhung der Reepithelisierungsrate um 15 bis 20 %. Aufgrund der großen Streuung der Werte ist die verbesserte Heilung der Läsion unter Penicillin G nur tendenziell zu sehen. Eindeutig darstellen lässt sich auf diese Weise aber, dass definitiv kein negativer Einfluss von Penicillin G auf das Reepithelisierungsverhalten der HaCaT-Zellen ausgeht. Damit zeigt sich ebenfalls, dass die toxischen Effekte von Penicillin G bei Lymphendothelzellen Zelltyp-spezifisch sind und dass beim Reepithelisierungsmodell eine Therapie mit diesem Antibiotikum aus zelltoxischer Sicht unkritisch gesehen werden kann.

5.7 Einfluss von Penicillin G auf HaCaT-Zellen

5.7.1 Reepithelisierungsmodell

Das von Kehe und Breikreutz beschriebene HaCaT-Modell zur Darstellung eines Reepithelisierungsvorgangs zeigt sich als stabile Methode zur Darstellung des Einflusses von Penicillin G auf die Zellkultur [Breikreutz 1993, Kehe 1999]. Wie in Abbildungen 21 bis 26 dargestellt, wurde gegen eine Nullkontrolle mit fünf verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen das Reepithelisierungsverhalten dargestellt. Mittels des gewählten Kurven-Fit nach Hill zeigt sich graphisch über einen Messzeitraum von 48 h kein negativer Einfluss von Penicillin G auf das Schließen der gesetzten Läsion. Dies trifft für alle verwendeten Penicillin G-Konzentrationen zu und führt zu dem Schluss, dass die Funktion der Zellen unbeeinflusst von Penicillin G bleibt. Über eine eventuell sogar verbesserte Reepithelisierung dank des Antibiotikums kann nur spekuliert werden. Bei einer Applikation von Penicillin G von 12 mg/l (Abbildung 23) und 360 mg/l (Abbildung 25) ist zwar eine Tendenz zu

erkennen. Diese lässt aufgrund der Streuung der Messwerte aber keine eindeutige Befürwortung zu. Zudem liegt die Dosierung von 360 mg/l schon im fiktiven Bereich und käme in der Therapie nicht zur Anwendung. Auch visuell kann pro Dosierung von Penicillin G kein negativer Einfluss gezeigt werden. Die Epithelisierung erfolgt einerseits über die Migration der Zellen in das geschädigte Epidermisgebiet, siehe 2.8, und andererseits über die Proliferation [Scharffetter-Kochanek 1992]. Die Bildfolgen zu jeder Penicillin G-Applikation (Abbildungen 21 bis 26) zeigen ein kontinuierliches Schließen der gesetzten Läsion. Dies ist ein wichtiges Indiz dafür, dass die Proliferation und auch die Vitalität der HaCaT-Zellen durch das Antibiotikum nicht beeinflusst werden.

5.7.2 Einfluss von Penicillin G auf die Proliferation von HaCaT-Zellen

Zu den Proliferationsuntersuchungen an HaCaT-Zellen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des Antibiotikums wurden, wie unter 4.5.2 dargestellt, entsprechende Kulturansätze mit HaCaT-Zellen durchgeführt, die den Einfluss von Penicillin G beschreiben sollen. Ein negativer Einfluss ist bei keiner der applizierten Dosen und zu keiner Inkubationszeit zu erkennen. Dies bestätigt die Vermutung aus dem Reepithelisierungsmodell, dass die Proliferation der HaCaT-Zellen nicht von Penicillin G beeinflusst wird. Ebenso wie dort bleibt es auch Spekulation, ob Penicillin G zu einem positiven Effekt führt. Die Tendenz, die bei einer Inkubation von 48 und 72 h zu erkennen ist, kann mit Blick auf die Standardabweichung von bis zu 30 % nicht bestätigt werden.

5.7.3 Einfluss von Penicillin G auf die Vitalität von HaCaT-Zellen

Die Vitalitätsuntersuchungen an HaCaT-Zellen unter Einfluss von Penicillin G wurden wie unter 4.5.3 dargestellt durchgeführt. Auch hier zeigte sich, wie bei den Proliferationsuntersuchungen, bei keiner der angewendeten Konzentrationen oder Inkubationszeiten ein negativer Einfluss des Antibiotikums auf die Vitalität der Zellen. Dies bestätigte die Erwartung, die durch die Ergebnisse im Epithelisierungsmodell entstanden war. Auch unphysiologisch hohen Konzentrationen von 360 mg/l und 500 mg/l Penicillin G haben keinen Einfluss auf die Vitalität.

5.7.4 Schlussfolgerung

Wie das Epithelisierungsmodell zeigen auch die Untersuchungen zu Proliferation und Vitalität unter Penicillin G keinen Einfluss des Antibiotikums auf die HaCaT-Zellen. Damit ist Penicillin G aus mikrobiologischer und hautphysiologischer Sicht für das Erkrankungsbild des konventionellen Erysipels, also der auftretenden Hautläsion, entsprechend der Leitlinie geeignet.

6. Zusammenfassung

Das Lymphgefäßsystem hat als Drainagesystem des Körpers vielfältige Aufgaben. Struktur- und Funktionsdefekte führen zu Einschränkungen im Lymphtransport und zu ödematisiertem Gewebe. Im Zusammenhang mit einem Lymphödem zeigt sich häufig das klinische Bild einer bakteriellen Infektion. Dieses so genannte Erysipel wird entsprechend den Therapieleitlinien von DDG und ADI mit Penicillin G behandelt. Da die Erkrankung eine hohe Rezidivrate aufweist, erfolgt bei chronischen Formen eine prophylaktische oder unter Umständen auch eine dauerhafte intravenöse Gabe des Antibiotikums. Häufig wird bei rezidivierenden Erysipelen und damit bei wiederholter Penicillin G-Gabe eine Verschlechterung der Ödemsituation beobachtet.

Auch die Kombination weiterer Therapiemaßnahmen, wie zum Beispiel der komplexen physikalischen Entstauungstherapie, kann die Progression des Ödems oft nicht verhindern. Die Ursachenforschung geht in die unterschiedlichsten Richtungen.

Die Theorie, der in dieser Arbeit nachgegangen werden soll, geht von einer toxischen Schädigung der Lymphendothelzellen durch die Antibiotika-Gabe aus. Daran anknüpfend liegen die Schwerpunkte der Arbeit auf der Erstellung von geeigneten Testmodellen. Dabei soll ein vitales Modell (HET-CAM-Modell), ein zelluläres Modell (Kultur von Lymphendothelzellen und HaCaT-Zellen) und ein mathematisches Modell zur Darstellung des toxischen Einflusses von Penicillin G etabliert werden. An Hand dieser experimentellen Strategie lassen sich folgende Aussagen treffen:

1. Die lymphspezifischen Marker LYVE-1, Podoplanin und Prox-1 ermöglichen einen eindeutigen Nachweis von humanen mikrovaskulären Endothelzellen. Für aviäres Gewebe zeigt sich nur Prox-1 durch seine Sequenzhomologie positiv.
2. Mittels pharmakokinetischer Modellberechnung zeigt sich, dass im ödematisierten Gewebe nicht von akkumuliertem Penicillin G ausgegangen werden kann. Vielmehr verringert sich die Arzneistoffkonzentration im geschädigten Kompartiment.
3. Mikrovaskuläre Lymphendothelzellen lassen sich aus humaner Haut mittels Microbead-Verfahren isolieren und anschließend kultivieren. Mit Hilfe der lymphspezifischen Oberflächenmarker LYVE-1 und Podoplanin sowie des endothelzell-spezifischen Markers CD31 lassen sich die isolierten Zellen per Flowcytometrie, Immunfluoreszenz und Western Blot nachweisen. Eine Inkubation der Lymphendothelzellkultur mit therapeutisch relevanten Penicillin G-

Konzentrationen über drei Tage zeigt sowohl auf proliferativer Ebene als auch auf die Vitalität einen toxischen Einfluss.

4. Im Vergleich dazu zeigt sich am Modell mit Keratinozyten (HaCaT-Modell) kein toxischer Einfluss des Antibiotikums.
5. Der Nachweis von Penicillin G-Effekten an einem vivo-Modell (HET-CAM-Modell) ist nicht möglich. Durch die erfolgreiche Stimulierung mit VEGF-C kann ein angiogenetischer Vorgang zwar nachgewiesen werden. Da dieser aber nicht quantifiziert werden kann, ist auch eine eindeutige Identifizierung von Penicillin G-Einflüssen auf die lymphatische Struktur bisher nicht möglich.
6. An einem Epithelisierungsmodell mit HaCaT-Zellen lassen sich Proliferation und Layerformation darstellen und quantifizieren. Dabei zeigt sich im Inkubationsmodell über zwei Tage kein negativer Einfluss von Penicillin G auf die Reepithelisierung der definiert gesetzten Läsion.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein toxischer Einfluss von Penicillin G an Lymphendothelzellen im Zell-Modell nachweisbar ist. Somit kann die klinische Beobachtung einer Verschlechterung der Ödemsituation unter Penicillin G-Gabe, wie bei der Therapie des Erysipels, bestätigt werden. Die Beeinflussung resultiert aber nicht aus einer Kumulation des Arzneistoffs im ödematösen Gewebe, wie ursprünglich angenommen. Dass der negative Effekt von Penicillin G zellspezifisch ist, zeigt die Darstellung eines Reepithelisierungsmodells mit HaCaT-Zellen unter dem Einfluss des Antibiotikums. In diesem Modell war keine Beeinflussung durch das Antibiotikum zu erkennen.

Um eine klare Aussage über den tatsächlichen Wirkstoffgehalt von Penicillin G im Ödemgewebe treffen zu können, würden sich weiterführend Mikrodialyse-Untersuchungen eignen. Auf diese Weise könnten direkt im Gewebe Arzneistoffkonzentrationen gemessen werden, die weitere Aufschlüsse über den Einfluss von Penicillin G auf die Ödemsituation zulassen würden.

7. Literaturverzeichnis

- Achen M.G. et al.: Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flk4), Proc Natl Acad Sci. 1998, 95: 548-553
- Allard P., Stücker M., el Gammal S., Altmeyer P.: Zyklische intravenöse Antibiose als effizientes Therapiekonzept des chronisch-rezidivierenden Erysipels, Hautarzt. 1999, 50: 34-38
- Amann-Vesti B.R.: Physiologie und Pathophysiologie der initialen Lymphgefäße, Vasomed 2005, 17: 197-200
- von Andrian U.H., Mempel T.R.: Homing and cellular traffic in lymph nodes, Nat Rev Immunol. 2003, 3: 867-868
- Armstrong P.B., Quigley J.P., Sidebottom E.: Transepithelial invasion and intramesenchymal infiltration of the chick embryo chorioallantois by tumor cell lines, Cancer Res. 1982, 42: 1826-1837
- www.ASCO.org: http://www.asco.org/hurwitz_no3646
- Asellius G.: De lactibus sive lacteis venis, Milan: Mediolani, 1627
- AWMF: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft, Leitlinien-Register Nr. 013/054, Entwicklungsstufe 1, 2006
- Baluk P.: Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation, J Clin Invest. 2005, 115: 247-257
- Banerji S., Ni J., Wang S.X.: LYVE-1, a new homologue of the CD44 Glycoprotein, is a Lymph-specific receptor for Hyaluronan, J Cell Biol. 1999, 14: 789-801
- Baddour L.M., Bisno A.L.: Recurrent cellulitis after saphenous venectomy for coronary bypass surgery, Ann Intern Med. 1982, 97: 493-496
- Barsy S.H., Baker A., Siegal G.P., Liotta L.A.: Use of anti-basement membrane antibodies to distinguish blood vessel capillaries from lymphatic capillaries, Am J Surg Pathol. 1983, 7: 667-677
- Beckstead J.H., Wood G.S., Fletcher V.: Evidence for the origin of the Kapos's sarcoma from lymphatic endothelium, Am J Pathol. 1985, 119: 294-300
- Berman M.E. et al.: Roles of platelet/ endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD 31) in natural killer cell trans-endothelial migration and β 2 Integrin activation, J. Immunol. 1996, 156: 1515-1524
- BfR: Bundesinstitut für Risikobewertung: Neues In-vitro-Modell zur Abschätzung des augenreizenden Potentials chemischer Stoffe vorgestellt, Pressemitteilung des BfR vom 12.02.2003

- Bölter C.: Ödeme, ein Überblick über die Pathogenese, *Z Ärztl Fortbildung*. 1985, 79: 375-378
- Boenisch T.: *Immunchemische Färbemethoden*. 2003, Dako Cytomation Corp, 3.Auflage
- Bollinger A., Jager K., Sgier F., Seglias J.: Fluorescence microlymphography, *Circulation*. 1981, 64: 1195-1200
- Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Markham A., Fusenig N.: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human Keratinocyte cell line, *J Cell Bio*. 1988, 106: 761-771
- Breiteneder Geleff S., Matsui K., Soleiman A., Kerjaschki D.: Podoplanin, a novel 43-kd membrane protein of glomerulär epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis, *Am J Pathol*. 1997, 151: 1141-1152
- Breiteneder-Geleff S., Soleiman A., Kowalski H., Kerjaschki D.: Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic callaries: Podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium, *Am J Pathol*. 1999, 154: 385-392
- Breitkreutz D., Boukamp P., Sark H.J., Fusenig N.E.: Response of established keratinocyte lines to modulators of epidermal differentiation, In: Shroot B., Schäfer H.: *Pharmacology and the Skin*, 1989, S. Karger Basel. 8-14
- Breitkreutz D., Stark H.J., Plein P., Fusenig N.E.: Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extra cellular Ca^{2+} , *Different*. 1993, 54: 201-217
- Breitkreutz D., Schoop VM., Mirancea N., Baur M., Fusenig N.E.: Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants, *Eur J Cell Biol*. 1998, 75: 273-286
- Brett U., Heintschel von Heinegg E.: *Basiswissen Mikrobiologie: Praktikum der Bakteriologie und Mykologie*, 1998, Umschau-Zeitschr.-Verl. Breidenstein
- Brooks P.C., Clark R.A., Cheresch D.A.: Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science*. 1994, 264: 569-571
- Calonje E., Fletcher C.D.M.: *Tumors of blood vessels and lymphatics: Diagnostic histopathology of Tumors*, N.Y., Churchill Livingstone. 1995, 43-77
- Cao Y., Linden P., Farnebo J.: Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95: 14389-14392
- Capone A., Visco V., Belleudi F., Frati L., Torrisi M.R.: Up-modulation of the expression of functional keratinocyte growth factor receptors induced by high cell density in the human keratinocyte HaCaT cell line, *Cell Growth Differ*. 2000, 11: 607-614
- Casley-Smith J.R., Morgan R.G., Piller N.B.: Treatment of lymphedema of the arms and legs with 5, 6-benzopyrone, *New Engl J Med*. 1993, 329: 1158-1163

- Crickx B.: Infections cutanées bactériennes: erysipèle, Rev Prat. 1993, 43 : 876-878
- Cursiefen C.: VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment, J Clin Invest. 2004, 113: 1040-1050
- Daane S., Poltoratszy P., Rockwell W.B.: Postmastectomy lymphedema management: Evolution of the complex decongestive therapy technique, Ann Plast Surg. 1998, 40: 128-134
- Dannhardt G., Kreher M.; Nowe U.: Method for testing non-steroidal anti-inflammatories: the modified hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM-Test) compared to other procedures, Arch Pharm Med Chem. 1996, 329: 301-310
- DGPI: Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie, Handbuch 1997, Futuramed Verlag München, 2. Auflage
- Dicken S.C., Ko R., Lerner G., Klose A., Cosini B.: Effective treatment of lymphedema of the extremities, Arch Surg. 1998, 133: 452-258
- Djabari Z., Bauza E., Domloge N.: The HET-CAM test combined with histological studies for better evaluation of active ingredient innocuity, Int J Tissue React. 2002, 24, 117-121
- Elö J., Balatoni Z.S., Varga L., Bastai A.: Investigation of premalignant lesions of larynx epithelium with histoautoradiography and HPV-assay, Acta Otolaryn. 1993, 113: 259-462
- Fachinformation: Penicillin "Grünenthal", 2002, Rote Liste Service GmbH
- Földi E., Baumeister R.G.H., Bräutigam P., Tiedjen K.U.: Zur Diagnostik und Therapie des Lymphödems, Dtsch Ärztebl. 1998, 95: A740-747
- Földi M.; Kubik S.: Lehrbuch der Lymphologie, 1999, Fischer-Verlag Stuttgart, 4. Auflage
- Folkman J.: Tumor angiogenesis, Adv Canc. Res. 1985, 43: 175-203
- Fraser J.R., Laurent T.C.: Turnover and metabolism of hyaluronan, Ciba Found Symp. 1989, 143: 41-53
- Fritsch P.: Dermatologie und Venerologie, 2004, Springer-Verlag, 2. Auflage
- Gale N.W., Yancopoulos G.D.: Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs angiopoietins, and ephrins in vascular development, Genes Dev. 1999, 13: 1055-1066
- Hahon N., Ratner M., Kozikowski E.: Factors influencing variola virus growth on the chorioallantoic membrane of embryonated eggs, J Bacteriol. 1958; 75: 707-712
- Hahon N.: Survival of variola virus in chorioallantoic membrane preparations, J. Bacteriol. 1959; 78: 731-733

- Hatz R.A., Niedner R., Vanscheidt W., Westerhof W.: Wundheilung und Wundmanagement, 1994, Springer-Verlag, 1. Auflage
- Herpertz U.: Ödeme und Lymphdrainage, Diagnose und Therapie von Ödemkrankheiten, 2004; Schattauer Verlag, 2. Auflage
- Huntington G.S., McClure C.F.W.: The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat (*Felis domestica*), *Am J Anat.* 1910, 10: 177-311
- Huschka C.: Untersuchungen zur Wirkung von Biotin auf humane Keratinozyten und zur Modulation der Biotinpenetration in humane Haut, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1998
- Hwang J.H., Kwong J.Y., Lee K.W., Choi J.K., Kim D.I.: Changes in lymphatic function after complex physical therapy for lymphedema, *Lymphology.* 1999, 32: 15-21
- Jackson D.G., Prevo R., Clasper S.: LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis, *TRENDS in Immunology.* 2001, 22: 317-321
- Jain R.K. et al.: Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor, *Seminar in Oncology.* 2006, 29: 3-9
- Jeltsch M., Kaipainen A., Kukk E.: Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice, *Science.* 1997, 276: 1423-1425
- Johansson E., Lie G. Lindfeldt J.: A randomized study comparing manual lymphdrainage with sequential pneumatic compression for treatment of postoperative lymphedema, *Lymphology.* 1998, 31: 56-64
- Jorup-Rönström C., Britton S.: Recurrent erysipelas: predisposing factors and costs of prophylaxis, *Infection.* 1987, 15: 105-106
- Joukov V. et al.: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases, *EMBO J.* 1996, 15: 290-298
- Jussila L., Valtola R., Partanen T.A., Alitalo K.: Lymphatic endothelium and Kapos's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3, *Cancer Res.* 1998, 58: 1599-1604
- Kaipainen A., Korhonen J., Dumont D.: Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development, *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995, 92: 3566-3570
- Karkkainen M. et al.: Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins, *Nature Immunol.* 2004, 5: 74-80
- Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G.: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF, *Science.* 1989, 246: 1309-1312

- Kehe K., Abend M., Ridi R., van Beuningen D.: Tissue engineering with HaCaT cells and a fibroblast cell line, *Arch Derma Res.* 1999, 291: 600-605
- Kerjaschki D. et al.: Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants, *Nat Med.* 2006, 12: 230-234
- Kissin M.W., Querci G., Easton D., Westbury G.: Risk of lymphedema following the treatment of breast cancer, *Brit J Surg.* 1986, 73: 580-584
- Kremer M., Zuckermann R., Avraham Z., Raz R.: Long-term antimicrobial therapy in the prevention of recurrent soft-tissue infections, *J Infect.* 1991, 22: 37-40
- Kriehuber E., Breiteneder-Geleff S., Maurer D.: Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages, *J. Exp. Med.* 2001, 194: 797-808
- Laurent T.C., Fraser J.R.: Hyaluronan, *Fed Am Soc Exp Biol.* 1992, 6: 2397-2404
- Lee S.W., Morhenn V.B., Ilnicka M., Allison A.C.: Autocrine stimulation of interleukin-1 α and transforming growth factor α production in human keratinocytes and its antagonism by glucocorticoids, *J Invest Dermatol.* 1991, 97: 106-110
- Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science.* 1989, 246: 1306-1309
- Li J., Chen J., Kirsner R.: Pathophysiology of acute wound healing, *Clin. In Dermatol.* 2007, 25: 9-18
- Liebsch M., Spielmann H.: Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology, *Toxicology Letters.* 2002; 127: 127-34
- Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: *Pharmakologie und Toxikologie*, 2003 Georg Thieme Verlag Stuttgart, 15. Auflage
- Lüpke N.P.: Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential, *Food Chem Toxicol.* 1985, 23: 287-291
- Lüpke N.P.: Toxikologisch-pharmakologische Prüfmöglichkeiten am bebrüteten Hühnerei, In: Schöffl H., Schulte-Hermann R., Tritthart H.A.: *Möglichkeiten und Grenzen der Reduktion von Tierversuchen*, 1992, Springer-Verlag
- Lüring C., Kalteis T., Wild K., Perlick L., Grifka J.: Gewebetoxizität lokaler Anästhetika im HET-CAM-Test, *Schmerz.* 2003; 17: 185-190
- Maas-Szabowski N., Fusenig N.E.: Interleukin 1 induced growth factor expression in postmitotic and resting fibroblasts, *J Invest Dermatol.* 1996, 107: 849-855
- Maas-Szabowski N., Stärker A., Fusenig N.E.: Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- α , *J Cell Science.* 2003, 116: 2937-2948

- Mackenzie I., Rittman G., Bohnert A., Breitzkreutz D., Fusenig N.E.: Influence of connective tissues on the in vitro growth and differentiation of murine epidermis, *Epithelial Cell Biol.* 1993, 2: 107-119
- Mäkinen T.P., Veikkola T., Alitalo K.: Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/ D receptor VEGFR-3, *EMBO J.* 2001, 20: 4762-4773
- Märkl B., Kerwel T., Jähring H., Anthuber M., Arnholdt H.: Lymphknotenpräparation bei kolorektalen Karzinomen, *Pathologe.* 2008, 29: 274-279
- Mersch-Sundermann V., Brenner K.P.: *Medizinische Mikrobiologie für MTA*, 1989, Georg Thieme Verlag
- Miltenyi Biotec GmbH: Isolation and analysis of neural cells using MACS[®] Technology, 2007
- Mouta C.C., Nasser S.M., di Toaso E., Jain R.K.: LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal live blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis, *Cancer Res.* 2002, 61: 8079-8084
- Mutschler E., Schaible H-G. Vaupel P.: *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*, 2007, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 6. Auflage
- Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Ruth P., Schäfer-Korting M.: *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 2008, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 9. Auflage
- Norgall S., Papoutsi M., Weich H.A.: Elevated expression of VEGFR-3 in lymphatic endothelial cells from lymphangiomas, *BMC Cancer.* 2007, 1: 105-118
- Nagy J.A., Vasile E., Detmar M.J.: Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis, *J Exp Med.* 2002, 196: 1497-1506
- Oh S.J., Jeltsch M.M., John E.G., Wilting J.: VEGF and VEGF-C: Specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane, *Devel Bio.* 1997, 188: 96-109
- Papoutsi M., Tomarev S.I., Wilting J.: Endogenous Origin of the Lymphatics in the Avian Chorioallantoic Membrane, *Devel Dynamics.* 2001, 222: 238-251
- Petrova T.V., Mäkinen T.P., Alitalo K.: Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor, *EMBO J.* 2002, 21: 4593-4599
- Petrek J.A., Heelan M.C.: Incidence of breast carcinoma-related lymphedema, *Cancer.* 1998, 83: 2776-2781

- Phillips W.G., Feldmann M., Breathnach S.M., Brennan F.M.: Modulation of the Il-1 cytokine network in keratinocytes by intracellular Il -1 alpha and Il-1 receptor antagonist, *Clin Exp Immunol.* 1995, 101: 177-182
- Piso U., Schäfer P., Gehrke A.: Manuelle Lymphdrainage mit anschließender Kompressionsbehandlung im Gesichts-Halsbereich bei steroidindiziertem cushingoidem Vollmondgesicht unter laufender Kortisontherapie einer Polymyositis, *Kasuistik, Phys Rehab Kur Med.* 1998, 8: 192-195
- Pittelkow M.R., Lindquist P.B., Abraham R.T., Graves-Deal R., Coffey R.J.: Induction of transforming growth factor- α expression in human keratinocytes by phorbol esters, *J Biol Chem.* 1989, 264: 5164-5171
- Prevo R., Banerji S., Ferguson D.J., Jackson D.G.: Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium, *J Biol Chem.* 2001, 276: 19420-19430
- Presta M., Rusnati M., Belleri M., Ribatti D.: Purine analogue 6-methylmercaptopurine riboside inhibits early and late phase of the angiogenic process, *Cancer Res.* 1999, 59: 2417-2424
- Qigley J.P., Armstrong P.B.: Tumor cell intravasation alu-citated: the chick embryo opens the window, *Cell.* 1998, 94: 281-284
- Radtke J.: Postoperative Lymphödeme bei Patienten mit oropharyngealen Karzinomen, *Lymphologica Jahresband.* 1996: 64-70
- Ribatti D., Vacca A., Constantino F., Dammacco F.: Exogenous heparin induces fibronectin overexpression parallel to angiogenesis in the extracellular matrix of the chick embryo chorioallantoic membrane, *Tissue Cell.* 1997 a, 29: 131-136
- Ribatti D., Gualandris A., Bastaki M.: New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: the gelatin sprone/ chorioallantoic membrane assay, *J Vasc Res.* 1997 b, 34: 455-463
- Rishi A.K., Joyce-Brady M., Williams M.C.: Cloning, characterization and developmental expression of a rat lung alveolar type I cell gene in embryonic endodermal and neural derivatives, *Dev Biol.* 1995, 167: 249-230
- Rumble R.H., Roberts M.S., Scott A.R.: The effect of posture on the pharmacokinetics of intravenous benlypenicillin, *Eur J Clin Pharmacol.* 1986, 30: 731-734
- Ryle C.M., Breikreutz D., Stark H.J., Roop D., Fusenig N.E.: Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT an in ras-transfected tumorigenic clones, *Different.* 1989, 40: 42-54
- Sabin F.R.: On the origin of the lymphatic system form the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig, *Am J Anat.* 1902, 1: 367-391
- Schacht V., Ramirez M.I., Hong Y.K., Hirakawa S.: T1 α / Podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema, *EMBO J.* 2003, 14: 3546-3556

- Sasseti C., Tangemann K., Singer M.S., Rosen S.D.: Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin. Parallels to CD34, *J Exp Med.* 1998, 187: 1965-1975
- Scharffetter-Kochanek K., Klein C.E, Heinen G., Krieg T.M., Plewig G.: Migration of a human keratinocyte cell line (HACAT) to interstitial collagen typ I is mediated by the $\alpha_2\beta_1$ -integrin receptor, *J Invest Derma.* 1992, 98: 3-11
- Schmid-Schonbein G.W.: Mechanisms causing initial lymphatics to expand and compress to promote lymph flow, *Arch Histol Cytol.* 1990; 53: 107-114
- Schoop V.M., Miranecce N., Fusenig N.E.: Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts, *J Invest Derma.* 1999, 112: 343-353
- Shenoy R.K., Kumaraswami V., Suma T.K.: A double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of oral penicillin, diethylcarbamazine or local treatment of the affected limb in preventing acute adenolymphangitis in lymphoedema caused by brugian filariasis, *Ann Trop Med Parasitol.* 1999, 93: 367-377
- Sjöblom A.C., Eriksson B., Jorup-Rönström C., Lindqvist M.: Skin concentration of phenoxymethyl-penicillin in patients with erysipelas, *Infection.* 1992, 20: 30-33
- Skobe M.; Detmar M.: Structure, function and molecular control of the skin lymphatic system, *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2000, 5: 14-19
- Spötter D.C.: Der Retinoidmetabolismus in HaCaT-Zellen, Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen. 2003
- Stacker S.A., Achen M.G., Jussila L., Alitalo K.:Lymphangiogenesis and cancer metastasis, *Nat Rev Cancer.* 2002, 2: 573-583
- Ströberl C.: The importance of local factors in recurrent erysipelas, *Z Hautkr.* 1985, 60: 712-723
- Thews G., Mutschler E., Vaupel P.: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 2007, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 6. Auflage
- Timi J.R.R., Zanoni M.F., Stacheski M., Yamada S.: Lymphatic damage after operation for varicose veins: a lymphoscintigraphique study, *Europ J Lymph.* 1999, 7: 43-44
- Tomarev S.I., Sundin O., Duncan M.K., Piatigorsky J.: Chicken homeobox gene Prox-1 related to *Drosophila prospero* is expressed in the developing lens and retina, *Devel Dynam.* 1996, 206: 354-367
- Tsopanoglou N.E., Haralabopoulos G.C., Maragoudakis M.E., Opposing effects on modulation of angiogenesis by PKC and c-AMP mediated pathways, *J Vasc Res.* 1994, 31: 195-204
- Vacca A., Iurlaro M., Ribatti D., Minischetti M., Dammacco F.: Antiangiogenesis i produced by nontoxic doses of vinblastine, *Blood.* 1999, 94: 4143-4155

- Vignes S., Dupuy A., Recurrence of lymphoedema-associated cellulitis (erysipelas) under prophylactic antibiotherapy: a retrospective cohort study, *JEADV*. 2006, 20: 818-822
- Vindarell M.P., Garcia L.: The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails, *Toxicology In Vitro*. 2000, 14: 551-555
- Voggenreiter G., Dold C.: *Wundheilung*, 2004, Thieme-Verlag, 1. Auflage
- Weissleder H., Schuchhardt C.: *Erkrankungen des Lymphgefäßsystems*, 1996, Karger Kommunikation, 2. Auflage
- Werner G.T.: Das Lymphödem in Diagnostik und Therapie, *Phys Med Rehab Kuror*. 2001, 11: 71-76
- Wetterwald A., Hofstetter W., Cecchini M.G., Atkinson M.: Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone*. 1996, 18: 125-132
- Wigle J.T., Oliver G.: Prox-1 function is required for the development of the murine lymphatic system, *Cell*. 1999, 6: 769-778
- Wigle J.T., Harvey N., Detmar M.: An essential role for Prox-1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype, *EMBO J*. 2002, 21: 1505-1513
- Wilting J., Christ B., Bokeloh M.: A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. Studies on the effects of carriers, PBS, angiogenin and bFGF, *Anat Embryol*. 1991, 183: 259-271
- Wilting J., Christ B., Weich H.A.: The effect of growth factors on day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF165 and PDGF-BB, *Anat Embryol*. 1992, 186: 251-257
- Wilting J., Christ B., Bokeloh M., Weich H.A.: In vivo effects of vascular endothelial growth factor on the chicken chorioallantoic membrane, *Cell Tissue Res*. 1993, 274: 163-172
- Wilting J., Birkenhager R., Eichmann A., McCarthy J.E.G., Weich H.A.: VEGF121 induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of the chorioallantoic membrane, *Dev Biol*. 1996, 179: 76-85
- Wilting J., Eichmann A., Christ B.: Expression of the avian VEGF receptor homologues Quek1 and Quek2 in blood-vascular and lymphatic endothelial and non-endothelial cells during quail embryonic development, *Cell Tissue Res*. 1997, 288: 207-233
- Wilting J., Papoutsi M., Christ B., Rössler J.: The transcription factor Prox 1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues, *FASEB J*. 2002, 16: 1271-1273
- Zaidel-Bar R., Cohen M., Addadi L., Geiger H.: Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes, *Biochem Soc Trans*. 2004, 32: 416-420

Literaturverzeichnis

- Zimmer G., Klenk H.D., Herrler G.: Identification of a 40.kd cell surface sialglycoprotein with the characteristics of a major influenza C virus receptor in a Madin-Darby canine kidney cell line, J Biol Chem. 1995, 270: 17815-17822
- Zinovieva R.D., Duncan M.K., Tomarev S.I.: Structure and chromosomal localization of the human homoeoc gene Prox-1, Genomics. 1996, 35: 517-522
- Zöltzer H.: Funktionelle Anatomie der Lymphbildung, Lymph Forsch. 2003, 7: 60-68

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie (Leiter: Prof. Dr. J. Wohlrab) an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Herrn Prof. Dr. Wohlrab danke ich sehr für die Übertragung des interessanten Themas und die umfassende Unterstützung und Beratung in allen Phasen der Arbeit.

Bei Herrn Dr. T. Klapperstück bedanke ich mich für die Unterstützung und Beratung bei den Untersuchungen zur Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz.

Mein besonderer Dank gilt Frau K. Hölsken und Frau U. Schramm für die intensive Unterstützung bei allen Facetten des Laboralltags und für die kompetente und liebevolle Pflege der Zellkulturen.

Bei Frau C. Bruhne bedanke ich mich ganz besonders für ihre methodische Fachkenntnis und Experimentierfreude.

Frau C. Lindhof danke ich für die Hilfe bei allen immunhistochemischen Untersuchungen.

Frau K. Rzepka und Frau C. Willing danke ich besonders für die ständige Diskussionsbereitschaft und die fröhliche Arbeitsatmosphäre.

Frau Prof. C. Kloft danke ich sehr für die Möglichkeit, die pharmakokinetischen Modellberechnungen durchzuführen.

Bei Herrn M. Scholz bedanke ich mich besonders für die unkomplizierte Unterstützung und Beratung bei den pharmakokinetischen Modellberechnungen.

Bei Herrn Dr. H. Weich bedanke ich mich sehr herzlich für die Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei allen Fragen zur Endothelzellkultivierung.

Der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt danke ich sehr für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund von ganzem Herzen für ihre Geduld und ihren Rückhalt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Bern,

Ingrid Hünenbein

Lebenslauf

1. Angaben zur Person:

Name: Ingrid Hümerbein
Geburtsdatum/ -ort: 02.06.1977, Naumburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

2. Schulbildung:

1984 – 1991 Polytechnische Oberschule „Fritz Weineck“, Naumburg
1991 – 1996 Domgymnasium, Naumburg (Abitur)

3. Ausbildung:

1996 – 1997 Ausbildung zur Pharmazeutisch Kaufmännischen Angestellten

4. Studium:

1997-2003 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Pharmazie
2003-2004 Praktikum in der Löwen-Apotheke, Naumburg
2004 Diplom an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
Thema: Beiträge zur Aufklärung des P-Selektin-abhängigen Mechanismus bei der Metastasierung der Melanom-Zelllinie NW 1539
2005 Approbation als Apotheker

5. Promotion:

2005-2008 Institut für Angewandte Dermatopharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg
Thema: Untersuchung toxikologischer Effekte von Penicillin G auf das initiale Lymphgefäßsystem und auf die Epithelregeneration der humanen Haut.

6. Berufstätigkeit:

2008-2009 Lorbeerbaum-Apotheke, Naumburg
2009- lfd. CSL Behring AG, Bern

Bern,

Ingrid Hümerbein