

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und
Verbrennungschirurgie an der Universität Tübingen

**Der Einfluss von Zytokin MCP-2 auf die Wundheilung
von Typ II Diabetikern**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Mayer, Larissa
2018**

Dekan: Professor Dr. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schenk
Tag der Disputation: 08.10.2018

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis

II. Abbildungsverzeichnis

III. Tabellenverzeichnis

1. Einleitung.....	9
1.1 Grundlagen	11
1.1.1.Diabetes mellitus	11
1.1.2. Physiologische Wundheilung und die Rolle von Makrophagen.....	15
1.1. 3 Wundheilungsstörung bei Diabetikern	18
1.2. Fragestellung	19
1.3. Arbeitshypothese	19
2. Materialien	20
2.1. Chemikalien	20
2.2. Nährmedien	20
2.3. Puffer	20
2.4.Kits	21
2.5. Geräte	21
2.6. Software	21
2.7. Humanes Material	22
2.8. Zellkulturen	25
2.8.1. THP-1 Zelle.....	25
2.8.2. HaCaT	25
2.8.3. Fibroblasten	26
3. Methoden	27
3.1. Semi-quantitatives Zytokinarray	27
3.1.1. Prinzip des Zytokinarray	27
3.1.2. Durchführung	28
3.2. Sandwich ELISA	30
3.2.1. Prinzip des Sandwich ELISA Tests	30
3.2.2. Durchführung	31
3.3. Chemotaxis Assay	33
3.3.1. Prinzip des Chemotaxis Assays	33

3.3.2. Durchführung	34
3.4. Scratch Assay	35
3.4.1. Prinzip des Scratch Assay	35
3.4.2. Durchführung	35
3.5. Quantitative Polymerasekettenreaktion	37
3.5.1. Herstellung des 1,5% Agarose- Gels	37
3.5.2. Verwendete Primer	37
3.5.3. RNA Isolation und Integritätscheck	38
3.5.4. PCR Amplifikation mit GAPDH, CCL8 und 2 Primern	40
3.6. Statistik	43
4. Ergebnisse	44
4.1. Veränderte Zytokinspiegel im Serum von Diabetikern und IGT	44
4.2. Erniedrigte MCP-2 Serumspiegel bei T2DM und IGT	46
4.3. MCP-2 Serumkonzentrationen bei therapierten T2DM unter SU- und Insulintherapie erniedrigt, unter DPP4-Inhibitortherapie erhöht	47
4.4. Einfluss von MCP-2 und Glukose auf Migration von THP-1 Zellen	48
4.5. HaCaT-Keratinocyten und Spender-Fibroblasten zeigen einen schnelleren Defektverschluss unter Zugabe von THP-1-Zell-Sekretom	49
4.6. Genexpression von MCP-2 in HaCaT unter hyperglykämien Bedingungen	52
4.7. Einfluss Glukose auf Genexpression von MCP-1 in HaCaT	53
5. Diskussion	54
5.1. Kritikpunkte	60
6. Zusammenfassung.....	62
7. Bibliografie	64
8. Erklärung	70

1. Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine Serum Albumin
BMI	Body Mass Index (kg/m ²)
CCL2	CC-chemokine Ligand 2 = MCP-1
CCL7	CC-chemokine Ligand 7 = MCP-3
CCL8	CC-chemokine Ligand 8 = MCP-2
CCL13	CC-chemokine Ligand 13 = MCP-4
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD8	Cluster of Differentiation 8
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid = Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DPP4	Dipeptidylpeptidase 4
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid = Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1
GLUT	Glukosetransporter
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GRO	Growth-regulated Protein
GRO- α	Growth-regulated Protein alpha
HaCaT	Human Adult Low Calcium high Temperature Keratinocytes
HG	Hyperglykämie
HRP	Horseradish peroxidase
IFN- γ	Interferon-gamma
IFG	Impaired Fasting Glucose
IGT	Impaired Glucose Tolerance
IL-X	Interleukin- X
KI	Konfidenzintervall

LAN	Lantus
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1 = CCL2
MCP-2	Monocyte Chemoattractant Protein 2 = CCL8
MCP-3	Monocyte Chemoattractant Protein 3 = CCL7
MCP-4	Monocyte Chemoattractant Protein 4 = CCL13
MET	Metformin
MIG	Monokine induced by Gamma-Interferon
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
NG	Normoglykämie
NO	Stickstoffmonoxid
oGTT	Orales Glukosetoleranz-Test
PBMC	Peripheral Blood Monocyte Cells
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
P/S	Penicillin/Streptomycin Solution
RANTES	Regulated on Activation, normal T cell Expressed and Secreted
RI	Relative Intensität
RNA	Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur = 20-23°C
SEM	Standard Error of Mean = Standardfehler
SGLT	Sodium Dependent Glucose Transporter = Natrium/Glucose-Cotransporter
SU	Sulfonylharnstoff
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
T1DM	Typ 1 Diabetes mellitus
TGF- β 1	Transforming Growth Factor beta
THP1	THP1 Monocytic Cell Line
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNF- β	Tumornekrosefaktor-beta
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WHO	World Health Organisation

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung Nr.	Seite	Erklärung
Abbildung Nr.1	14	Algorithmus der Therapie des Typ 2 Diabetes mellitus
Abbildung Nr.2	16	Phasen der physiologischen Wundheilung
Abbildung Nr.3	18	Schematische Darstellung verschiedener Mechanismen der pathologischen Wundheilung
Abbildung Nr.4	27	Prinzip des Zytokin Arrays
Abbildung Nr.5	29	Chemilumineszenz Messung mittels FLUOstar Omega
Abbildung Nr.6	30	Prinzip des Sandwich ELISA
Abbildung Nr.7	32	Standardkurven ELISA MCP-2 und MCP-1
Abbildung Nr.8	33	Prinzip der Boyden Kammer
Abbildung Nr.9	34	Belegung der 24-Kammer Platten für Chemotaxis Assay
Abbildung Nr.10	36	Auswertung der Scratch Assay Bilder über die Freeware Image J
Abbildung Nr.11	39	Intakte vs. Degradierete RNA
Abbildung Nr.12	42	ThermoScientific pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker
Abbildung Nr.13	44	Logarithmische Übersichts-Darstellung der relativen Intensität der Zytokine
Abbildung Nr.14	45	Graphische Darstellung der relativen Intensität der Zytokine in Boxplot Form im Zytokin Assay
Abbildung Nr.15	46	Vergleich Konzentration MCP-2 in ng/ml zwischen Kontroll-, IGT- und T2DM-Gruppe
Abbildung Nr.16	47	Vergleich Konzentration MCP-2 in ng/ml zwischen Kontrollgruppe und Therapiegruppen: SU+MET, LAN +MET und DPP4+MET
Abbildung Nr.17	47	Vergleich Konzentration MCP-2 in ng/ml SU+MET und LAN+MET zu DPP4+MET Gruppe
Abbildung Nr.18	48	Chemotaxis Assay: THP-1 Zellmigration auf chemotaktischen Reiz durch MCP-2
Abbildung Nr.19	49	HaCaT Scratch Assay Bild zum Zeitpunkt t=0 h und t=18 h sowie mit und ohne Zugabe von THP-1 Sekretom

Abbildung Nr.	Seite	Erklärung
Abbildung Nr.20	50	Fibroblasten Scratch Assay zum Zeitpunkt t=0 h und =18 h sowie mit und ohne Zugabe von THP-1 Sekretom
Abbildung Nr.21	51	Ergebnisse Scratch Assay mit HaCaT
Abbildung Nr.22	51	Ergebnisse Scratch Assay mit Fibroblasten
Abbildung Nr.23	52	Genexpression von MCP-2/CCL8 in HaCaT
Abbildung Nr.24	52	Gelelektrophoresebanden von CCL8, CCL2 und GAPDH
Abbildung Nr.25	53	Genexpression von MCP-1/CCL2 in HaCaT
Abbildung Nr.26	55	Übersichtsdarstellung der Rezeptoraffinität der verschiedenen Mitglieder der MCP-Familie

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle Nr.	Seite	Erklärung
Tabelle Nr.1	12	Diagnosekriterien für Diabetes mellitus, IGT und IFG in venösem Plasma
Tabelle Nr.2	23	Durchführung des 75g OGTT nach WHO Richtlinien
Tabelle Nr.3	23	Demographische Daten der Kontrollgruppe, IGT-Gruppe und T2DM-Gruppe
Tabelle Nr.4	37	Für PCR verwendete Primer mit Sequenzen
Tabelle Nr.5	41	Primer Bedingungen der PCR für GAPDH, CCL8 und CCL2

1. Einleitung

Diabetes mellitus, altgriechisch für „honigsüßer Durchfluss“, bezeichnet eine Gruppe von Stoffwechselkrankheiten, die als Gemeinsamkeit die chronische Hyperglykämie haben.

Dadurch bedingt kommt es zu verschiedenen Veränderungen und gesundheitlichen Schäden im gesamten Organismus. Die resultierende Multimorbidität führt bei Erkrankten zu einer starken Einschränkung der Lebensqualität [1] und, besonders bei mangelnder Therapie, auch zu einer reduzierten Lebenserwartung [2].

Diabetes mellitus betrifft einen beachtlichen Teil der weltweiten Bevölkerung.

Hochrechnungen der International Diabetes Föderation gehen von bis zu 552 Millionen Betroffenen im Jahr 2030 aus [3]. Aufgrund der in der Initialphase oft fehlenden klinischen Symptomatik ist von einer hohen Dunkelziffer auszugehen.

Durch die Globalisierung und den sich damit verändernden Lebensstil, Anstieg der allgemeinen Lebenserwartung sowie Zunahme von Adipositas und dem metabolischen Syndrom, steigt gerade in Schwellen- und Entwicklungsländern, besonders im asiatischen Raum, die Inzidenz rapide an. Diese Zunahme, insbesondere die der Folgeschäden des Diabetes, stellt die Welt vor eine große gesundheitsökonomische Herausforderung [4].

Seit Langem ist bekannt, dass Diabetiker eine gestörte und verzögerte Wundheilung haben, die auch schon bei Bagatellverletzungen zu erhöhten Komplikationsraten führt [5].

Bereits 1852 stellte der Arzt und Anatom Marchal de Calvi eine Verbindung zwischen spontanen Ulzerationen und Glukosurie fest und legte damit den Grundstein für den Forschungsbereich der diabetischen Wundheilungsstörung [6]. Durch die Fortschritte in der chirurgischen Versorgung und durch die industrielle Produktion des Insulins wurde schon in den 1920er und 30er Jahren die Bedeutung eines gut eingestellten Blutzuckers für das intra- und postoperative Ergebnis betont [7].

Auch nach jahrzehntelanger Forschung hat die Problematik der Wundheilungsstörung heutzutage weiterhin eine große Bedeutung für das weit verbreitete diabetische Fußsyndrom [8], sowie für die chirurgische Versorgung traumatisierter Diabetespatienten. Durch die kommende Inzidenzzunahme wird diese Bedeutung auf medizinischer und gesundheitsökonomischer Ebene weiter zunehmen.

Bedingt ist die Wundheilungsproblematik durch die Kombination aus schlechterer Durchblutung, einem gestörtem Immunsystem, herabgesetzter Sensibilität in den Extremitäten und erhöhter Verletzungsgefahr [8].

So führen beispielsweise kardiovaskuläre & neurologische Komorbiditäten, sowie ein im Durchschnitt hoher BMI bei Diabetikern zu einem primär erhöhtem Sturzrisiko [9] und damit verbundenen Weichteilverletzungen und Frakturen [10], welche für den Patienten ein vermehrtes intra- und postoperatives Komplikationsrisiko darstellen.

Auch das Amputationsrisiko, hauptsächlich des Vorfusses und der unteren Extremitäten, ist bis zu 15 Mal höher als bei Gesunden [11]. 2002 wurde von Moulik et al. in einer prospektiven Studien von neu aufgetretenen Fußulzerationen bei Diabetikern eine 5-Jahre-Amputations-Wahrscheinlichkeit von durchschnittlich 19% festgestellt [12]. Zwar konnte die relative Zahl der Amputationen in den letzten Jahrzehnten in Industrieländern durch konsequente Patientenaufklärung, gezielte diabetische Fußpflege und neue interdisziplinäre Therapieansätze reduziert werden, dennoch steigt die absolute Anzahl der Amputationen. Die Wahrscheinlichkeit eines Diabetikers im Laufe seines Lebens eine Amputation zu erhalten ist immer noch 8 Mal höher als die eines Nicht-Diabetikers [13].

Wundheilungsstörungen bei Diabetikern stellen somit ein relevantes gesellschaftliches Thema dar. Sowohl für den einzelnen Betroffenen, der in seinem Leben eingeschränkt wird, als auch für das Gesundheitssystem. Dieses wird durch Diabetes-assoziierte Komplikationen finanziell stark belastet [14]. Besonders im Hinblick auf die weltweit steigende Inzidenz ist es wichtig den Pathomechanismus besser zu verstehen und neue, idealerweise kostengünstige, Therapieansätze zu finden.

1.1 Grundlagen

1.1.1. Diabetes mellitus

Bei Diabetes mellitus kommt es über verschiedene Störungen in der Insulinproduktion, -ausschüttung und -wirkung dazu, dass Glukose aus dem Serum nicht adäquat in das Gewebe aufgenommen wird und eine chronisch erhöhte Glukosekonzentrationen im Blut vorliegt [15]. Gleichzeitig besteht ein intrazellulärer Glukosemangel. Die chronische Hyperglykämie schädigt die Wände der kleinen und großen Blutgefäße durch eine Vielzahl an Prozessen wie oxidativer Stress, Enzymaktivierung und Wandablagerungen. Diese sogenannte endotheliale Dysfunktion ist Auslöser der typischen Diabetesassozierten Mikro- und Makroangiopathien, welche Mitverursacher der diabetischen Retinopathie, Nephropathie, Enteropathie oder der Neuropathie sind [16]. Gleichzeitig wirkt Glukose neurotoxisch [17] und trägt somit durch Schädigung der peripheren und vegetativ-autonomen Nerven zum Progress dieser assoziierten Krankheiten bei.

Der Begriff Diabetes wird im allgemeinen Sprachgebrauch oft synonym für den insulinunabhängigen Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) verwendet, da dieser den Großteil (85-95%) aller Diabetesdiagnosen ausmacht. Neben dem Typ 2 Diabetes gibt es den insulinabhängigen Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM). Dieser zeichnet sich durch einen primär absoluten Insulinmangel aus, welcher durch autoimmune Zerstörung der Beta-Zellen des Pankreas bedingt ist. Weitere seltene Unterformen sind der während der Schwangerschaft auftretende Gestationsdiabetes (GD) sowie die MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) Diabetestypen [15]. Je nach Diabetesform unterscheiden sich die Ätiologie, der Pathomechanismus und die Folgeschäden. Die Differentialdiagnose zwischen Diabetes mellitus Typ 1 oder 2 und MODY wird anhand von klinischen und metabolischen Markern gestellt.

Der Pathomechanismus von T2DM ist multifaktoriell bedingt. Genetische Prädisposition [18], Epigenetik und Umweltfaktoren [19] spielen eine Rolle. Die Hyperglykämie entsteht unter anderem durch eine periphere Insulinresistenz der Zellen, Herabregulierung der Insulinrezeptoren und Veränderung der Glukosetransporter. Kompensatorisch kommt es zu vermehrter Insulinausschüttung, der Hyperinsulinämie, welche im Verlauf der Krankheit zu einer Beta-Zell Dysfunktion

führt. Dadurch kann es auch bei T2DM im Spätstadium zum Insulinmangel kommen [20].

Als Prädiabetiker werden Personen bezeichnet bei denen eine nachweisliche Störung des Glukosestoffwechsels vorliegt, diese aber nicht die Kriterien eines manifesten Diabetes erfüllt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die glukosebedingten Organschädigungen und Komplikationen bereits in diesem Stadium einsetzen.

Bei Prädiabetikern liegt eine abnorme Nüchternglukose (IFG) und/oder eine erhöhte post-prandiale Glukosekonzentration (IGT) vor. Von der Gruppe der Prädiabetiker gehen jedes Jahr 5-10% in einen manifesten Diabetes über. Dieselbe Anzahl kann über Ernährungs- und Lebensstiländerung sowie Metformin-Therapie zurück in die Normoglykämie gebracht werden [21]. Zur Vermeidung des Krankheitsprogresses und der Komplikationen versucht man heutzutage dieses Vorstadium frühestmöglich zu diagnostizieren und beginnt direkt mit einer Therapie.

Die Diagnose des Diabetes sowie des Prädiabetes wird bei klinischem Verdacht über eine Nüchternblutabnahme oder einen oralen Glukosetoleranztest (OGTT) gestellt.

Tabelle 1 stellt die Diagnosekriterien nach den nationalen Versorgungsleitlinien für Diabetes mellitus, IGT und IFG im venösen Plasma dar [22].

Seit 2010 kann auf Empfehlung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) ein Diabetes auch über den HbA1c Wert ausgeschlossen ($HbA1c < 5,7\%$) oder diagnostiziert ($HbA1c > 6,4\%$) werden. Aussagen über IGT und IFG werden anhand des HbA1c jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht gemacht [23].

IGT (Impaired glucose tolerance) gestörte/eingeschränkte Glukosetoleranz
2h-Plasmaglukose ≥ 140 mg/dl ($\geq 7,8$ mmol/l) und < 200 mg/dl ($< 11,1$ mmol/l) nach oraler Aufnahme von 75 g Glukose
IFG (Impaired fasting glucose) abnorme Nüchternglukose
Plasmaglukose ≥ 100 mg/dl ($\geq 5,6$ mmol/l) und < 126 mg/dl ($< 7,0$ mmol/l)
Diabetes mellitus
HbA1c $\geq 6,5\%$
OGTT-2-h-Wert im venösen Plasma ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l)
Nüchtern-Plasmaglukose von ≥ 126 mg / dl ($\geq 7,0$ mmol/l)
In den Leitlinien seit 2013 nicht mehr als Diagnosekriterium enthalten ist der Gelegenheits-Plasmaglukosewert von ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l)

Tabelle 1: Diagnosekriterien für Diabetes mellitus, IGT und IFG in venösem Plasma

Die Therapie des Diabetes erfolgt je nach Stadium. Unabhängig vom Stadium wird eine sogenannte Lebensstilmodifikation empfohlen, welche ein vorgegebenes Bewegungspensum, eine ausgewogene Ernährung, Rauchverzicht sowie regelmäßige medizinische Kontrollen beinhaltet. Als Basismedikament wird das Biguanid Metformin verwendet, das zur Hemmung der Glukoneogenese in der Leber führt [24] und die periphere Glukoseverwertung verbessert. In einer der weltweit größten Langzeit Diabetes-Studien, dem Diabetes Prevention Program, konnte ein signifikanter Benefit sowohl für Metformin als auch für die Lebensstilmodifikationen gezeigt werden [25]. In der Praxis werden diese beiden Therapieansätze meist parallel durchgeführt.

Die nächste Stufe der Diabetestherapie erfolgt mit folgenden Substanzgruppe: Sulfonylharnstoffe, Glinide, α -Glucosidase-Hemmer, SGLT-2-Hemmer, Inkretinmimetika und Dipeptidyl-Peptidase-4-Hemmer. Diese können in Monotherapie oder als Kombinationstherapie, je nach Begleiterkrankungen und Kontraindikationen, eingesetzt werden.

Ist unter dieser oralen Therapie keine adäquate Blutzuckereinstellung, gemessen am HbA1c-Wert, möglich, so wird auch der T2DM mit Insulin behandelt. Besonders die Gewichtszunahme als Nebenwirkung führte lange zu einem sehr zurückhaltenden Einsatz von Insulin bei Typ 2 Diabetikern. Die A1chieve-Studie [26] zeigte jedoch, dass ein schneller Beginn der Insulintherapie bei unzureichendem Therapieerfolg unter Basistherapie und oralen Antidiabetika zu einer signifikanten Reduktion des HbA1c-Wertes und damit zu einer Senkung der Langzeitschäden führt.

Die Grundzüge der antidiabetischen Therapie sind weltweit gleich. Es liegen jedoch unterschiedliche Empfehlungen in den einzelnen Nationalen Leitlinien zu Kombination und Beginn der nächsten Therapiestufe vor. Abbildung 1 zeigt das in Deutschland meist verwendete stufenartige Therapieschema der Deutschen Diabetes Gesellschaft auf.

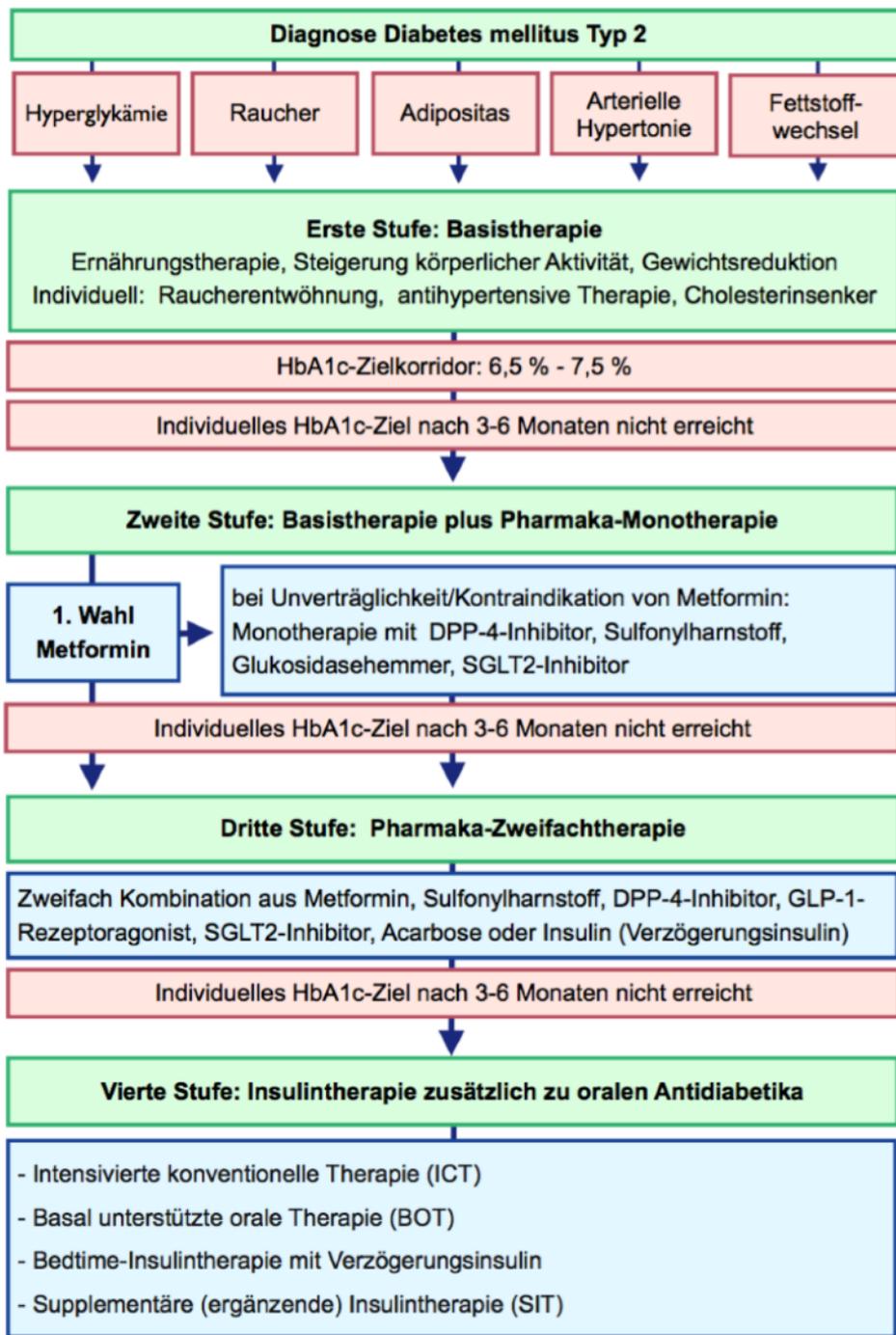


Abbildung 1: Algorithmus für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft nach den nationalen Versorgungsleitlinien [22]

1.1.2. Physiologische Wundheilung und die Rolle von Makrophagen

Als Wunde bezeichnet man die Zerstörung des Gewebeszusammenhangs einer äußeren oder inneren Körperoberfläche mit mehr oder weniger stark ausgeprägtem Substanzverlust und einhergehendem Funktionsverlust. Der folgende Prozess der Wundheilung dient zum Defektverschluss durch gewebsspezifische Regeneration oder gewebunspezifische bindegewebige Reparatur.

Der Wundheilungsprozess lässt sich in die Phasen der Hämostase, Inflammation, Proliferation und des Remodelings aufteilen. Zusammensetzung und Relevanz verschiedener Zelltypen sowie die von Gewebszellen exprimierte Chemokine unterscheiden sich dabei von Phase zu Phase. Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine und stellen womit einer Untergruppe der Zytokinfamilie dar. Als Signalproteine lösen sie über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Zellwanderung aus [27].

Die Aufgabe der Chemokine liegt darin über chemotaktische Reize Lymphozyten, Neutrophile und Monozyten aus dem zirkulierenden Blut zur Wunde zu rekrutieren [28] und die Neoangiogenese zu steuern [29].

So werden beispielsweise die Chemokine IL-8, GRO-alpha und MCP-1 über die verschiedenen Wundheilungsphasen hinweg in bestimmter Reihenfolge von lokalen Zellen exprimiert. In der Frühphase, besonders in nekrotischen Bereichen, sind Neutrophile und Monozyten anwesend, in der Spätphase dagegen nur um Gefäße zentrierte Monozyten [30].

Die Wundheilung beginnt mit der Phase der Hämostase, der Blutstillung, in der Thrombozyten in ein Netz auf Fibrinfasern eingebettet sind. Thrombozyten sezernieren Wachstumsfaktoren wie PDGF [31], welche die Kaskade der Wundheilung initiieren. Durch diese Wachstumsfaktoren sowie durch eine Anzahl an weiteren Zytokinen wie TGF β , PF4 und IL-8 wandern neutrophile Granulozyten in die Wunde ein. Neutrophile machen am ersten Tag der Wundheilung 50 % der Zellen in einer Wunde aus und sind somit kennzeichnend für die inflammatorische Phase [28]. Sie sezernieren die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β , die zur Aktivierung von Keratinozyten und Fibroblasten führen, aber auch weitere Zytokine wie das Chemokin MCP-2 [32], welche die Rekrutierung von Makrophagen starten.

Zu Makrophagen differenzierte Monozyten spielen eine tragende Rolle in der Vaskularisierung des Granulationsgewebes und der folgenden Epithelialisierung [33] durch ihre vielfältige Zytokinproduktion.

Makrophagen beenden durch Induktion der Neutrophilenapoptose und Phagozytose des Zellmaterials die inflammatorische Phase [34] und leiten über die Phase der Proliferation das Remodeling ein. VEGF führt zur Neoangiogenese während KGF die Keratinozyten-Rekrutierung zur Bildung der Neodermis verstärkt [35].

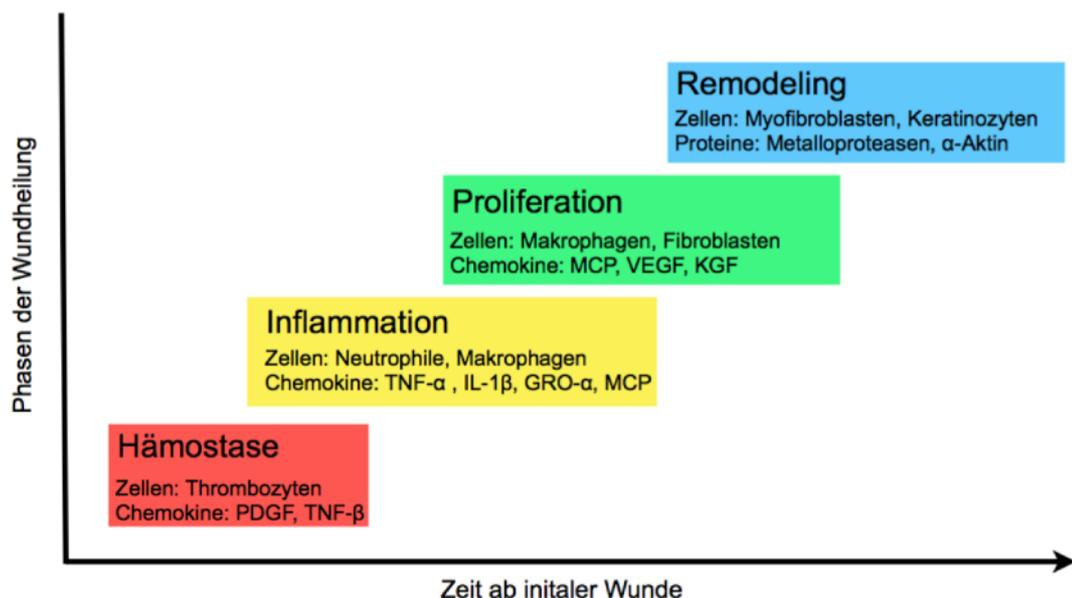


Abbildung 2: Phasen der physiologischen Wundheilung mit einer Auswahl an beteiligten Zellen und sezernierten Chemokine

Die im Blut zirkulierenden Monozyten werden über den Chemokin-Rezeptor-2 in zwei Subgruppen, die inflammatorischen CCR2+Ly6C^{high} und die nicht-inflammatorischen CCR2-Ly6C^{low} Monozyten eingeteilt [36].

Der CCR2-Rezeptor hat als Liganden die Chemokine MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13) und Eotaxin 1 (CCL11) [37]. Diese Chemokine sind daher in der Lage die inflammatorischen Monozyten chemotaktisch anzuregen in die Wunde einzuwandern.

Das Chemokin MCP-2 wurde 1992 von Jo Van Dam et al. in Riga identifiziert [38]. Wie auch MCP-1 und MCP-3 zieht es *in-vivo* Monozyten, CD4 und CD8 T-Lymphozyten, nicht jedoch neutrophile Granulozyten an [39]. Die Unterscheidung innerhalb der MCP- Chemokinfamilie liegt in ihrer Rezeptoraffinität. So benutzt MCP-2 die Rezeptoren CCR1, CCR5 und CCR2B [40] und bekommt dadurch sein eigenes Funktionsmuster.

Nur die Chemokine CCL-2, CCL7, CCL13 und CCL11 zeigen ein über 50% ähnliches Sequenzcluster im Vergleich zu MCP-2/CCL8 wenn man die Chemokine in BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) vergleicht.

Auch wenn die genaue Bedeutung von MCP-2 in inflammatorischen Prozessen noch nicht eindeutig geklärt ist, wurde das Chemokin unter anderem mit Atopischer Dermatitis [41], als Diagnostikmarker für Tuberkulose [42] und Graft vs Host Disease [43] sowie mit der Blockierung der CCR5 abhängigen HIV-1 Replikation [44] in Verbindung gebracht.

1.1.3. Wundheilungsstörung bei Diabetikern

Das Zusammenspiel einer Vielzahl an Mechanismen führt bei Diabetikern zu einer verzögerten und strukturell schlechteren Wundheilung. Abbildung 2 bietet einen kleinen Einblick in diese pathologische Wundheilung und die verschiedenen gestörten Prozesse. Direkt epidermal liegt eine Migrations- und Differenzierungsstörung der Keratinozyten vor [45]. Diese wird unter anderem durch eine gesteigerte Expression von c-myc und beta-catenin bedingt, welche zu einer eingeschränkten Wirkung von EGF (epidermal growth factor) führen [46]. Auch die Wiederherstellung der epidermalen Schutzbarriere ist im Vergleich zu Gesunden verlangsamt [47]. Ebenso ist die Durchblutung multifaktoriell eingeschränkt. Bedingt durch endotheliale Veränderungen der Arterien zeigen Diabetiker einen erniedrigten transkutanen Sauerstoffpartialdruck (TcPo₂) [48]. Der TcPo₂ wird als messbarer Parameter für Perfusion eingesetzt. Im Kapillarbett direkt um die Wunde reduziert eine pathologische VEGF Expression die Neoangiogenese [49]. Ebenso notwendig für die Neoangiogenese sind endotheliale Vorläuferzellen (EPC) aus dem Knochenmark. Bei Diabetikern scheint die Hypoxiebedingte Mobilisierung der EPC aus dem Knochenmark über die NO-Synthase jedoch geschädigt zu sein [50]. Auch eine niedrigere Anzahl an dermalen Nervenzellen bei Diabetikern wird in Verbindung mit verlangsamttem Wundverschluss gebracht [51].

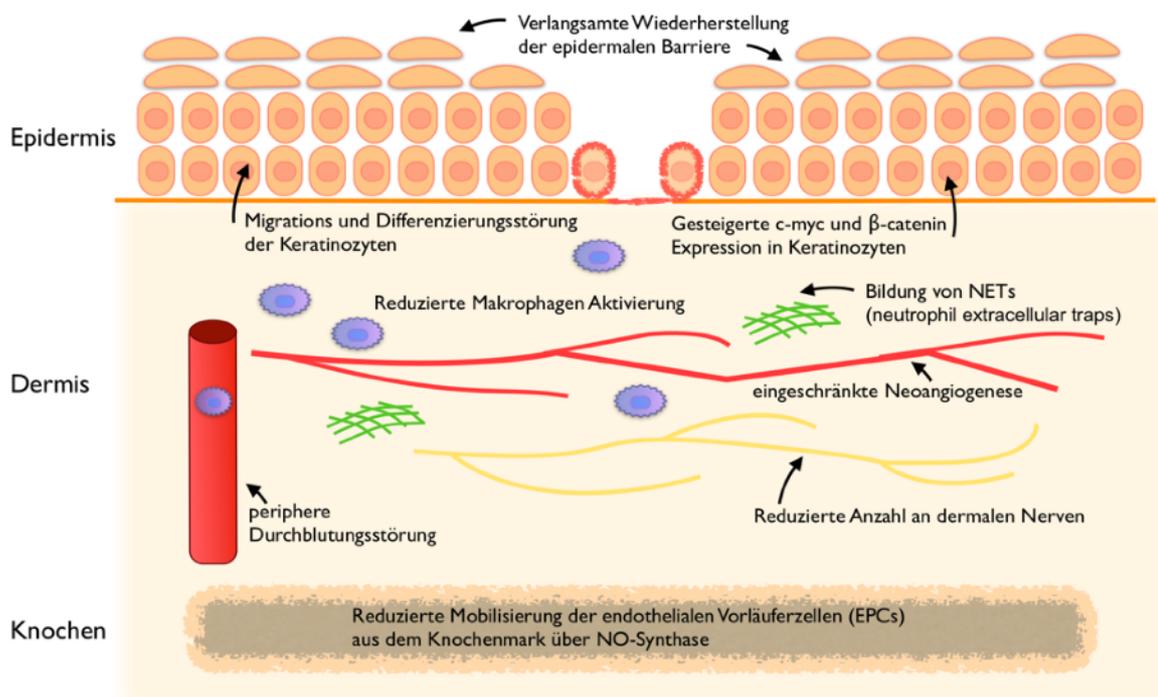


Abbildung 3: Schematische Darstellung einzelner Mechanismen der pathologischen Wundheilung.

1.2. Fragestellung

Typ 2 Diabetes mellitus führt zu einer verzögerten und ineffektiveren Wundheilung, gleichzeitig bewirkt die Krankheit komplexe Veränderung im Immunsystem durch Regulierung verschiedenster Prozesse. Ist es möglich, dass durch die Reduktion eines einzelnen Zytokins die Wundheilung im Vergleich zu Gesunden merklich beeinträchtigt wird? Und ist es in der Schlussfolgerung möglich durch Erhöhung dieses Zytokins durch direkte Applikation auf eine Wunde eine Verbesserung der Wundheilung zu erreichen?

1.3. Arbeitshypothese

Grundlage dieser Arbeit ist die Hypothese, dass bei sowohl Typ 2 Diabetikern als auch bei Prädiabetikern ein verändertes Zytokinprofil im peripheren Blut vorliegt und dieses veränderte Zytokinprofil zu einer eingeschränkten Wundheilung beiträgt.

In dieser Arbeit wird der Fokus auf den erniedrigten Serumspiegel des Zytokins MCP-2 gelegt. Postuliert wird, dass diese erniedrigte MCP-2 Konzentration zu einer reduzierten chemotaktischen Migration von Monozyten in den Wundbereich führt. Dieser Mangel an für die Wundheilung essenziellen Zellen führt letzten Endes zur gestörten Wundheilung.

Im Folgenden sollen die zellulären *in-vitro* Grundlagen untersucht werden auf denen diese Hypothese aufbaut.

2. Materialien

2.1. Chemikalien

Name	Hersteller (Land)
BSA	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
PBS	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Agarose Standard	Carl Roth GmbH (Deutschland)
peqGOLD TriFast TM	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Deutschland)
Chloroform	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
250 mM Luminol Stock Solution	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
90 mM p-Coumaric Acid Stock Solution	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
H ₂ O ₂ Lösung	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Calcein AM Stocklösung	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Trypsin-EDTA Solution 10X	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
DEPC H ₂ O	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
TGF-β1	PeptoTech (USA)
Trypsin/EDTA	Thermo Fischer Scientific (USA)
ddH ₂ O	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
CCL8 Primer	Thermo Fischer Scientific (USA)
PeqGOLD Kapa PCR Master Mix	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Deutschland)
pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker, 23	Thermo Fischer Scientific (USA)
Insulin	Klinikumsapotheke UKT (Deutschland)

2.2. Nährmedien

RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium	Sigma-Aldrich Corporation (USA)

2.3. Puffer

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Corporation (USA)
100 mM Tris	Carl Roth GmbH (Deutschland)
TRIS-Borat-EDTA-Puffer	Sigma-Aldrich Corporation (USA)

2.4. Kits

RayBio® C-Series Human Cytokine Antibody Array C1(2) Kit	RayBiotech Inc. (USA)
Human MCP-2 Mini ABTS ELISA Development Kit	PeptoTech (USA)
Human MCP-1 Mini ABTS ELISA Development Kit	PeptoTech (USA)
CytoSelect™ 24-Well Cell Migration Assay mit 5 µm Porengröße	Cell Biolabs Inc. (USA)
cDNA Synthesis Kit	Thermo Fischer Scientific (USA)

2.5. Geräte

FLUOstar Omega	BMG Labtech (Deutschland)
Lichtmikroskop EVOS®FL	AMG (USA)
Bio-Rad PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH (Deutschland)
Veriti® 96-Well Thermal Cycler	Thermo Fischer Scientific (USA)
Improved Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Deutschland)
ChemoCam Imager 3.2	INTAS Science Imaging Instruments GmbH (Deutschland)
Kern Analytical Balance Waage	KERN & Sohn GmbH (Deutschland)
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Fischer Scientific (USA)

2.6. Software

Image J	U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (USA)
GraphPad Prism Version 5.0 for Mac OS X	GraphPad Software, San Diego California (USA)
ChemoStar Imager Software	INTAS Science Imaging Instruments GmbH (Deutschland)

2.7. Humanes Material

Seren für Zytokinarray und ELISA

- unbehandelte Diabetiker & Insulinglukosetoleranzgestörte

Die Patientenseren wurden uns freundlicherweise von Dr. Stefan Pscherer, Abteilung für Diabetologie am Klinikum Traunstein sowie Prof. Dr. Thomas Forst, Profil Institut für Stoffwechselforschung GmbH in Mainz zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen einer diabetischen Sprechstunde wurden Freiwillige über die Verwendung Ihres Blutes zu medizinischen Forschungszwecken gemäß den Vorschriften der Ethikkommission des Klinikums Traunstein aufgeklärt.

Es wurden 9 ml Blut aus einer peripheren Vene in ein Serumröhrchen entnommen, für 10 min bei 1000 g zentrifugiert und mehrere Aliquote des Überstandes umgehend bei - 80°C eingefroren.

Alle Patienten kamen mit dem Ziel der Abklärung eines gegebenenfalls vorliegenden Diabetes mellitus vom Typ 2 (T2DM) bei bestehendem Risikoprofil in die Sprechstunde.

Zum Zeitpunkt der Blutabnahme lag bei keinem der Patienten ein bekannter T2DM vor. Es waren keine Krankheiten wie Leberzirrhose diagnostiziert die sich stark auf die Zytokinmenge auswirken können und sie zeigten klinisch keine Anzeichen eines akut bestehenden entzündlichen Krankheitsprozesses. Ein oraler Glukosetoleranz-Test (oGTT) wurde gemäß der von der Deutschen Diabetes Gesellschaft empfohlenen WHO-Richtlinien durchgeführt [52].

Nach der Blutentnahme wurden der Nüchternglukosewert in mg/dl sowie der Insulinspiegel in mg/dl im Plasma bestimmt. Alle Patienten erhielten das 75 g Glukosewasser. Nach 120 Minuten wurde erneut Blut zur Plasmaglukosebestimmung abgenommen.

Die Proben wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Neu diagnostizierte Typ II Diabetiker (T2DM) mit einem pathologischen oGTT-2h-Wert von > 200 mg/dl und Insulinglukosetoleranzgestörte (IGT) mit oGTT-2h-Werten von 140 bis 200 mg/dl.

Durchführung des 75 g oGTT oralen Glukosetoleranztests nach WHO-Richtlinien

Testdurchführung am Morgen:

1. nach 10-16 Stunden Nahrungs- und Alkoholkarenz
2. nach einer > 3-tägigen kohlenhydratreichen Ernährung (> 150 g KH pro Tag)
3. im Sitzen oder Liegen (keine Muskelanstrengung); nicht rauchen vor oder während des Tests

Zum Zeitpunkt 0 Trinken von 75 g Glukose in 250-300 ml Wasser innerhalb von 5 min

1. Blutentnahme zu den Zeitpunkten 0 und 120 min
2. sachgerechte Probenaufbewahrung und -verarbeitung

Test kontraindiziert bei interkurrenten Erkrankungen, bei Z.n. Magen-Darm-Resektion oder gastrointestinalen Erkrankungen mit veränderter Resorption oder wenn bereits ein Diabetes mellitus festgestellt wurde

Tabelle 2: Durchführung des 75 g OGTT nach WHO Richtlinien

Die IGT-Gruppe bildet die Risikogruppe der Prädiabetiker (Tabelle 1, Seite 12), von denen ohne Intervention 5-10 % pro Jahr in einen manifesten T2DM übergehen.

Als Kontrollgruppe wurden Seren von übergewichtigen gesunden Freiwilligen gewählt. Diese wiesen keine chronischen Krankheiten auf, zeigten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Hinweise auf einen akuten Krankheitsprozess und hatten einen oGTT-2h-Wert von < 140 mg/dl.

	Kontrolle	IGT	T2DM
Spenderanzahl (N)	15	8	8
Geschlecht (m/w)	6/9	5/3	3/5
Alter (Jahre)	36,7 ± 16,4	59 ± 16	64,5 ± 9,3
BMI (kg/m²)	40,6 ± 8,2	45,1 ± 12,8	35,2 ± 9,4
Nüchternblutzucker (mg/dl)	94,9 ± 9,9	122,1 ± 14,8	148,5 ± 20,6
oGTT-2h-Wert (mg/dl)	109,5 ± 17	167,3 ± 20	220,3 ± 25,6

Tabelle 2: Demographische Daten der Kontrollgruppe, IGT-Gruppe und T2DM-Gruppe

Probeseren für ELISA - Diabetiker unter antidiabetischer Therapie

Die 80 Patientenseren wurden uns freundlicherweise von Dr. Forst zur Verfügung gestellt.

Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen einer Studie zur Untersuchung von Proinsulinspiegeln in T2DM Patienten unter Therapie mit oralen Antidiabetika [53].

Einschlusskriterien für das Patientenkollektiv waren ein Alter zwischen 40-75 Jahren und ein BMI von 20-35 kg/m² sowie das Fehlen von schwerwiegenden chronischen Krankheiten oder mikro- und makrovaskulären Erkrankungen. Für die T2DM Gruppe musste der Diabetes Typ II vor 3-12 Jahren diagnostiziert sein und ein HbA1c von $\leq 7.5\%$ vorliegen. Eine orale antidiabetische Therapie von entweder Metformin (MET) + Insulin Glargin/Lantus (LAN), MET + Sulfonylharnstoff (SU) oder MET + DPP-4-Inhibitor (DPP4) über 6-12 Monate war Voraussetzung. Durch die unterschiedlichen Therapieansätze ergaben sich drei Untergruppen aus jeweils 11-16 Patienten; MET+LAN, MET+SU und MET+DPP4. Für die Kontrollgruppe, bestehend aus 20 Patienten, musste ein Nüchternblutzucker von ≤ 100 mg/dl sowie ein nicht-pathologischer OGTT-2h-Wert vorliegen.

Die Studie erfolgte nach positivem Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz und nach Aufklärung der Patienten.

Es wurden der Nüchternglukosewert in mg/dl sowie der Insulinspiegel in mg/dl im Plasma bestimmt und das Blutplasma direkt für weitere Verwendungszwecke bei -80°C eingefroren.

	Kontrolle	SU+MET	LAN+MET	DPP4+MET
Spenderanzahl (N)	20	16	11	16
Geschlecht (m/f)	12/8	10/6	9/3	9/7
Alter (Jahre)	65,1 \pm 6	64,7 \pm 6,7	66,3 \pm 6,6	63 \pm 8,5
BMI (kg/m ²)	27,1 \pm 3,5	31,6 \pm 2,9	30,8 \pm 2,9	30,9 \pm 3
Nüchternblutzucker (mg/dl)	98,1 \pm 8,2	142,3 \pm 18,7	140,3 \pm 28,7	139,8 \pm 29,5

Tabelle 3: Demographische Daten der Kontrollgruppe, SU+MET, LAN+MET und DPP4+MET

2.8. Zellkulturen

Die Kultivierung aller Zellkulturen erfolgte in 75 ml Zellkulturflaschen im Inkubationsschrank bei 37°C in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre, welche 5% CO₂ enthielt. Jegliche Arbeit fand unter der Sterilwerkbank mit Laminar-Flow statt um Kontamination zu vermeiden. Jeden dritten bis vierten Tag, spätestens beim Erreichen von 100 prozentiger Konfluenz, wurden die Zellen gesplittet, weiter inkubiert oder für Versuche verwendet.

Um zusätzlich in speziellen Zellreihen hyperglykämie (HG) oder normoglykämie (NG) Bedingungen zu schaffen, wurden diesen Zellreihen zum Nährmedium 2,5 g/l Glukose (HG) oder 2,5 g/l Mannitol (NG) zum Ausgleich der Osmolarität hinzugegeben.

2.8.1. THP1-Zellkulturen

THP1-Zellen sind eine akute monozytäre Leukämiezelllinie, welche 1980 von Tsuchiya et al. [54] aus dem peripheren Blut von einem an Akuter Myeloischer Leukämie Erkranktem etabliert wurde. Die THP-1 Zelllinie ist eine in der Wissenschaft etablierte Modellzelllinie um die Regulation und Funktion von Makrophagen und Monozyten im kardiovaskulären System zu untersuchen [55].

Wir erhielten unsere THP-1 Zellen von der Firma Sigma-Aldrich (88081201 SIGMA) und kultivierten sie in RPMI 1640 Medium (Sigma #11875-085) + 1% P/S (Penicillin/Streptomycin) + 10% FCS (fetal calf serum).

2.8.2. HaCaT - Keratinozyten - Zellkultur

Die HaCaT- Zelllinie, eine *in-vitro* spontan transformierte immortalisierte humane Keratinozytenlinie, wurde in den 80er Jahren am Deutschen Krebsforschungszentrum DKFZ in Heidelberg etabliert und findet aufgrund seiner Immortalität, sowie seiner biochemisch ähnlichen Eigenschaften zu humanen Keratinozyten, vielfältigen und breiten Einsatz in der Wissenschaft [56].

Die HaCaT-Zelllinie erhielten wir direkt über den Technologietransfer des DKFZ aus Heidelberg.

Die HaCaT- Zelllinie wurde in DMEM-Medium mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert. Die Zellen wachsen adhärent auf dem Boden der Kulturflasche, daher war beim Splitten zuerst eine Lösung der Zellen vom Untergrund notwendig.

Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen mit 3-5 ml PBS gewaschen um die nicht-adhärennten toten Zellen sowie überschüssiges FCS, welches Trypsin inhibiert, zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA für 7-8 min bei 37°C behandelt. Trypsin als Endopeptidase bewirkt die Hydrolyse der Peptidbindungen und damit die Lösung der Zellen. Es wirkt allerdings auch zytotoxisch und sollte daher maximal 10 min auf die Zellen einwirken. EDTA erreicht die Zell-Zell Lösung über Komplexbildung mit Magnesium und Kalzium.

Durch Klopfen gegen den Flaschenrand lösten sich die HaCaT Zellen vom Boden ab. Unter dem Lichtmikroskop wurde bei 10-facher Vergrößerung überprüft ob sich die Zellen frei bewegen. 25 ml des Kulturmediums DMEM wurden zu den Zellen hinzugegeben. Durch mehrfache Agitation in der Pipette wurde eine Durchmischung erreicht und der Inhalt in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Durch das im DMEM Kulturmedium befindliche FCS wird das Trypsin inaktiviert.

Nach dem Zentrifugieren von 10 min bei 600 g wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 20 ml Kulturmedium re-suspendiert. Die neue Zellpassage wurde am Ende in eine neue sterile Kulturflasche übergeführt.

2.8.3. Fibroblasten aus Spenderhaut

Fibroblasten wurden aus Resten humaner Spalthaut von Patienten der BG Unfallklinik Tübingen isoliert. Die Ethikkommission der Universitätsklinik Tübingen gab dem Antrag Nummer 333/2013BO2 am 25.Juli 2013 statt. Gemäß den Ethikrichtlinien wurde über die Probeentnahme sowie den Verwendungszweck der Probe aufgeklärt. Epidermis und Dermis wurden mit einem Skalpell voneinander getrennt. Zur Isolation der Fibroblasten wurde die Dermis in kleine ca. 1 mm² Stücke zerkleinert und mehrmals mit DPBS gewaschen um letzte Blutreste zu entfernen. Die Dermisstücke wurden eine Stunde lang bei 37°C in 0,2 % Kollagenase II Lösung in PBS inkubiert.

Durch Sieben wurden die Dermisstücke isoliert, anschließend zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in DMEM Medium kultiviert.

Kultivierung und Splitting erfolgten nach dem gleichen Schema wie die HaCaT-Zellkultivierung. Trypsin wurde jedoch in der reduzierten Menge von 1,5 ml hinzugegeben und wirkte für 4-5 Minuten ein, da die Adhärenz der Fibroblasten an den Flaschenboden im Vergleich zu HaCaT Zellen weniger stark ausgeprägt ist.

3. Methoden

3.1 Semi-quantitatives Zytokinarray

3.1.1. Prinzip des Zytokinarray

Gegen spezifische Zytokine gerichtete Antikörper sind an eine Nitrozellulose-Membran gebunden. Bei Zugabe der zu untersuchenden Proben binden die jeweiligen Zytokine, soweit sie vorhanden sind, im Antigen-Antikörper-Prinzip. Nach erfolgter Bindung lässt man zusätzlich eine Detektionslösung an die Zytokin-Zytokin-Antikörper-Komplexe binden. Mittels Chemilumineszenz kann danach vergleichend aufgezeigt werden an welche Antikörper mehr und an welche weniger Zytokine gebunden wurden. Dieses Sandwich-Prinzip wird in Abbildung 4 dargestellt [57].

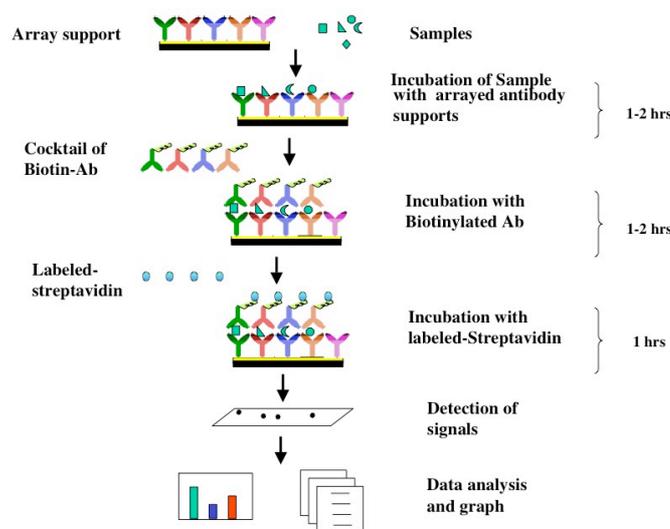


Abbildung 4: Prinzip des Zytokinarray RayBio® Human Cytokine Antibody Array Protocol

3.1.2. Durchführung des humanen Zytokinarray

Für die Zytokinbestimmung wird das RayBio® *C-Series Human Cytokine Antibody Array C1 Kit* der Firma RayBiotech Inc. verwendet. Die in diesem Array untersuchten Proteine sind GCSF, GM-CSF, GRO, GRO- α , IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IFN- γ , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MIG, RANTES, TGF- β 1, TNF- α sowie TNF- β .

Der Versuch wird bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt und soweit nicht anders angegeben findet die Inkubation der Platten ebenfalls unter RT und unter leichter Wipp-Bewegung auf einem Kippschüttler statt.

A) Blockierung und Inkubation des Arrays

In jede Kammer der 8-Kammer Platten wird eine Array Membran gelegt. Dann wird die Arrayplatte mit 2 ml Blockpuffer pro Kammer für 30 min geblockt. Anschließend wird jeweils 1 ml der ausgewählten Probeseren in Blockpuffer, im Verhältnis 1:20 (950 μ l Blockpuffer/50 μ l Serum) hinzu pipettiert und die Platte erneut für 2 Stunden inkubiert, gefolgt von fünf Waschgängen von jeweils 5 Minuten mit Waschpuffer aus dem Kit.

B) Zugabe des Biotin-konjugierten Antikörpers

1 ml des vorgefertigten Biotin-konjugierten Antikörper Cocktails werden mit 100 μ l Blockpuffer verdünnt. Nach leichtem Durchmischen wird diese Lösung in ein weiteres Eppendorfgefäß mit 2 ml Blockpuffer gegeben. Von der verdünnten Biotin-konjugierten Antigen-Lösung gibt man jeweils 1 ml auf jede Membran des Arrays und inkubiert über Nacht bei 4°C.

C) Zugabe des HRP-konjugierten Streptavidin

Es erfolgen erneut 5 Waschgänge mit Waschpuffer für jeweils 5 min. Dann wird 2 ml des 1000-fach verdünnten HRP-konjugiertem Streptavidin auf jede Membran hinzu pipettiert, die Platte für 2 h inkubiert und erneut fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen.

D) Detektion

Durch vorsichtiges Halten mit einer Pinzette wird die überständige Waschlösung von den Membranen durch Abtropfen entfernt. Diese wird anschließend auf eine dünne

durchsichtige Kunststoffplatte gelegt. Jeweils 250 µl der Detektionslösung C und D pro Membran werden gemischt, auf die Membranen gegeben und für 2 min inkubiert. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass alle Membranen komplett von der Detektionslösung bedeckt sind und sich keine Luftblasen bilden. Die Detektionslösung lässt man langsam abtropfen. Über das Chemilumineszenz-System ChemoCam Imager (Intas) werden die Membranen unterschiedlichen Belichtungszeiten von 5 Sekunden, 10 Sekunden, 15 Sekunden, 20 Sekunden, 30 Sekunden und 60 Sekunden ausgesetzt und die absolute Signalintensitäten gemessen.

Die über Chemilumineszenz gemessenen absoluten Signalintensitäten der einzelnen Zytokine (ASZ) werden ins Verhältnis zur absoluten Signalintensität der Positivkontrolle (ASP) gesetzt und somit die relative Signalintensität der einzelnen Zytokine (RI) bestimmt. $RI = ASZ/ASP \cdot 100$

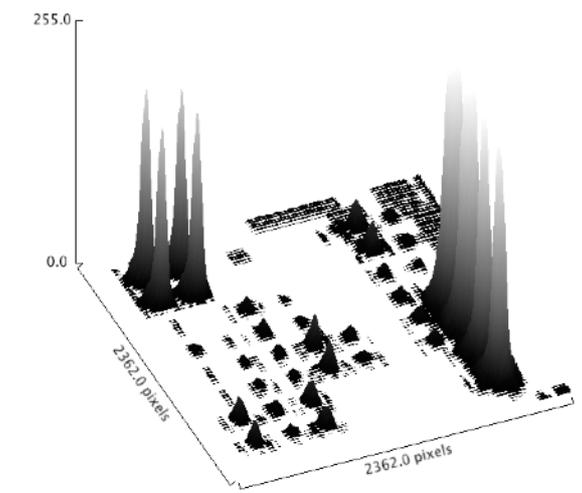


Abbildung 5: Beispielhaftes Ergebnis der Chemilumineszenz Messung auf einer Nitrozellulosemembran mittels ChemoCam Imager. Dargestellt ist die Probe eines T2DM Patienten bei Belichtungszeit 15 sec. Insgesamt wurde die relative Intensität von 23 Zytokinen und einer Positivkontrolle gemessen.

Als nächstes werden die relativen Intensitäten der einzelnen Zytokine zwischen Kontrollgruppe und T2DM/IGT Gruppe verglichen.

3.2. Sandwich ELISA zur Quantifizierung von MCP-1 und MCP-2 Serumkonzentrationen

3.2.1. Prinzip des Sandwich-ELISA Tests

Wie auch der Zytokinarray basiert der Sandwich ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) auf der Antigen-Antikörper Bindung [58]. Die vorgefertigten Testplatten sind mit einem Antikörper beschichtet, der an das vorhandene MCP-2 bzw. MCP-1 in den Proben bindet. Als nächstes wird ein Detektions-Antikörper hinzugegeben. Dieser bindet an eine andere Stelle des MCP-2 bzw. MCP-1 und ist zusätzlich an Biotin gekoppelt. Wie bei Zytokinarray bindet HRP-konjugiertes Streptavidin an das Biotin und kann über Chemilumineszenz gemessen werden.

Die gemessene Lumineszenz ist direkt abhängig von den in der Probe gebundenen Detektions-Antikörpern, deren Vorhandensein wiederum von der Menge an vorhandenen MCP-2/MCP-1 in der Probe bestimmt wird. Folglich lässt sich von der gemessenen Lumineszenz auf die MCP-2/MCP-1 Konzentration schließen. Lässt man parallel einen Standard testen, so kann anhand dessen eine Eichkurve der Lumineszenz erstellt werden. Diese ermöglicht die quantitative Antigen Bestimmung der Proben.

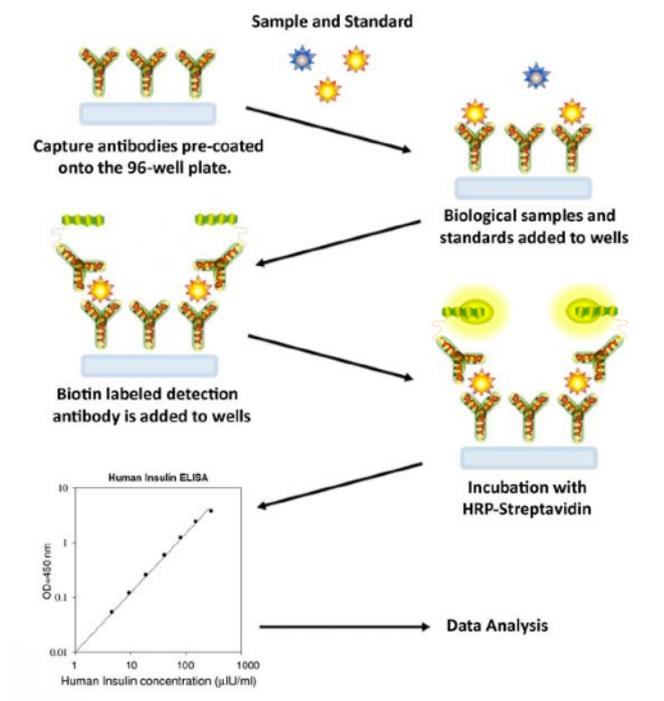


Abbildung 6: Prinzip des Sandwich ELISA [57]

3.2.2. Durchführung des ELISA

Verwendet werden die Sets Human MCP-2 Mini ABTS ELISA und Human MCP-1 Mini ABTS ELISA von PeproTech. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerprotokoll.

A) Bedecken der Platten

Der Capture-Antikörper wird in PBS-Puffer auf 0,25 µg/ml verdünnt. Auf die 96-Kammer-Mikrotiterplatten wird pro Kammer 50 µl der Antikörper-Lösung gegeben. Die Platten werden über Nacht bei RT unter Bewegung auf dem Kipptisch inkubiert.

B) Blocken der Platten

Es folgen vier 1 Minuten Waschgänge mit jeweils 250 µl Waschlösung bestehend aus 0,05% Tween-20 in PBS. Um das Hintergrundsignal zu reduzieren werden freie Protein-bindungsstellen mit Blocklösung belegt. Als Blocklösung wird Bovine Serum Albumin (BSA) verwendet, welches auf 1% in PBS verdünnt wird. 150 µl dieser BSA/PBS Blocklösung werden pro Kammer hinzugegeben, für 1 Stunde inkubiert und die gesamten Platten erneut 4 Mal gewaschen.

C) Inkubation der Platten

Die Inkubation der Platten findet pro Probe immer in doppelter Ausführung statt um Auswirkungen eventueller Pipettierfehler oder anderer Störfaktoren zu minimieren.

Die Standardlösung in der MCP-2 bzw. MCP-1 Konzentration von 2 µg/ml wird auf eine Konzentration von 500 pg/ml mit PBS + 0,1% BSA + 0,05% Tween-20 verdünnt. Von 500 pg/ml wird dann eine serielle Verdünnungsreihe mit 5 Verdünnungsstufen hergestellt wobei die Menge 50 µl pro Kammer beträgt.

Von den Seren der Versuchs- und Kontrollgruppe werden jeweils 4 µl Serum zu 200 µl PBS + 0,1% BSA + 0,05% Tween-20 hinzugegeben und gemischt. Von dieser Lösung werden 50 µl in jede Kammer pipettiert. Somit befindet sich 1 µl Serum in jeder Kammer. Dieser Zwischenschritt wird aufgrund der Ungenauigkeit beim Pipettieren bei der geringen Menge von 1 µl benötigt.

Nach Zugabe von Proben und Standard werden die Platten für 2 Stunden inkubiert und erneut 4 Mal gewaschen.

D) Biotinylierter Detektions-Antikörper

Der Detektions-Antikörper wird auf 0,5 µg/ml in PBS+0,1%BSA verdünnt und pro Kammer 50 µl hinzugegeben. Nach 2 Stunden Inkubation folgen 4 weitere Waschgänge mit Waschpuffer.

E) Avidin-Horseradish Peroxidase (Av-HRP)

Av-HRP bindet als Substrat mit hoher Affinität an das Biotin des Detektionsantikörpers.

Av-HRP wird in PBS + 0,1%BSA auf eine Konzentration von 2,5 µl/ml verdünnt, 50 µl in jede Kammer pipettiert, 30 min inkubiert und vier Mal gewaschen.

F) Detektion

Die Chemilumineszenz-Detektionslösung wird aus 2,5 ml der unten genannten Lösung A und 2,5 ml der Lösung B hergestellt und 100 µl zur Detektion hinzugegeben.

Lösung A: 7,5 ml 100mM Tris + 75 µl 250mM Luminol Stock Solution (Sigma #A-8511) + 33 µl 90mM p-Coumaric Acid Stock Solution (Sigma #C-9008)

Lösung B: 7,5 ml 100mM Tris + 15 µl 30%-ige H₂O₂ Lösung (Sigma #H-0904)

Die Lumineszenzmessung muss direkt nach Zugabe der Lösung erfolgen. Die Messung erfolgt mit dem Multifunktions-Mikroplatten-Reader FLUOstar Omega (BMG Labtech). Die Standardkurven werden über die Verdünnungsreihen bestimmt.

Die Auswertung der Messpunkte erfolgt mittels GraphPad Prism Software.

3.3. Chemotaxis Assay mit THP-1 Zellen

3.3.1. Prinzip des Chemotaxis Assay

Das Chemotaxis Assay misst die Wanderung einer Zellpopulation, ausgelöst durch einen chemotaktischen Reiz durch eine semipermeable Membran mit einer definierten Porengröße [59]. Es wird daher auch als Migrations Assay bezeichnet. Zur Durchführung werden spezielle 2-Kammer Systeme benutzt. Abbildung 8 zeigt schematisch den Aufbau einer solchen Boyden Kammer. Die untere Kammer enthält das chemotaktisch wirkende Protein. In der oberen Kammer befinden sich die zu untersuchenden Zellen in Nährmedium. Diese Zellen wandern durch den chemotaktischen Reiz bedingt durch die semipermeable Membran, welche beide Kammern voneinander trennt. Nach einer bestimmten Zeit wird die Anzahl an lebenden Zellen welche in die untere Kammer migriert sind per Fluoreszenz gemessen. Die Porengröße wird so gewählt, dass Zellen nur aktiv von der oberen in die untere Kammer wandern können und eine passive Passage nicht möglich ist.

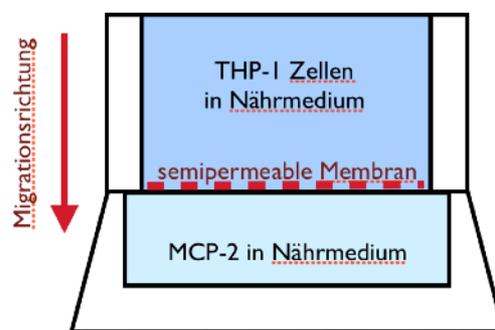


Abbildung 8: Prinzip der Boyden Kammer wie sie im Chemotaxis Assay benutzt worden ist.

3.3.2. Durchführung

15 ml der THP-1 HG und NG Zellreihe werden zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zur Auszählung der Zellen werden jeweils 30 µl Zelllösung mit 30 µl Trypitanblau gemischt und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Sowohl die NG Gruppe als auch die HG Gruppe weisen eine Zellzahl von $1,7 \times 10^5$ Zellen/ml auf. 4 ml der beiden Zellüberstände werden in jeweils 4 ml Nährmedium überführt und 2 µl Calcein AM Stocklösung hinzugegeben. Die Ansätze werden 30 min bei 37°C inkubiert. Das Calcein lässt lebende Zellen grün fluoreszieren indem es durch Esterasen der Zellen gespalten wird.

Als nächstes werden 24-Kammer Platten vorbereitet. Benutzt wird das CytoSelect™ 24-Well Cell Migration Assay mit 5 µm Porengröße.

MCP-2 Stock wird zu drei Ansätzen RPMI 1640 Medium in den Konzentrationen 0, 5 & 50 ng/ml hinzugefügt. Die unteren Teile der Assayplatten werden wie in Abbildung 9 dargestellt mit den drei verschiedenen Ansätzen bestückt, wobei das Füllungsvolumen pro Kammer 500 µl beträgt. Die Kammern der oberen Platte werden ebenfalls wie in Abbildung 8 dargestellt zur einen Hälfte mit THP-1 Zellen in normoglykämischen Nährmedium und zur anderen mit THP-1 Zellen in hyperglykämischen Nährmedium zu jeweils 100 µl gefüllt.

Die Fluoreszenz der oberen und unteren Kammer wird nach 0, 5, 10, 20, 30 und 120 min gemessen.

NG THP-1 Zellen			HG THP-1 Zellen		
0	5	50	0	5	50
0	5	50	0	5	50
0	5	50	0	5	50
0	5	50	0	5	50

Konzentration MCP-2 in ng/ml

Abbildung 9: Belegung der 24-Kammer Platten für Chemotaxis Assay

3.4. In Vitro Scratch Assay von HaCaT-Keratinocyten und Spender-Fibroblasten

3.4.1. Prinzip des Scratch Assay

Durchgeführt wird das Scratch Assay nach dem Protokoll von Liang et Al. aus dem Jahr 2007 [60].

Um zu prüfen welche Auswirkung die Anwesenheit von sekretierten Chemokinen aus Monozyten (THP1 Zelllinie) auf Keratinozyten und Fibroblasten hat und ob diese Anwesenheit sich gegebenenfalls in einer schnelleren oberflächlichen Wundheilung äußern könnte, wird ein Scratch Assay durchgeführt. Hierbei wird eine oberflächliche Hautwunde imitiert indem in einer konfluenten Zellkultur mittels Pipettenspitze der Zellverband mittig komplett durchtrennt wird. Danach wird gemessen wie viel Prozent der initialen "Wundfläche" in einem bestimmten Zeitraum mit oder ohne Anwesenheit von THP-1-Zell-Sekretom verschlossen wird.

Der Begriff Sekretom, im Jahr 2000 von H. Tjalsma et al. eingeführt, bezeichnet die Gesamtheit aller löslichen Proteine, einschließlich der am Sekretionsprozess beteiligten Proteine, die eine Zelle in den Extrazellulärraum sezerniert [61].

3.4.2. Durchführung

Für das Scratch Assay werden jeweils 20 ml des Zellüberstandes der THP-1 Zelllinien entnommen und zentrifugiert um sicher zu stellen, dass nur das Sekretom nicht aber die THP-1 Zellen selber verwendet werden.

Auf 48-Loch-Titerplatten werden jeweils 100 µl HaCaT-Zellen in NG und HG Nährmedium und 100 µl Fibroblasten in NG und HG Nährmedium pipettiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Morgen unter dem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung auf mögliche Kontamination und adäquates konfluentes Zellwachstum untersucht.

Unter Verwendung einer Pipettenspitze (200 µl) wird mittig ein Kratzer gesetzt um den Zellverband am Boden der Titerplatte linear zu trennen. Die Platte wird

anschließend mit je 500 µl PBS pro Loch gewaschen um die beim Scratchvorgang abgelösten Zellreste zu entfernen.

Direkt im Anschluss werden die gesetzten Kratzer unter einem digitalen Lichtmikroskop (EVOS®FL von AMG) bei 20-facher Vergrößerung, unter Benutzung eines Diffuser (AMEP-DFS1) fotografiert. Es wird geschaut, dass die entstandenen Abstände in jedem Scratch vergleichbar sind und die Größen der zellfreien Flächen, die Gap, werden unter Anwendung von ImageJ [62] berechnet.

Zur weiteren Inkubation werden der Hälfte der Zellkulturen 50µl des THP-1 Sekretoms hinzugegeben.

Bei HaCaT- Zellen wird nach 20 Stunden ein erneutes Bild des Scratches gemacht und die Fläche des noch vorhandenen Gaps erneut berechnet. Bei Fibroblasten erfolgt die erneute Messung erst nach 30 Stunden, da nach 20 Stunden der Gap noch nicht weit genug verschlossen ist um eine klare Grenze zwischen zellreicher und zellfreier Fläche zu ziehen.

Über die ImageJ Software wird berechnet wie viel Prozent der ursprünglich freien Fläche jetzt von Zellen bedeckt ist (gap closure in %). Abbildung 9. zeigt wie über ImageJ die Spaltgröße bestimmt worden ist.

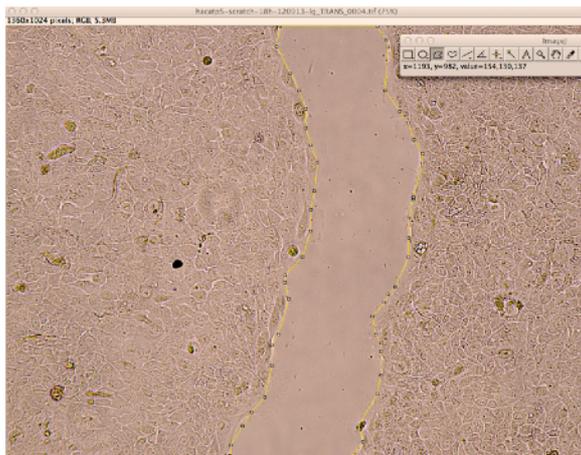


Abbildung 10: Auswertung der Scratch-Assay Bilder über die Freeware Image J. Der Rand der Zellen wird markiert und die zellfreie Fläche bestimmt.

3.5. Quantitative Polymerasekettenreaktion und Agarose Gelelektrophorese

Die PCR dient zu *in vitro* Synthese der DNA mithilfe von spezifischen Enzymen. Das Verfahren wurde 1985 von Kary B. Mullis entwickelt [63] und 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet [64]. Anhand der PCR soll die MCP-2 Genexpression in HaCaT-Zellen unter variierenden Bedingungen gemessen werden. Untersucht werden 4 Zellreihen in normoglykämien Medium (NG), in hyperglykämien Medium (HG), unter Zugabe von 5 ng/ml Humaninsulin und unter Zugabe von 5 ng/ml humanem rekombinanten TGF- β 1.

In der gemeinsamen Arbeitsgruppe des Siegfried-Weller-Instituts konnten wir gesteigerte TGF- β Serumspiegel als möglichen Faktor für schlechtere Mineralisierung und Knochen-Matrix-Heilung bei Typ II Diabetikern ausmachen [65].

3.5.1. Herstellung des 1,5% Agarose- Gels für Gelelektrophorese

1,5 g Agarose werden mit 100 ml einfach konzentriertem TRIS-Borat-EDTA-Puffer (1xTBE) für 2 min bei 700 W in der Mikrowelle erhitzt, 7 μ l Ethidiumbromid hinzu gegeben und für 20 min im Gelschlitten ausgehärtet.

3.5.2. Verwendete Primer

Primer	Sequenz forward und reverse
GAPDH	f: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3'
	r: 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'
CCL8	f: 5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'
	r: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
CCL2	f: 5'-AGAATCACCAGCAGCAAGTGTCC-3'
	r: 5'-TCCTGAACCCACTTCTGCTTGG-3'

Tabelle 4: Für PCR verwendete Primer mit Sequenzen

3.5.3. RNA Isolation und Integritätscheck

RNA-Isolation aus HaCaT Zellen und Spenderfibroblasten

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den verschiedenen Kulturansätzen der HaCaT Zellen und Spenderfibroblasten erfolgt nach dem SOP #59A des Siegfried Weller Forschungsintitutes basierend auf dem Protokoll der Firma PEQLAB [66] mittels des gebrauchsfertigen Reagenz peqGOLD TriFast. Hierbei wird RNA mittels Phenol, Guanidinisothiocyanat und Chloroform extrahiert.

Zur Vorbereitung des Zellmaterials aus der Kultur wird das Kulturmedium aspiriert, einmal mit PBS gewaschen und jeweils 500 µl perGOLDTriFast Reagenz in jede 25 cm² Kulturflasche gegeben. Mithilfe eines Schabers wird der Zellrasen vom Plastik entfernt, in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß übergeführt und 5 min bei RT inkubiert.

Nach der Zugabe von 100 µl Chloroform und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 14 000 g und 4°C trennt sich die Zellsuspension in drei Phasen auf.

RNA befindet sich hierbei in der oberen wässrigen Phase, während DNA sowohl in der mittleren Interphase als auch der unteren organischen Phase enthalten sind. Proteine finden sich nur in der organischen Phase. Durch vorsichtiges Pipettieren wird die RNA-enhaltende obere Phase abgenommen und in ein weiteres Eppendorfgefäß übergeführt, das 500 µl Isopropanol enthält. Um die Fällung der RNA zu fördern werden die Gefäße für 4 Stunden bei -20°C gekühlt und anschließend langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zentrifugation über 10 min bei 14 000 g werden die RNA Pellets mit jeweils 1ml 70% Ethanol gewaschen, der Überstand erneut dekantiert und ein weiteres Mal für 10 min bei 14 000 g zentrifugiert.

Dieser Schritt wird zwei Mal wiederholt um verbliebene kontaminierende Salze herauszulösen. Die Pellets werden für 10 Minuten an der Luft getrocknet um mögliche Ethanolreste verdampfen zu lassen. Danach werden sie in 30 µl nukleasefreiem Wasser (DEPC H₂O) resuspendiert.

Anschließend werden alle isolierten RNA-Proben unter Verwendung des Omega® Spektralphotometer photometrisch quantifiziert. Hierbei gilt der Quotient der Absorption bei 260 nm (Nukleinsäuren) zur Absorption bei 280 nm (Proteine) als Maß für die Reinheit (purity) der RNA Proben. Liegt ein Verhältnis für 260 nm:280 nm von 2 zu 1 vor so ist von einer komplett reinen RNA auszugehen.

RNA Integritätscheck mit Agarose Gelelektrophorese

Verunreinigte RNA kann zu Schwierigkeiten bei der cDNA Synthese führen und die Ergebnisse der PCR verändern, daher ist die Feststellung eines gewissen Reinheitsgrades vor weiteren Versuchsschritten unerlässlich [67].

Um sicherzugehen, dass während der RNA-Isolation keine Salze, Proteine oder andere Rückstände in die RNA Proben gelangt sind wird ein Integritätscheck durchgeführt.

Insgesamt werden 14 RNA Proben verwendet: 3 NG, 3 HG, 3 NG+I, 3 HG+I und 2 NG+TGF- β als Positivkontrolle.

In Eppendorf Reagenzgläsern werden die 250 ng der RNA mit ddH₂O auf 10 μ l adjustiert. Die Proben werden mit 4 μ l Loading Buffer (5x) und 1,5 μ l Marker ergänzt. Die Agarose-Gelkammern werden mit jeweils 14 μ l dieser Lösung bestückt. Die Elektrophorese wird bei 100 Volt über 30 min unter Verwendung des Bio-Rad PowerPac 200 durchgeführt. In der Auswertung der Gelelektrophorese sind 2 klare Banden erkennbar, ribosomale RNA 28S und ribosomale RNA 18S. Somit liegt keine relevante Kontamination oder Degradation der RNA vor.

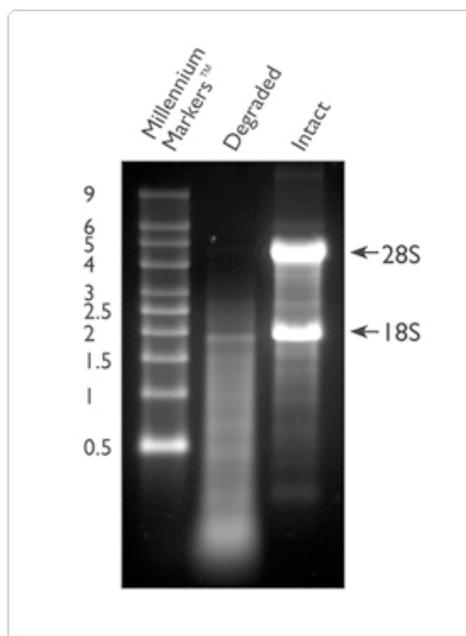


Abbildung 11: Intakte vs. Degradierete RNA. 2 μ g von total degradierter RNA und 2 μ g intakter RNA Ambion's wurden über ein 1,5% Agarose Gel laufen gelassen. Bei der Intakten RNA sind die 18S und 28S Bänder der ribosomalen RNA deutlich sichtbar. Die degradierte DNA zeigt keine eindeutigen Banden und zeigt insgesamt ein kleineres Molekulargewicht auf.

Bildquelle (11.12.2016 um 14:02 Uhr): <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/is-your-rna-intact.html>

3.5.4. PCR Amplifikation mit GAPDH, CCL8 und 2 Primer

cDNA Synthese

Die Synthese von cDNA aus RNA findet durch eine reverse Transkription mithilfe von RNA-abhängigen DNA-Polymerase statt.

Verwendet wird das First Strand cDNA Synthesis Kit von ThermoFisher Scientific nach dessen Protokoll in den nachfolgenden Schritten gearbeitet wird.

Eppendorf Gefäße werden auf Eis gelegt und 2 µl RNA, 1 µl oligo(dT)₁₈ Primer und 8 µl nukleasefreies Wasser hinzugegeben. Die Suspension wird kurz zentrifugiert und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Im nächsten Schritt werden 4 µl 5X Reaktionspuffer, 1µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µl 10 mM dNTP Mix sowie 2 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µL) hinzugegeben. Die Lösung wird kurz zentrifugiert und dann 60 min bei 37°C inkubiert. Die Transkriptionsreaktion wird durch 5-minütiges Erhitzen auf 70°C durch Inaktivierung des Enzyms beendet.

Kontroll PCR Amplifikation mit GAPDH Primer

Um die cDNA Synthese zu verifizieren und c-DNA Konzentrationsunterschiede zwischen den verschiedenen Proben zu ermitteln wird eine interne Kontrolle mittels GAPDH Primern durchgeführt. GAPDH spielt intrazellulär eine Rolle in der Glykolyse und Apoptose [68]. Als konstitutiv exprimiertes Gen wird GAPDH kaum durch äußere Einflüsse in seiner Genexpression verändert und ist damit ein häufig verwendetes sogenanntes „house-keeping gene“. Jedoch konnte gezeigt werden, dass GAPDH, entgegen früherer Annahmen, relevante Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen aufzeigt [69]. Da wir jedoch mit einer einzelnen Zelllinie arbeiten eignet sich GAPDH zur Kontrolle der cDNA Synthese in diesem Versuch [70].

Die cDNA wird auf eine Konzentration von 10 ng/ml in nukleasefreiem Wasser verdünnt und die PCR nach Protokoll durchgeführt.

Amplifikation der cDNA durch PCR mit CCL8 und CCL2 Primer

Zur selektiven Vervielfältigung der CCL8 cDNA Sequenzen wird eine PCR durchgeführt. Um diese Sequenzen zu markieren werden zwei für CCL8 spezifische Oligonukleotide, der forward und der reverse Primer, verwendet, die komplementär an den cDNA Strang binden. Über eine Polymerase wird ausgehend vom Primer eine Zweitstrang-DNA synthetisiert. Diese wiederum dient als neue Matrize für weitere Syntheseschritte.

Durch Primer Optimierung werden im Vorhinein die optimalen Bedingungen bezüglich der Anzahl der Zyklen, der Volumina der Primer und der Reaktions-temperaturen bestimmt.

	Denaturierung I	Denaturierung II	Annealing	Elongation	Zyklen
GAPDH	94°C, 3 min	94°C, 30 sec	56°C, 30 sec	72°C, 45 sec	35
CCL8	94°C, 3 min	94°C, 2 min	58°C, 10 sec	72°C, 3 min	40
CCL2	94°C, 3 min	94°C, 2 min	58°C, 10 sec	72°C, 3 min	37

Tabelle 5: Primer Bedingungen der PCR für GAPDH, CCL8 und CCL2

Zur Vorbereitung wird für jeweils 96 Proben ein Mix aus 20 µl CCL8 forward Primer, 20 µl CCL8 reverse Primer und 200 µl PCR Master Mix hergestellt. Der PeqGOLD Kapa PCR Master Mix (VWR peqlab) enthält alle für die PCR benötigten Substanzen inklusive der Taq DNA Polymerase.

In die Reaktionsgefäße werden zu 8 µl cDNA der jeweiligen 14 Proben, 12 µl des Master Mix hinzugegeben und kurz zentrifugiert. Zusätzlich wird eine Negativ- und eine Positiv-Kontrolle bei der PCR mitgefahren.

Im Thermozykler wird zuerst die Doppelstrangstruktur der DNA durch Denaturierung für 3 min bei 94°C aufgelöst. Als nächstes erfolgt bei 58°C über 10 Sekunden die Hybridisierung der Primer an die Einzelstrang-DNA. Bei 72°C über 3 min wird anschließend der komplementäre Zweitstrang über die Polymerase synthetisiert. Abschließend werden die Proben auf 4°C herabgekühlt.

Um die CCL8-Genexpression mit der CCL2-Genexpression zu vergleichen wird die Amplifikation in gleicher Weise mit CCL2 Primern wiederholt.

Agarose Gelelektrophorese zur Bestimmung der CC8 und CCL2 Genexpression in HaCaT Zellen unter normo- und hyperglykämien Bedingungen

Jeweils 8 µl der 14 Proben amplifizierter cDNA, 8 µl der Negativ- und 8 µl der Positiv-Kontrollen sowie 2 µl des pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23 werden in die Gelkammern pipettiert. Die Elektrophorese wird mit 90 Volt über 45 min durchgeführt.

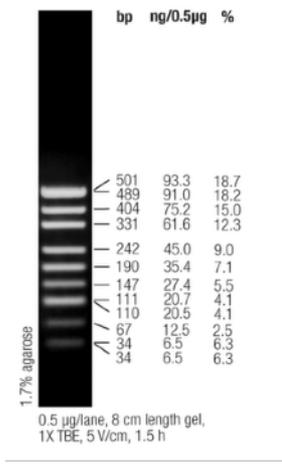


Abbildung 12: ThermoScientific pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23
Bildquelle (11.12.2016 um 14:02 Uhr): <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0223>

Auswertung der Elektrophoresebilder

Über ImageJ werden die relativen Intensitäten (RI) der einzelnen Banden gemessen und ins Verhältnis zur RI der Negativprobe gesetzt.

3.6. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism (Version 5.0b for Mac OS X 2009) der Firma GraphPad Software (San Diego California USA) verwendet.

Als Signifikanztest zweier ungepaarter Merkmale wurde der Student t-Test mit Welch Korrektur angewendet. Eine gaußsche Normalverteilung wurde aufgrund der geringen Probeanzahl nicht angenommen. Das 95%-Konfidenzintervall (KI), die Differenz der Mittel-Werte und der Standardfehler (SEM), sowie der zweiseitige p-Wert werden angegeben um die statistische Signifikanz festzulegen.

Ein p-Wert von $p > 0,05$ wurde als statistisch nicht signifikant gewertet. Ab einem Wert $< 0,05$ wurde ein Ergebnis als signifikant (*), ab einem $p < 0,01$ als sehr signifikant (**) und einem $p < 0.0001$ als hochgradig signifikant (***) angesehen. Diese Grenzwerte sind willkürlich gewählt, in den Biowissenschaften jedoch üblich.

Für das Konfidenzintervall gilt, dass die gemessene Diskrepanz zweier Gruppen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% innerhalb des errechneten Intervalls liegt. Wenn dieses die Null nicht einschließt, gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen [71].

Als Signifikanztest mehrerer ungepaarter Merkmale wurde der one-way ANOVA Kruskal-Wallis-Test angewendet. Als Vergleichstest wurden der Dunn's Multiple Comparison Test verwendet. Zur Ermittlung des exakten p-Wertes sowie des 95%-Konfidenzintervalls wurden jeweils zwei Merkmale im direkten t-Test miteinander verglichen.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls über GraphPad Prism als Balkendiagramme oder in Box-Whisker-Plot Form. Die Box wurde über die 5. und 95. Perzentile festgelegt. Das Ende der Whisker wurde durch den kleinsten und größten gemessenen Wert festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Signifikant veränderte Zytokinspiegel im Serum von Diabetikern und IGT im Vergleich zu Nichtdiabetikern

Der Zytokinarray bietet einen Überblick über die Zytokinprofile der drei untersuchten Gruppen: Gesunde Kontrollgruppe, Prädiabetiker (IGT) und Diabetiker (T2DM).

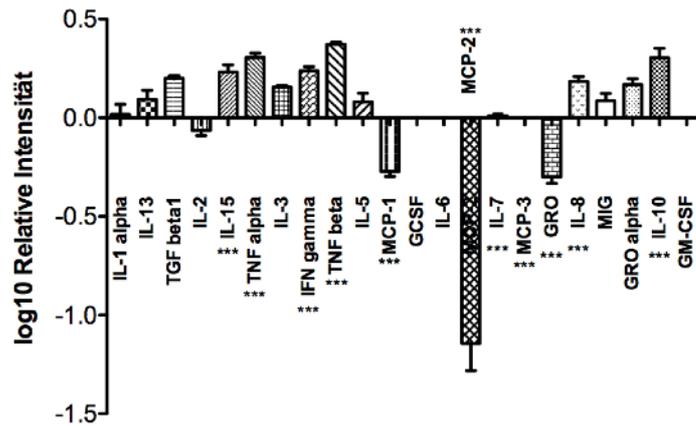


Abbildung 13: logarithmische Darstellung zur Übersicht der relativen Intensität der Zytokine GRO, L-7, IL-8, IL-10, IL-15, IFN- γ , MCP-1, MCP-2, MCP-3 TNF- α , TNF- β . Die Nulllinie stellt den Mittelwert der Kontrollgruppe dar, die Abweichung den Mittelwert der T2DM/IGT Gruppe. Mit *** markierte Zytokine sind hochgradig signifikant verändert.

Bei folgende Zytokinen findet sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen T2DM/IGT-Gruppe zu Kontrollgruppe ($p < 0.0001$):

GRO, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IFN- γ , MCP-1, MCP-2, MCP-3 TNF- α , TNF- β .

Die Diskrepanz der Mittelwerte der Zytokinkonzentration ist beim Zytokin MCP-2 mit -69.95 ± 6.657 SED am stärksten ausgeprägt.

Dieses Zytokin wird dementsprechend zum Fokus unserer nachfolgenden Versuche auserwählt.

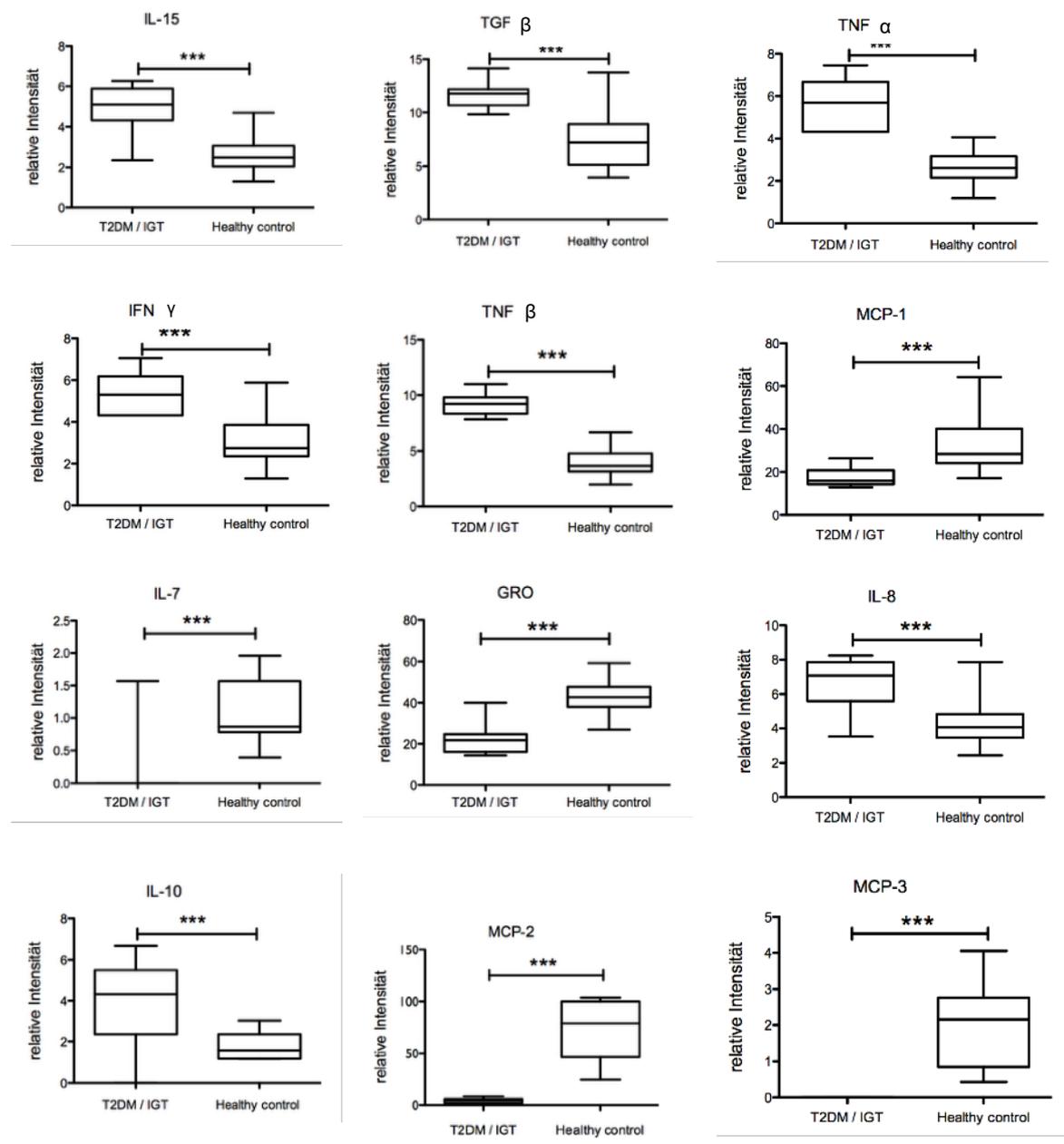


Abbildung 14: graphische Darstellung der relativen Intensität der Zytokine GRO, L-7, IL-8, IL-10, IL-15, IFN- γ , MCP-1, MCP-2, MCP-3 TNF- α , TNF- β in Boxplot Form. Vergleich Gruppe T2DM/IGT vs Kontrollgruppe (healthy control). *** als Zeichen für eine hoch-signifikanten p-Wert < 0.0001 . N(gesamt) = 31, N(healthy control) = 15, N(T2Dm/IGT) = 16

4.2. MCP-2 Serumspiegel bei nicht-behandelten Diabetikern und Insulinglukose-toleranzgestörten im Vergleich zur Kontrollgruppe

Der ELISA Test bestätigt die Ergebnisse des semi-quantitativen Zytokinarrays.

Sowohl IGT als auch T2DM weisen eine signifikante Verminderung der MCP-2 Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

Zwischen IGT und T2DM zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

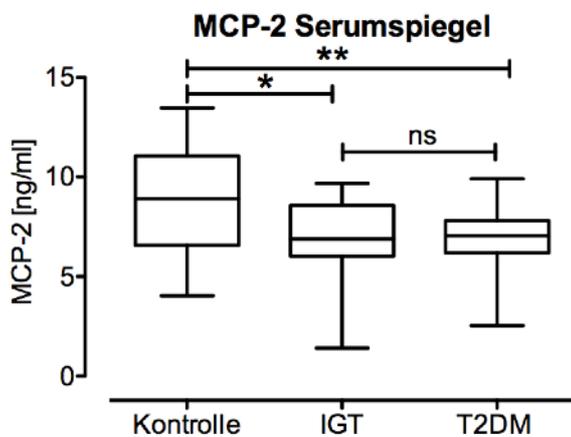


Abbildung 15:

Vergleich Konzentration MCP-2 [ng/ml] zwischen Kontrollgruppe (N=15), IGT-Gruppe (N=8) und T2DM-Gruppe (N=8).

IGT/T2DM Differenz nicht signifikant
($p = 0,5146$; 95%-KI = -1;2).

Signifikante Differenz bei IGT/Kontrolle
($p = 0,0141$; 95%-KI = 0.41;3.4) und T2DM/
Kontrolle ($p = 0,00095$; 95%-KI = 0.5;3.2)

4.3. MCP-2 Serumkonzentrationen bei therapierten T2DM ist unter Sulfonylharnstoff- und Insulintherapie erniedrigt, nicht unter DPP4-Inhibitortherapie

Die Therapieformen Sulfonylharnstoff+Metformin (SU+MET), Lantus+Metformin (LAN+MET) und DPP4-Inhibitor+Metformin (DPP4+MET) werden miteinander verglichen.

Ein zur Kontrollgruppe hochgradig signifikant erniedrigter MCP-2 Serumspiegel findet sich in SU+MET und LAN+MET Patienten. Zwischen Kontrolle und DPP4+MET Patienten findet sich kein signifikanter Unterschied.

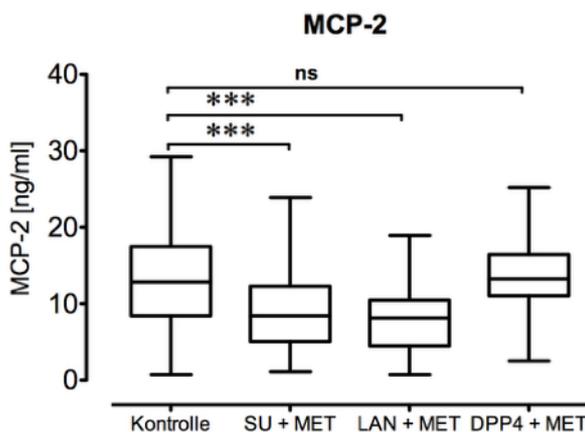


Abbildung 16: Vergleich Konzentration MCP-2 in ng/ml zwischen Kontrolle zu SU+MET, LAN+MET und DPP4+MET Gruppe.

SU+MET: $p=0,0002$; 95%-KI= 2.3;7.1)
 LAN+MET: $p<0.0001$; 95%-KI= 3.3;8
 DPP4+MET: $p=0,9$; 95%-KI= -2.4;2.5

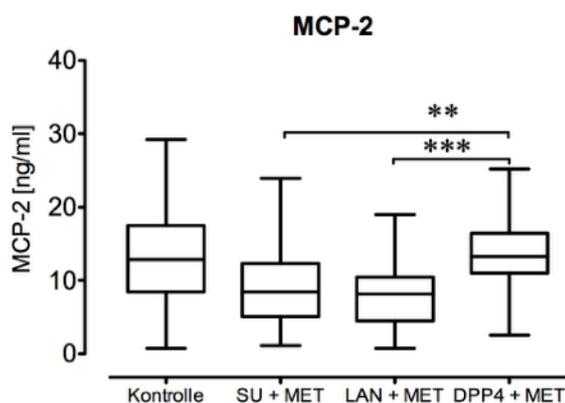


Abbildung 17: Vergleich Konzentration MCP-2 in ng/ml SU+MET und LAN+MET zu DPP4+MET Gruppe.

4.4. Einfluss unterschiedlicher MCP-2 Konzentrationen und Glukosekonzentrationen auf die Migration von THP-1 Zellen

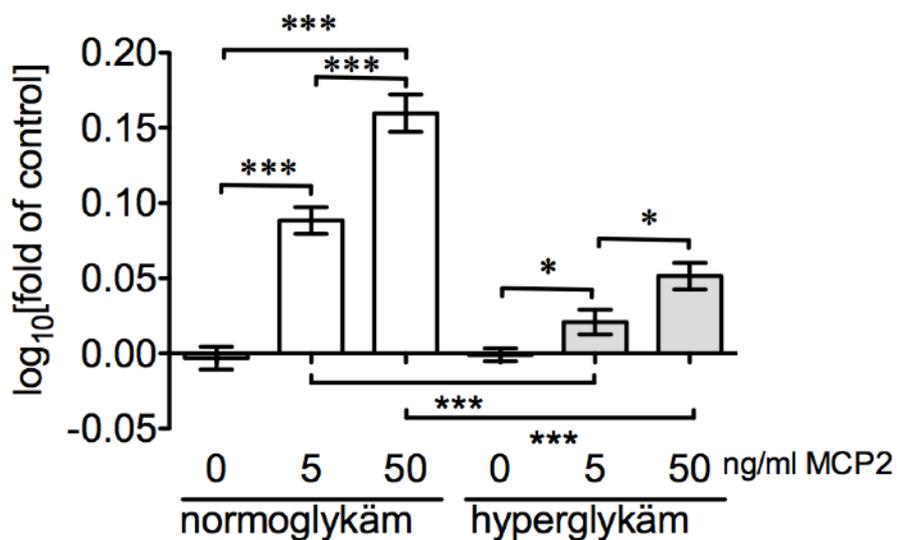


Abbildung 18: Chemotaxis Assay. THP-1 Zellmigration auf chemotaktischen Reiz durch MCP-2.

Die Darstellung der gemessene Fluoreszenz erfolgt im dekadischen Logarithmus, log₁₀ [fold of control]. N(gesamt) = 30, N(Einzelgruppe) = 5, Repeats = 3.

Verglichen werden insgesamt sechs verschiedene Migrationsbedingungen von THP-1 Zellen. THP-1 Zellen unter normoglykämischen Bedingungen migrieren umso stärker von der oberen in die untere Kammer, je höher die Konzentration von MCP-2 in der unteren Kammer ist. Bei 5 ng/ml MCP-2 sowie bei 50 ng/ml-MCP-2 zeigt sich, im Vergleich zur Negativkontrolle ohne MCP-2 Zugabe, ein hoch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $p < 0.05$.

Auch bei Anstieg der Konzentration von 5 auf 50 ng/ml-MCP-2 migrieren die THP-1 Zellen signifikant schneller ($p < 0.0001$).

Unter hyperglykämischen Bedingungen zeigen sich dieselben Tendenzen, die Differenzen sind jedoch weniger signifikant. Der Unterschied in der Signifikanz liegt bei $p = 0,0204$ zwischen 0 ng/ml und 5 ng/ml und $p = 0,0128$ zwischen 5ng/ml und 50 ng/ml.

Allgemein scheinen die THP1-Zellen unter hyperglykämischen Bedingungen schlechter zu migrieren als unter normoglykämischen. Vergleicht man die Anzahl an migrierten Zellen bei identischer Konzentration, jedoch unter unterschiedlichen Glukosebedingungen, zeigen sich bei 5 ng/ml MCP-2 mit einem p von < 0.0001 und bei 50 ng/ml MCP-2 mit ebenfalls einem p-Wert von < 0.0001 hoch signifikante Unterschiede zwischen der hyperglykämischen und der normoglykämischen Gruppe.

4.5. HaCaT-Keratinocyten und Spender-Fibroblasten zeigen einen schnelleren Defektverschluss unter Zugabe von THP-1-Zell-Sekretom

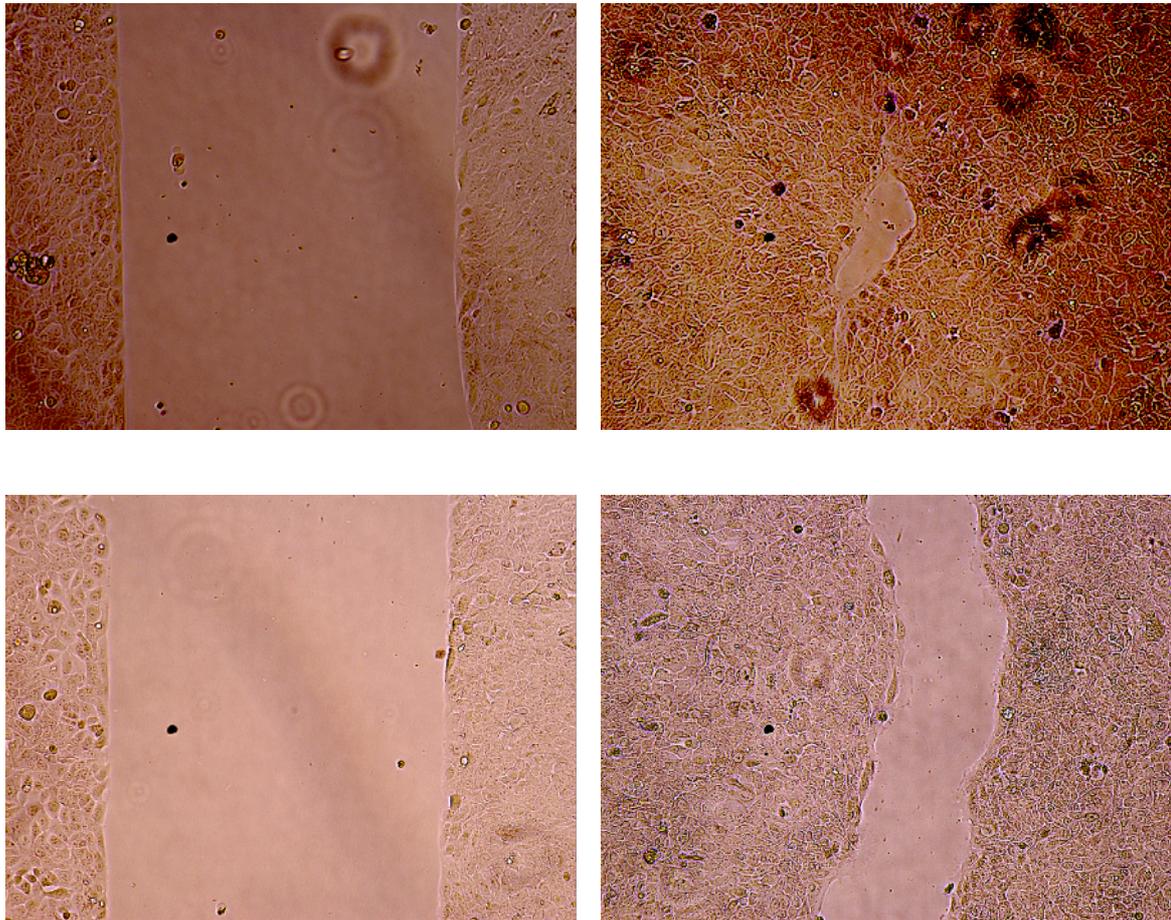


Abbildung 19: HaCaT-Scratch Assay zum Zeitpunkt $t=0$ h (links) und $t=18$ h (rechts) zu einem mit Zugabe von THP-1 Sekretom (oben) sowie ohne (unten)

Abbildung 19 stellt beispielhaft zwei der gemessenen HaCaT-Zell-Scratch Assays zum Zeitpunkt $t=0$ h und $t=20$ h dar. Die zellfreie Fläche soll modellhaft die Hautwunde darstellen.

Sowohl mit THP-1 Sekretom Zusatz (+THP-1) als auch ohne Zusatz (-THP-1) wurde der Verschluss der Scratchdefektes bei HaCaT-Zellen und Fibroblasten nicht signifikant durch den Glukosegehalt im Nährmedium beeinflusst. Hoch signifikant wird der Defektverschluss jedoch durch Zugabe von THP-1 Sekretom beeinflusst.

Im Scratch Assay der HaCaT-Zellen wurde die Defektfläche ohne THP-1 Sekretom Zusatz um $59.9 \pm 2.6\%$ der ursprünglichen Fläche verschlossen. Unter THP-1 Sekretom Zusatz wurde dies auf $86.1 \pm 1.8\%$ erhöht. Mit einem p-Wert von $p = 0.0001$ ist diese Differenz hochgradig signifikant.

Im Fibroblasten Scratch Assay liegt der Unterschied der -THP-1 Gruppe mit $29.9 \pm 3.5\%$ Flächenverschließung im Vergleich zu $53.1 \pm 3.4\%$ in der +THP-1 Gruppe ebenfalls im hochsignifikanten Bereich. Der p-Wert liegt bei $p < 0.0001$.

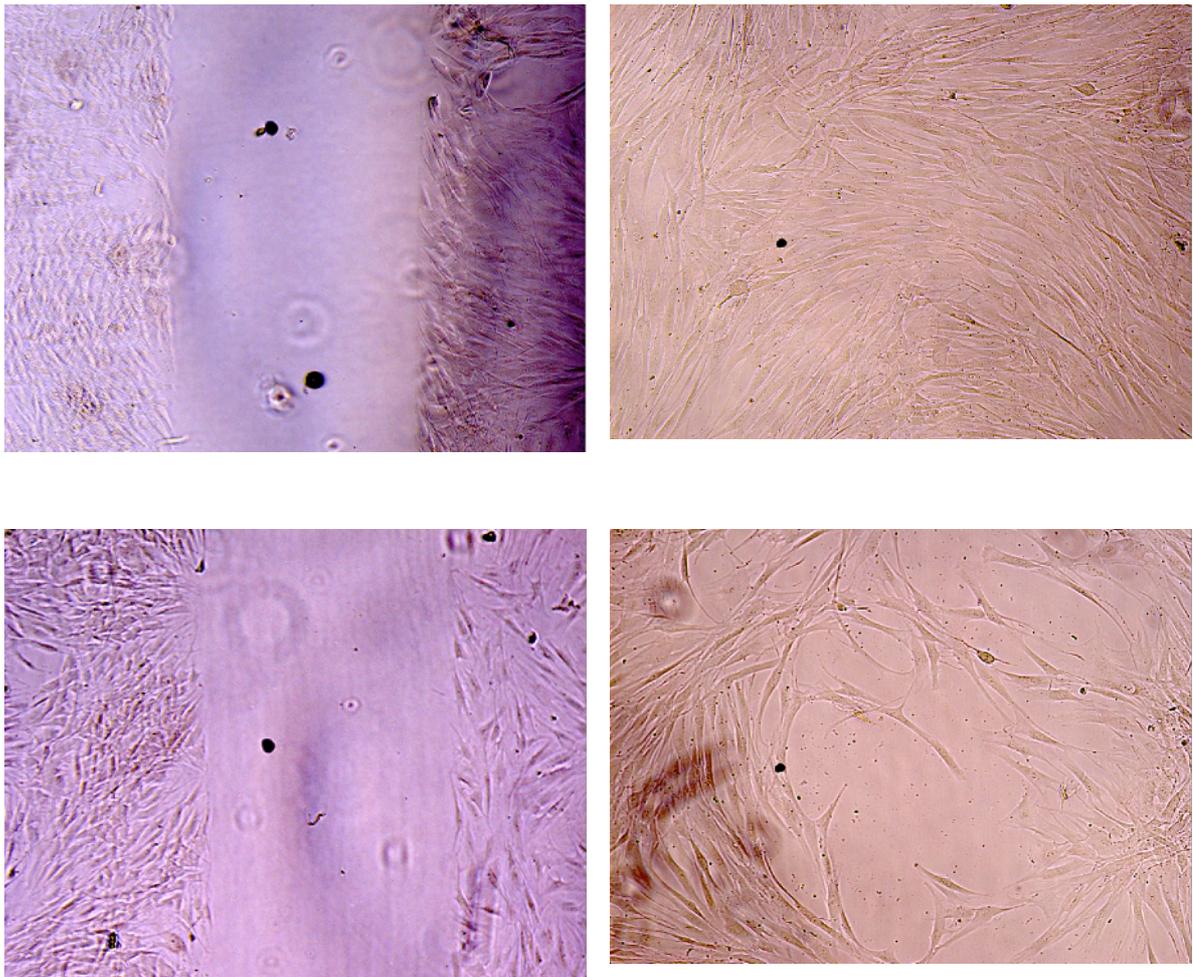


Abbildung 20: Fibroblasten Assay zum Zeitpunkt $t=0$ h (links) und $t=18$ h (rechts) zu einem mit Zugabe von THP-1 Sekretom (oben) sowie ohne (unten)

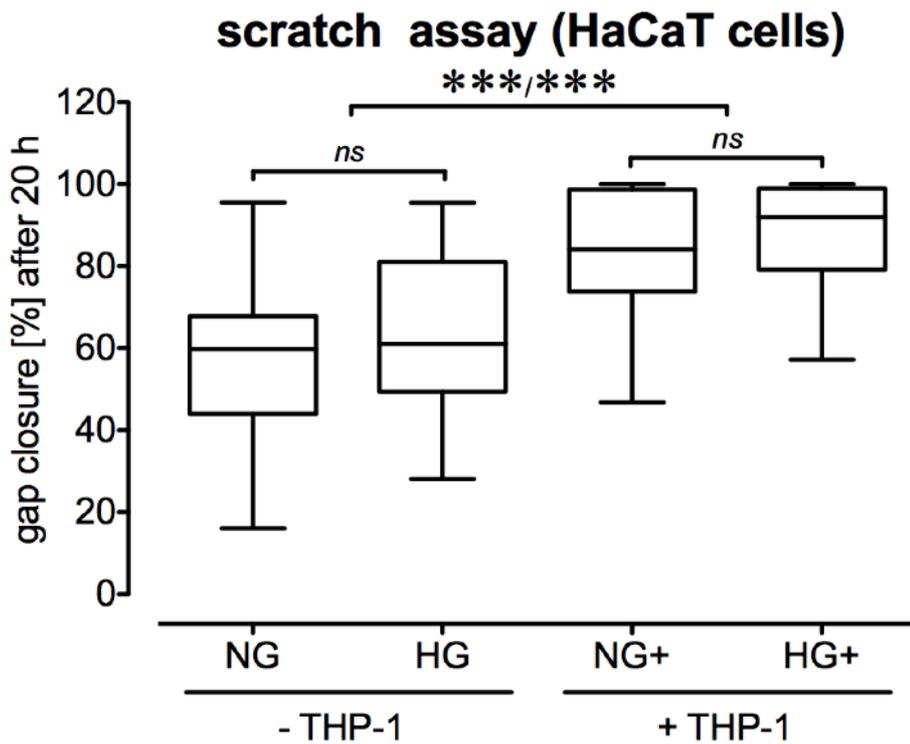


Abbildung 21: Scratch Assay mit HaCaT Zellen. Aufgezeigt ist der Flächenverschluss in Prozent nach 20 h mit und ohne Zusatz von THP-1 Sekretom und unter unterschiedlichen glykämischen Bedingungen.

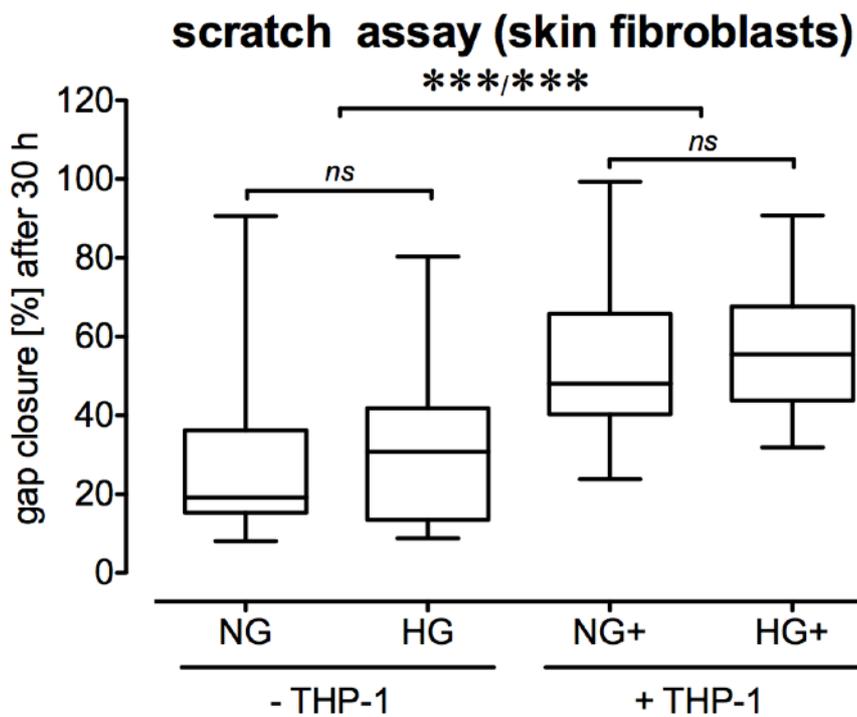


Abbildung 22: Scratch Assay mit Fibroblasten. Aufgezeigt ist der Flächenverschluss in Prozent nach 30 h mit und ohne Zusatz von THP-1 Sekretom und unter unterschiedlichen glykämischen Bedingungen.

4.6. Genexpression von MCP-2 in HaCaT unter hyperglykämischen Bedingungen und durch Zugabe von Insulin und TGF- β

Die Auswirkung von Glukose, Insulin und TGF- β auf die Genexpression von MCP-2/CCL8 in HaCaT Zellen wird über die PCR bestimmt. Abbildung 23 zeigt, dass die Expression unter hyperglykämischen Bedingungen, sowie unter Zugabe von Insulin und TGF- β hochgradig signifikant ($p < 0.0001$) abnimmt.

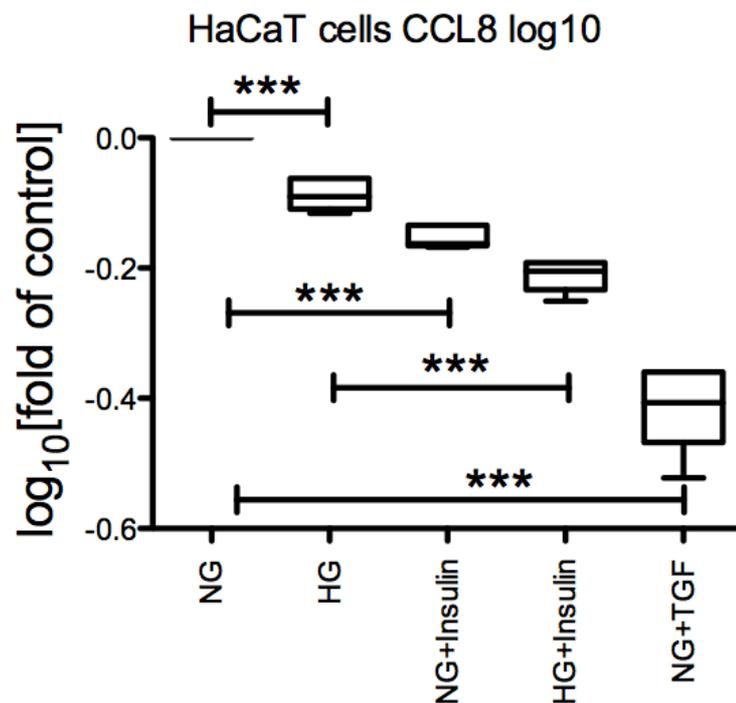


Abbildung 23: Genexpression von MCP-2/CCL8 in HaCaT.
 N(NG) = 4, N(HG) = 4, N(TGF) = 3, N(NG+I) = 2, N(HG+I) = 2, Repeats = 4

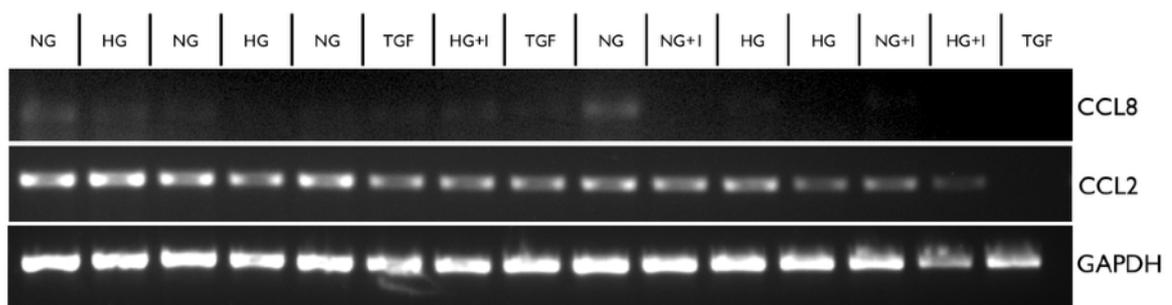


Abbildung 24: Gelelektrophoresebanden von CCL8, CCL2 und GAPDH

4.7. Einfluss von Glukose, Insulin und TGF- β auf Genexpression von MCP-1 in HaCaT-Zellen

Die Genexpression von MCP-1 wird im Gegensatz zu MCP-2 nicht durch den Glukosegehalt des Nährmediums beeinflusst. Unter Anwesenheit von Insulin und TGF- β ist jedoch die Genexpression von MCP-1 ebenso verringert. Im Vergleich zu NG zeigten sowohl NG+Insulin ($p=0,0026$) als auch NG+TGF ($p=0,0016$) signifikante Unterschiede.

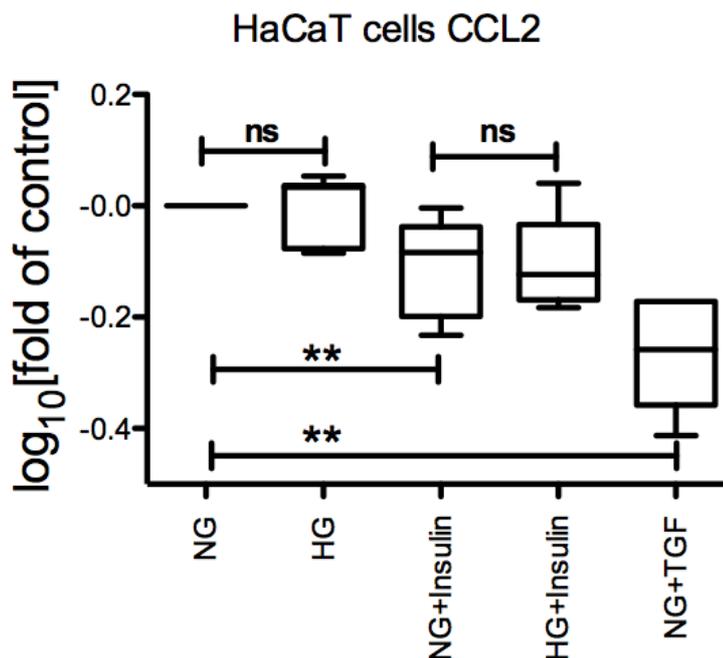


Abbildung 25: Genexpression von MCP-1/CCL2 in HaCaT.

N(NG) = 4, N(HG) = 4, N(TGF) = 3, N(NG+I) = 2, N(HG+I) = 2, Repeats = 4

5. Diskussion

Die Störung der Wundheilung bei Diabetikern ist multifaktoriell bedingt. Einer der beitragenden Faktoren ist die Veränderung des Immunsystems mit hieraus resultierender gestörter Immunantwort auf eine Verletzung. Bei Diabetikern ist eine chronisch niedrighschwellige proinflammatorische Reaktion zu erkennen. Andere Komponenten des Immunsystems werden jedoch reduziert exprimiert oder können ihre Funktion nicht erfüllen. Neben des veränderten Spektrums an Zytokinen und Zellen liegt auch eine Störung des zeitlichen Ablaufs der Zellmigration vor, was letzten Endes zu einer ineffektiven Immunantwort führt [72].

Fragestellung dieser Arbeit war, inwiefern das proinflammatorische Chemokin MCP-2, alternativ CCL8 genannt, bei diesen Prozessen eine Rolle spielt. Das weiteren wurde die Möglichkeit eines neuen Therapieansatzes untersucht.

Zu Beginn der Arbeit stellten wir die Hypothese auf, dass das Zytokinprofil bei T2DM und Prädiabetikern im Serum verändert sei. So konnten sowohl Spranger et al. [73] als auch Dinh et al. [74] erhöhte TNF- α und IL-6 Spiegel im peripheren Blut von Typ 2 Diabetikern feststellen. Die Ergebnisse unseres Zytokinarrays unterstützen diese Aussage. Bei insgesamt 11 der untersuchten Zytokine, allesamt Teil der Untergruppe der Chemokine, wurden signifikante Unterschiede im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe festgestellt. Die Produktion und Sekretion eines Zytokins im Blut wird über die Gentranskription reguliert. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt dabei eine tragende Rolle in der Aktivierung von Genen des gesamten Immunsystems. Sowohl die Hämatopoese und die T- und B-Zell Proliferierung als auch die Chemokintranskription werden über den NF- κ B-Signalweg gesteuert [75].

Für die Aktivierung von NF- κ B gibt es wiederum eine Vielzahl von unterschiedlichen Aktivierungswegen. Ein für proinflammatorische Chemokine relevanter Weg ist die Aktivierung über IL-1beta und der MAPK(Mitogen-activated protein kinase)-Weg [76]. Sowohl für die Anwesenheit von Insulin als auch für den Zustand der Hyperglykämie konnte eine Einfluss auf die Gentranskription einzelner Zytokine in Form der Hoch- oder Herabregulierung nachgewiesen werden [77] [78].

Das veränderte Zytokinprofil von Diabetikern lässt sich somit am wahrscheinlichsten auf eine veränderte Regulierung der NF- κ B-gesteuerten Gentranskription, ausgelöst durch Hyperglykämie, chronische Inflammation und Hyperinsulinämie zurückführen.

Das Chemokin MCP-2 zeigte bei Diabetikern im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe im initialen Zytokinarray die ausgeprägteste Veränderung und wurde somit zum Fokus dieser Arbeit. Durch den ELISA Test konnten wir die signifikant erniedrigten Serumspiegel von MCP-2 bei Diabetikern und Prädiabetikern auch quantitativ feststellen.

Für MCP-2 sind neben dem IL1-b Weg noch weitere Möglichkeiten der Regulierung bekannt. Beispiele hierfür sind die Regulierung über IF-gamma [79] oder der TLR2/PI3K/Akt Signalweg. Jedoch sind die genauen Regulierungswege noch nicht vollständig geklärt. Es ist auch wichtig anzumerken, dass MCP-2 trotz struktureller Ähnlichkeit zu anderen Vertretern der MCP Chemokinfamilie nicht identisch reguliert und exprimiert wird und zum Teil an andere Rezeptoren bindet. So konnte beispielsweise bei übergewichtigen Mäusen ohne Diabetes eine Erhöhung der MCP-1 Serumspiegel gefunden werden, nicht jedoch für MCP-2 [80].

Abbildung 26 bietet eine Übersicht über die Rezeptoraffinität der Mitglieder der MCP-Familie zu einer Auswahl an CCR-X Rezeptoren [81] [82] [83] [44] [84] [85].

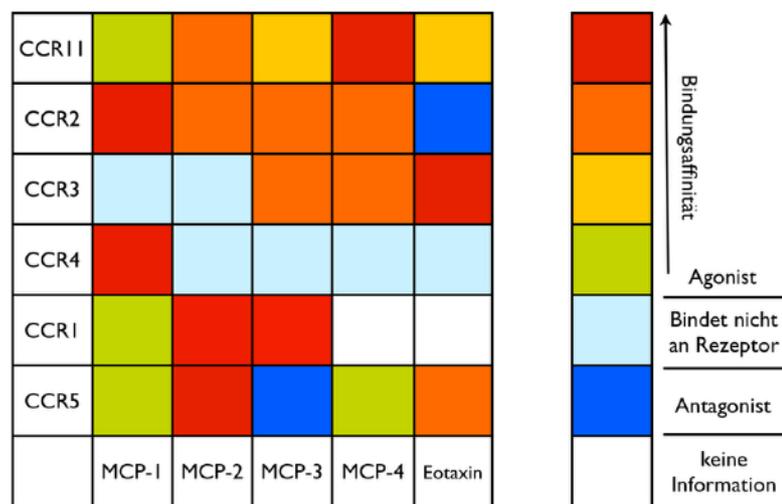


Abbildung 26. Übersichtsdarstellung der Rezeptoraffinität der verschiedenen Mitglieder der MCP-Familie: Chemokine MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 und Eotaxin. Die Bindungsaffinität eines Chemokins zu den CCR-X Rezeptoren wird als relative Affinität im Vergleich zur Affinität der anderen Chemokine angegeben.

Früher wurde ein Zusammenhang von MCP-1 Serumspiegeln mit Typ 2 Diabetes diskutiert. Dieser wurde jedoch 2006 von Herder et al. im Rahmen der KORA S4 Studie widerlegt [86]. Bei einem Teil (N=722) der Gesamtstudienpopulation wurde der Serum MCP-1 Spiegel gemessen und kein signifikanter Zusammenhang zwischen MCP-1 und T2DM festgestellt. Hier ist zu beachten, dass aufgrund der vorbeschriebenen unterschiedlichen Rezeptoraffinitäten zwischen den einzelnen Chemokinen der MCP-Familie dieses Ergebnis nicht auf andere MCP-Chemokine übertragen werden kann. MCP-2 als eigenständiges Chemokin wurde in der KORA S4 Studie zum aktuellen Zeitpunkt nicht untersucht.

Um herauszufinden inwiefern die dermale MCP-2 Genexpression bei Diabetikern beeinflusst sein könnte, untersuchten wir per RNA Isolation und PCR die Expression in HaCaT Keratinozyten unter normo- und hyperglykämischen Bedingungen sowie unter supraphysiologischer Anwesenheit von Insulin und TGF- β . Hierbei zeigte sich, dass die MCP-2 Genexpression, nicht jedoch die MCP-1 Genexpression, bei Hyperglykämie herab reguliert ist. Dies unterstreicht zum einen die Differenz in beiden Chemokinen und zeigt zum anderen, dass sich Genexpression von MCP-2 durch erhöhte Glukoselevel beeinflussen lässt. Zur weiteren Forschung ob diese *in-vitro* beobachteten Verhältnisse ebenfalls *in-vivo* zutreffen, ist ein direkter Vergleich der Genexpression von MCP-2 in der Dermis von Diabetikern im Vergleich zu Gesunden erforderlich.

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden inwiefern dieser festgestellte Mangel an MCP-2 sich negativ auf die Wundheilung auswirken kann.

MCP-2 dient als chemotaktischer Reiz für Monozyten. Monozyten sind Teil der „first response“ des Immunsystems auf eine Verletzung indem sie über Phagozytose nekrotische Zellreste entfernen und die Wunde säubern. Zusätzlich exprimieren sie Faktoren wie Chemokine, die den zeitlichen Ablauf der Immunantwort regulieren. Auch Wachstumsfaktor VEGF wird von Makrophagen sezerniert und führt zur Neubildung der Blutgefäße und Lymphbahnen [87]. Bei Diabetikern ist dieser Prozess gestört. So konnten Maruyama et al bei T2DM db/db Mäusen (Mäusen mit Leptinrezeptordefekt) eine reduzierte Anzahl und eine Störung der Funktion der Monozyten im Wundbereich beobachten. Dies führte in den ersten 14 Tagen zu einem verzögerten Wundverschluss und schlechter ausgebildetem Granulations-

gewebe. Die Funktion der Monozyten konnten sie durch lokale IL-1 β Applikation verbessern [88].

Wir vermuten, dass durch den Mangel an MCP-2 und seiner chemotaktischen Wirkung, primär weniger Monozyten zum Wundbereich gelangen.

Über das Chemotaxis Assay zeigten wir, wie stark chemotaktisch MCP-2 auf THP-1 Monozyten wirkt. Schon die geringe Menge von 5 ng/ml führte zu einer deutlichen Migration von THP-1 Zellen während in Abwesenheit von MCP-2 keine Migration stattfand.

Zusätzlich beobachteten wir, dass in glukosereichem Milieu, welches häufig bei schlecht oder nicht eingestellten Diabetikern vorzufinden ist, dieser Migrationsprozess zusätzlich verlangsamt wird.

Abschließend sollte gezeigt werden wie die Anwesenheit von THP-1 Zellen und deren sezernierten Stoffen, das THP-1 Sekretom, die Wundheilung fördert.

Hierfür wurden einmal eine HaCaT- Keratinozyten Kolonie und eine Kolonie an isolierten Hautfibroblasten als Hautmodell verwendet und das Scratch Assay durchgeführt.

Da es in diesem Modell keine nekrotischen Zellen gibt, kann die phagozytäre Funktion der Monozyten nicht beobachtet werden. Daher beschränkt sich das Modell auf die Wirkung der sezernierenden Stoffe. Um mögliche störende Kofaktoren so gering wie möglich zu halten wurden daher auf die „Wunde“ nicht direkt THP-1 Zellen gegeben, sondern nur deren Sekretom.

Bei beiden Zellkolonien zeigte sich ein schnellerer Verschluss des Zelldefekts unter THP-1-Sekretom Anwesenheit.

Wir konnten jedoch keinen Unterschied in der Verschlusszeit zwischen THP-1 Sekretom aus hyperglykämien und aus normoglykämien Monozyten feststellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit erniedrigte MCP-2 Serumspiegel bei Diabetikern und Prädiabetikern festgestellt wurden. Veränderte Chemokinspiegel bei Typ 2 Diabetikern sind seit längerem bekannt und für einzelne Chemokine auch in groß angelegten Studien untersucht. So wurde in der Augsburger Langzeitstudie KORA S4 erhöhte Serumspiegel von RANTES und IL-8 im Blut von Typ 2 Diabetikern festgestellt [89]. Die gleiche Studie stellte ursprünglich eine Verbindung zwischen dem MCP-2 ähnlichen MCP-1 und Diabetes sowie

Arteriosklerose her. Diese Annahme wurde im Verlauf der Studie jedoch korrigiert [86]. Für MCP-2 liegt eine solche Studienlage nicht vor.

Zusätzlich konnten wir auch zeigen, dass die MCP-2 Genexpression unter hyperglykämischen Bedingungen in Keratinozyten erniedrigt ist.

Wir zeigten die modellhaft die Bedeutung von MCP-2 in der chemotaktischen Rekrutierung von Monozyten und die Auswirkung der sezernierten Stoffe dieser Monozyten auf die Wundheilungsgeschwindigkeit. Eine ähnliche Beobachtung machten Shi et al 2004 [90] in Ihren Versuchen. Über adenovirale Vektoren wurde MCP-2 in Hautwunden von diabetischen Mäusen injiziert. Es zeigte sich eine schnellere Wundheilung mit festerem Gewebe, am wahrscheinlichsten durch ED-1 positive Makrophageninfiltration, unter Anwesenheit von MCP-2.

Dass die Anwesenheit von Makrophagen ein wichtiger Bestandteil der Wundheilung bei Diabetikern ist, ist nicht nur eine laborchemische wissenschaftliche Erkenntnis, sondern hat auch schon Eingang in die Behandlung des diabetischen Fußsyndroms erlangt. So werden aus dem Blut isolierte Monozyten, die PBMC, oberflächlich auf die chronischen Ulzerationen aufgetragen um eine schnellere Wundheilung zu erreichen [91]. Dieser Ansatz der Wundtherapie scheint nicht nur bei diabetischen Ulzerationen einen positiven Effekt zu haben sondern auch bei anderen Verletzungen der Epidermis und Dermis wie bei Verbrennungen [92].

Zusätzlich wurde im ELISA Immunoassay die Serumkonzentration von MCP-2 unter verschiedenen antidiabetischen Therapien getestet. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Therapieformen konnten festgestellt werden.

Unter zusätzlich zu Metformin erfolgter Insulingabe (Lantus) oder unter zusätzlicher Gabe von Sulfonylharnstoffen zeigten sich erniedrigte Spiegel an MCP-2 im Vergleich zu Gesunden. Unter der Kombination von Metformin und DPP4-Inhibitoren wurden jedoch MCP-2 Konzentration gemessen, die den Konzentrationen bei Gesunden entsprachen.

Dieser Unterschied könnte sich über die unterschiedliche Wirkweise der Medikamente erklären lassen. Die direkte subkutane Direktgabe von Insulin führt nach Applikation zu unphysiologisch hohen Insulinspiegeln. Auch die Therapie mit Sulfonylharnstoffen führt über die Blutglukose-unabhängige Stimulierung der Beta-

Zellen des Pankreas zu einer intermittierenden oder chronischen Erhöhung der Insulinwerte auf teilweise un-physiologische Werte [93]. Auf der einen Seite ist diese Insulinerhöhung die beabsichtigte Wirkweise der Therapie, auf der anderen Seite ist sie durch die zeitweise zu hohen Seruminsulinspiegel auch Auslöser der Nebenwirkungen. Im Vordergrund stehen hierbei die Episoden der Hypoglykämie durch zu starke Senkung der Plasmablutglukose bei zu hohen Insulinwerten. Im gleichen Kontext der bekannten bestehenden Hyperinsulinämie [94] sind die ebenfalls erniedrigten MCP-2 Spiegel bei bereits Prädiabetikern zu werten.

So lieferten unsere eigenen Ergebnisse einen Hinweis drauf, dass die MCP-2 Genexpression von der Anwesenheit von Insulin beeinflusst wird. Bei der Untersuchung der MCP-2 Genexpression von Keratinozyten stellten wir fest, dass diese unter supraphysiologischer Insulinanwesenheit reduziert ist.

Die Wirkweise von DPP4-Inhibitoren unterscheidet sich von den hyperinsulinämischen Prinzipien. Es kommt nicht direkt zu einer verstärkten Insulinausschüttung, sondern indirekt über die Inhibierung des Abbaus von GLP-1 [95]. Dieser erhöhte GLP-1-Spiegel sensibilisiert die Beta-Zellen und führt zu einer verlängerten postprandialen Insulinausschüttung [96]. Im Gegensatz zu Sulfonylharnstoffen führen DPP4-Inhibitoren jedoch hierdurch nicht zu einer unphysiologischen Erhöhung [97] und haben damit weniger Hypoglykämien zur Folge. Dieses Fehlen von erhöhten Insulinspiegeln könnte eine Erklärung für die normalen MCP-2 Spiegel bei Diabetikern unter DPP4-Inhibitor-Therapie sein.

Dass Diabetiker unter DPP4-Inhibitor-Therapie eine verbesserte Wundheilung zeigen wurde bereits beobachtet und verschiedene Ursachen, die diesen Effekt bewirken, diskutiert [98] [99]. Die von uns beobachtete gesteigerte MCP-2 Expression könnte eine Erklärung für die Verbesserung unter DPP-4 Therapie darstellen.

5.2. Kritikpunkte an der Arbeit und Möglichkeiten der Erweiterung und Verbesserung

Die Arbeiten dieser Doktorarbeit dienen ihrer Anlage nach zur Hypothesengenerierung. Daraus erklärt sich die vergleichsweise geringe Fallzahl und die bislang lediglich *in-vitro* produzierten Ergebnisse.

Es sollten die Grundlagen der Rolle von MCP-2 in der Wundheilung untersucht werden.

Hinsichtlich der festgestellten Veränderungen im Zytokinspektrum muss sicher ein noch größeres Kollektiv unter Berücksichtigung der verschiedenen, auch neueren, anti-diabetischen Therapien untersucht werden.

Fraglich ist, inwiefern sich die als Wundmodell benutzten Scratch Assays mit HaCaT-Zellen und Fibrozyten *in-vivo* Bedingungen vergleichen lassen und ob der MCP-2 Einfluss *in-vivo* signifikant bleibt.

Hier besteht die Möglichkeit die Wundheilung *in-vivo* zu Testen im Rahmen von Versuchen mit Diabetesmäusen oder Schweinen. Oberflächliche kleine Hautwunden sind relativ schmerzfrei und würden bei den Tieren keine bleibenden Schäden hinterlassen.

Hierbei besteht auch die Möglichkeit MCP-2 lokal zu applizieren mit der Fragestellung ob eine lokale Applikation durch Monozyten-Rekrutierung die Wundheilung verbessern kann.

Auch die lokale Applikation von THP-1 Monozyten Sekretom auf die Wunde kann untersucht werden.

Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass das diabetische Milieu für Zellkulturen durch Zugabe von Glukose und Insulin imitiert wurde. Diabetes mellitus jedoch ist eine komplexe Krankheit mit vielen weiteren veränderten Faktoren welche einen moderierenden Einfluss auf die Wundheilung haben können, in unserem Hautmodell aber nicht berücksichtigt wurden.

Hier besteht die Möglichkeit die MCP-2 Genexpression direkt in der Spenderhaut von Diabetikern im Rahmen von operativen Eingriffen zu bestimmen.

Des Weiteren kann die Rolle von MCP-2 in der Frakturheilung untersucht werden. Auch in der Frakturheilung spielen Makrophagen eine tragende Rolle, besonders in der frühen Phase der Frakturheilung [100]. So ist der MCP-2 Rezeptor CCR2 für die Makrophagenrekrutierung und Osteoklastenaktivierung zuständig und ein Defizit kann zur verzögerten Knochenumstrukturierung führen [101].

6. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es die Rolle von Chemokin MCP-2 in der Wundheilung von Typ 2 Diabetikern (T2DM) und Insulinglukosetoleranzgestörten (IGT) zu untersuchen. Initial wurden semi-quantitativ mittels Chemotaxis-Assay das Serum-Zytokinprofil von nicht-therapierten T2DM (N=8) und IGT (N=8) im Vergleich zu gesunden Probanden (N=15) untersucht. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede in den Zytokinspiegeln der Zytokine GRO, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IFN- γ , MCP-1, MCP-2, MCP-3 TNF- α und TNF- β . Fokus der Arbeit wurde das Chemotaxis auslösende Zytokin MCP-2. MCP-2 dient als Signalprotein für die chemotaktische Migration von Monozyten. Es ist ebenfalls unter dem Namen CCL-8 bekannt.

Mittels ELISA wurden die Zytokinspiegel quantitativ bestimmt. Die MCP-2 Spiegel, gemessen in ng/ml, waren im Vergleich zur Kontrollgruppe bei T2DM ($p = 0,00095$) und IGT ($p = 0,0141$) signifikant verringert. Die MCP-2 Zytokinspiegel von T2DM unter Therapie zeigten ebenfalls signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Untersucht wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe (N=20) Patienten mit Metformin+Sulfonylharnstoff (N=16), Metformin+Lantus (N=11) und Metformin+DPP4-Inhibitoren (N=16).

Unter Therapie von MET+SU ($p=0,0002$) und MET+LAN ($p<0.0001$) zeigten sich erniedrigte Spiegel. Unter Therapie mit MET+DPP4 lag jedoch kein Unterschied im Zytokinspiegel von MCP-2 im Vergleich zu Gesunden vor.

Im Weiteren wurde der Einfluss von MCP-2 auf die Migration von Monozyten (THP1-Zellen) untersucht. Im Chemotaxis Assay zeigte sich bei erhöhter Konzentration von 5 ng/ml und 50 ng/ml MCP-2 eine signifikant schnellere Migration der THP-1 Zellen. Zusätzlich zeigte sich eine langsamere Migration unter hyperglykämischen Bedingungen im Vergleich zu normoglykämischen Bedingungen ($p < 0.0001$).

Mittels Scratch Assay wurde der Einfluss des THP-1-Zell-Sekretoms auf die Wundheilung von Keratinozyten und Fibroblasten beobachtet. Ein signifikant schnellerer Verschluss von gesetzten Zellverbanddefekten zeigte sich in beiden Zellreihen unter Zugabe von THP-1-Sekretom ($p < 0.0001$).

Zuletzt wurde der Einfluss der Anwesenheit von Glukose und Insulin auf die Genexpression von MCP-2 in HaCaT Keratinozytenkulturen mittels PCR-Verfahren untersucht. Sowohl ein erhöhter Glukosegehalt wie ein erhöhter Insulingehalt im Zellkulturnährmedium führt zu einer signifikanten ($p < 0.0001$) Abnahme der MCP-2 Genexpression.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit somit ein Unterschied in MCP-2 Serumspiegeln bei Diabetikern und Glukosetoleranzgestörten im Vergleich zu Nicht-Diabetikern festgestellt. Der Einfluss der Anwesenheit von Glukose und Insulin auf die Genexpression von MCP-2 wurde im Hautmodell an Keratinozyten untersucht. Um einen möglichen Einfluss der reduzierten MCP-2 Spiegel auf die Wundheilung darzustellen wurde die Migration von Monozyten auf den chemotaktischen Reiz von MCP-2 untersucht. Des weiteren wurde untersucht inwiefern die von Monozyten sezernierten Proteinen den Zellverschluss von Fibrozyten und Keratinozyten beschleunigen.

7. Bibliografie

1. Rubin, R.R. and M. Peyrot, *Quality of life and diabetes*. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 1999. 15(3): p. 205-218.
2. *Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death*. New England Journal of Medicine, 2011. 364(9): p. 829-841.
3. Unwin, N. *IDF Diabetes Atlas*. 2011; 5th Edition:[Available from: <https://www.idf.org/component/attachments/attachments.html?id=812&task=download> ; [cited: 03.10.2017]
4. Bommer, C., et al., *The global economic burden of diabetes in adults aged 20 < 2013;79 years: a cost-of-illness study*. The Lancet Diabetes & Endocrinology. 5(6): p. 423-430.
5. Brem, H., *Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes*. 2007. 117(5): p. 1219-22.
6. Marchal de Calvi, C.J., *Des rapports de la gangrene et de la glycosurie*. Gazette des Hôpitaux Civils et militaires, 1852(25:178).
7. Blotner, H. and R. Fitz, *On Diabetic Gangrene, with Particular Reference to the Value of Insulin in Its Treatment*. The Boston Medical and Surgical Journal, 1926. 194(25): p. 1155-1162.
8. Falanga, V., *Wound healing and its impairment in the diabetic foot*. The Lancet, 2005. 366(9498): p. 1736-1743.
9. Schwartz, A.V., et al., *Older Women With Diabetes Have a Higher Risk of Falls: A prospective study*. Diabetes Care, 2002. 25(10): p. 1749-1754.
10. Forsén, L., et al., *Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: results from the Nord-Trøndelag Health Survey*. Diabetologia. 42(8): p. 920-925.
11. Most, R.S. and P. Sinnock, *The Epidemiology of Lower Extremity Amputations in Diabetic Individuals*. Diabetes Care, 1983. 6(1): p. 87-91.
12. Moulik, P.K., R. Mtonga, and G.V. Gill, *Amputation and Mortality in New-Onset Diabetic Foot Ulcers Stratified by Etiology*. Diabetes Care, 2003. 26(2): p. 491-494.
13. Johannesson, A., et al., *Incidence of Lower-Limb Amputation in the Diabetic and Nondiabetic General Population: A 10-year population-based cohort study of initial unilateral and contralateral amputations and reamputations*. Diabetes Care, 2009. 32(2): p. 275-280.
14. Köstner, I., *Die Kosten des Diabetes mellitus - Ergebnisse der KoDiM-Studie* 2005.
15. Association, A.D., *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 2009. 32(Supplement 1): p. S62-S67.
16. McCance, K.L. and S.E. Huether, *Pathophysiology: The Biologic Basis for Disease in Adults and Children*. Vol. 7. 2015: Elsevier Health Sciences. 746-752.
17. Tomlinson, D.R. and N.J. Gardiner, *Glucose neurotoxicity*. Nat Rev Neurosci, 2008. 9(1): p. 36-45.
18. Ali, O., *Genetics of type 2 diabetes*. World Journal of Diabetes, 2013. 4(4): p. 114-123.
19. Ling, C. and L. Groop, *Epigenetics: A Molecular Link Between Environmental Factors and Type 2 Diabetes*. Diabetes, 2009. 58(12): p. 2718-2725.
20. Association, A.D., *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 2010. 33(Supplement 1): p. S62-S69.
21. Tabák, A.G., et al., *Prediabetes: A high-risk state for developing diabetes*. Lancet, 2012. 379(9833): p. 2279-2290.

22. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). *Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Kurzfassung, 1. Auflage. Version 4. 2013, zuletzt geändert: November 2014.* Available from: <http://www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de>; [cited: 24.06.2016]; DOI: 10.6101/AZQ/000215.
23. Barry, E., et al., *Efficacy and effectiveness of screen and treat policies in prevention of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of screening tests and interventions.* BMJ, 2017. 356.
24. Viollet, B., et al., *Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview.* Clinical Science (London, England : 1979), 2012. 122(6): p. 253-270.
25. Diabetes Prevention Program Research, G., *10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study.* Lancet, 2009. 374(9702): p. 1677-1686.
26. Home, P., et al., *An observational non-interventional study of people with diabetes beginning or changed to insulin analogue therapy in non-Western countries: The A1chieve study.* Diabetes Research and Clinical Practice. 94(3): p. 352-363.
27. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, Function, and Inhibition of Chemokines.* Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2002. 42(1): p. 469-499.
28. Gillitzer, R. and M. Goebeler, *Chemokines in cutaneous wound healing.* Journal of Leukocyte Biology, 2001. 69(4): p. 513-521.
29. Bernardini, G., et al., *Analysis of the role of chemokines in angiogenesis.* Journal of Immunological Methods, 2003. 273(1–2): p. 83-101.
30. Engelhardt, E., et al., *Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig Are Sequentially and Differentially Expressed During Phase-Specific Infiltration of Leukocyte Subsets in Human Wound Healing.* The American Journal of Pathology. 153(6): p. 1849-1860.
31. Lynch, S.E., et al., *Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. 84(21): p. 7696-7700.
32. Soehnlein, O. and L. Lindbom, *Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation.* Nat Rev Immunol, 2010. 10(6): p. 427-439.
33. Lucas, T., et al., *Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair.* The Journal of Immunology, 2010. 184(7): p. 3964-3977.
34. Meszaros, A.J., J.S. Reichner, and J.E. Albina, *Macrophage-Induced Neutrophil Apoptosis.* The Journal of Immunology, 2000. 165(1): p. 435-441.
35. Rotolo, S., et al., *Silencing of Keratinocyte Growth Factor Receptor Restores 5-Fluorouracil and Tamoxifen Efficacy on Responsive Cancer Cells.* PLoS ONE, 2008. 3(6): p. e2528.
36. Brancato, S.K. and J.E. Albina, *Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function.* Am J Pathol, 2011. 178(1): p. 19-25.
37. Crown, S.E., et al., *Heterodimerization of CCR2 Chemokines and Regulation by Glycosaminoglycan Binding.* Journal of Biological Chemistry, 2006. 281(35): p. 25438-25446.
38. Van Damme, J., et al., *Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family.* The Journal of Experimental Medicine, 1992. 176(1): p. 59-65.
39. Taub, D.D., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes.* Journal of Clinical Investigation, 1995. 95(3): p. 1370-1376.

40. Gong, X., et al., *Monocyte Chemotactic Protein-2 (MCP-2) Uses CCR1 AND CCR2B as Its Functional Receptors*. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(18): p. 11682-11685.
41. Islam, S.A., et al., *Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5+ T(H)2 cells*. Nat Immunol, 2011. 12(2): p. 167-77.
42. Ruhwald, M., et al., *Evaluating the potential of IP-10 and MCP-2 as biomarkers for the diagnosis of tuberculosis*. European Respiratory Journal, 2008. 32(6): p. 1607-1615.
43. Hori, T., et al., *CCL8 is a potential molecular candidate for the diagnosis of graft-versus-host disease*. Blood, 2008. 111(8): p. 4403-12.
44. Gong, W., et al., *Monocyte Chemotactic Protein-2 Activates CCR5 and Blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 Entry/Replication*. Journal of Biological Chemistry, 1998. 273(8): p. 4289-4292.
45. Brem, H., et al., *Molecular Markers in Patients with Chronic Wounds to Guide Surgical Debridement*. Molecular Medicine, 2007. 13(1-2): p. 30-39.
46. Stojadinovic, O., et al., *Molecular Pathogenesis of Chronic Wounds : The Role of β -Catenin and c-myc in the Inhibition of Epithelialization and Wound Healing*. The American Journal of Pathology, 2005. 167(1): p. 59-69.
47. Koivukangas, V., et al., *Delayed restoration of epidermal barrier function after suction blister injury in patients with diabetes mellitus*. Diabetic Medicine, 1999. 16(7): p. 563-567.
48. Pecoraro, R.E., et al., *Chronology and Determinants of Tissue Repair in Diabetic Lower-Extremity Ulcers*. Diabetes, 1991. 40(10): p. 1305-1313.
49. Bao, P., et al., *The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing*. The Journal of surgical research, 2009. 153(2): p. 347-358.
50. Gallagher, K.A., et al., *Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 α* . Journal of Clinical Investigation, 2007. 117(5): p. 1249-1259.
51. Gibran, N.S., et al., *Diminished Neuropeptide Levels Contribute to the Impaired Cutaneous Healing Response Associated with Diabetes Mellitus*. Journal of Surgical Research. 108(1): p. 122-128.
52. Kerner W., B.J., *Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus*. Diabetologie und Stoffwechsel, 2013. 8(2): p. S104-S107.
53. Pscherer, S., et al., *In Type 2 Diabetes Patients, Insulin Glargine Is Associated with Lower Postprandial Release of Intact Proinsulin Compared with Sulfonylurea Treatment*. Journal of Diabetes Science and Technology, 2012. 6(3): p. 634-640.
54. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. International Journal of Cancer, 1980. 26(2): p. 171-176.
55. Qin, Z., *The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature*. Atherosclerosis. 221(1): p. 2-11.
56. Schürer, N., et al., *Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes*. Experimental Dermatology, 1993. 2(4): p. 179-185.
57. RayBioTech, *How it works: RayBio® sandwich ELISAs*.
58. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. 8(9): p. 871-874.
59. Chen, H.C., *Boyden chamber assay*. Methods Mol Biol, 2005. 294: p. 15-22.

60. Liang, C.-C., A.Y. Park, and J.-L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. *Nat. Protocols*, 2007. 2(2): p. 329-333.
61. Tjalsma, H., et al., *Signal Peptide-Dependent Protein Transport in Bacillus subtilis: a Genome-Based Survey of the Secretome*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000. 64(3): p. 515-47.
62. Rasband, W.S., *ImageJ*, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. 1997-2015.
63. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, [21] *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, in *Methods in Enzymology*. 1987, Academic Press. p. 335-350.
64. Kary B. Mullis - Nobel Lecture: The Polymerase Chain Reaction. [cited 2017 03.10.2017]; Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html. ;[cited: 03.10.2017]
65. Ehnert, S., et al., *Factors circulating in the blood of type 2 diabetes mellitus patients affect osteoblast maturation – Description of a novel in vitro model*. *Experimental Cell Research*, 2015. 332(2): p. 247-258.
66. *Instruction Manual peqGOLD HP Total RNA Kit* Available from: https://de.vwr.com/assetsvc/asset/de_DE/id/17035105/contents. ;[cited: 03.10.2017]
67. Fleige, S. and M.W. Pfaffl, *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006. 27(2–3): p. 126-139.
68. Hara, M.R., et al., *S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding*. *Nat Cell Biol*, 2005. 7(7): p. 665-674.
69. Glare, E., et al., *β -Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels*. *Thorax*, 2002. 57(9): p. 765-70.
70. Joeri L. Aerts, M.I.G., Suzanne L. Topalia, *Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR*. *BioTechniques*, 2004. 36(1): p. 84–91.
71. Lange, R.B.S., *Was ist ein Konfidenzintervall?* *Dtsch med Wochenschr*, 2007. 132(S 01): p. e17-e18.
72. Pierce, G.F., *Inflammation in Nonhealing Diabetic Wounds : The Space-Time Continuum Does Matter*. *The American Journal of Pathology*, 2001. 159(2): p. 399-403.
73. Spranger, J., et al., *Inflammatory Cytokines and the Risk to Develop Type 2 Diabetes*. *Results of the Prospective Population-Based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study*, 2003. 52(3): p. 812-817.
74. Dinh, W., et al., *Elevated plasma levels of TNF-alpha and Interleukin-6 in patients with diastolic dysfunction and glucose metabolism disorders*. *Cardiovasc Diabetol*, 2009. 8: p. 58.
75. Hayden, M.S., A.P. West, and S. Ghosh, *NF-[kappa]B and the immune response*. *Oncogene*, 0000. 25(51): p. 6758-6780.
76. Pulai, J.I., et al., *NF- κ B Mediates the Stimulation of Cytokine and Chemokine Expression by Human Articular Chondrocytes in Response to Fibronectin Fragments*. *The Journal of Immunology*, 2005. 174(9): p. 5781-5788.
77. Martins, J.O., et al., *Insulin regulates cytokines and intracellular adhesion molecule-1 gene expression through nuclear factor κ B activation in LPS-induced acute lung injury in rats*. *Shock*, 2009. 31(4): p. 404-409.
78. Shanmugam, N., et al., *High Glucose-Induced Expression of Proinflammatory Cytokine and Chemokine Genes in Monocytic Cells*. *Diabetes*, 2003. 52(5): p. 1256-1264.

79. Van Coillie, E., et al., *Human Monocyte Chemotactic Protein-2: cDNA Cloning and Regulated Expression of mRNA in Mesenchymal Cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. 231(3): p. 726-730.
80. Jiao, P., et al., *Obesity-Related Upregulation of Monocyte Chemotactic Factors in Adipocytes : Involvement of Nuclear Factor- κ B and c-Jun NH(2)-Terminal Kinase Pathways*. Diabetes, 2009. 58(1): p. 104-115.
81. Ogilvie, P., et al., *Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5*. Blood, 2001. 97(7): p. 1920-1924.
82. Schweickart, V.L., et al., *CCR11 Is a Functional Receptor for the Monocyte Chemoattractant Protein Family of Chemokines*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(13): p. 9550-9556.
83. Bradley, M.K., et al., *Mo1842 CCR2 and CCR4 Activation via CCL2/MCP-1 Contributes to Neurological Decline and Microglia Activation Associated With Hepatic Encephalopathy Pathogenesis*. Gastroenterology. 144(5): p. S-1026-S-1027.
84. Neote, K., et al., *Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor*. Cell, 1993. 72(3): p. 415-425.
85. Murphy, P.M., et al., *International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors*. Pharmacological Reviews, 2000. 52(1): p. 145-176.
86. Herder, C., et al., *Systemic monocyte chemoattractant protein-1 concentrations are independent of type 2 diabetes or parameters of obesity: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4)*. European Journal of Endocrinology, 2006. 154(2): p. 311-317.
87. Cursiefen, C., et al., *VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment*. The Journal of Clinical Investigation. 113(7): p. 1040-1050.
88. Maruyama, K., et al., *Decreased Macrophage Number and Activation Lead to Reduced Lymphatic Vessel Formation and Contribute to Impaired Diabetic Wound Healing*. The American Journal of Pathology, 2007. 170(4): p. 1178-1191.
89. Herder, C., et al., *Association of Systemic Chemokine Concentrations With Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes*. Results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4), 2005. 54(suppl 2): p. S11-S17.
90. Shi, Y., et al., *038 Adenoviral overexpression of MCP-2 induces macrophages and improves wound healing in diabetic rats*. Wound Repair and Regeneration, 2004. 12(2): p. A11-A11.
91. Asai, J., et al., *Successful treatment of diabetic gangrene with topical application of a mixture of peripheral blood mononuclear cells and basic fibroblast growth factor*. The Journal of Dermatology, 2006. 33(5): p. 349-352.
92. Hacker, S., et al., *Paracrine Factors from Irradiated Peripheral Blood Mononuclear Cells Improve Skin Regeneration and Angiogenesis in a Porcine Burn Model*. Scientific Reports, 2016. 6: p. 25168.
93. Pfeifer, M.A., et al., *Acute and chronic effects of sulfonylurea drugs on pancreatic islet function in man*. Diabetes care, 1984. 7 Suppl 1: p. 25-34.
94. Mykkanen, L., et al., *Serum proinsulin levels are disproportionately increased in elderly prediabetic subjects*. Diabetologia, 1995. 38(10): p. 1176-82.
95. Ahrén, B., *DPP-4 inhibitors*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007. 21(4): p. 517-533.
96. Lee, Y.-S. and H.-S. Jun, *Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells*. Metabolism - Clinical and Experimental. 63(1): p. 9-19.

97. Ahrén, B., et al., *Improved Meal-related Insulin Processing Contributes to the Enhancement of B-Cell Function by the DPP-4 Inhibitor Vildagliptin in Patients with Type 2 Diabetes*. *Horm Metab Res*, 2007. 39(11): p. 826-829.
98. Klein, T.M.M.F.S., *Der neue DPP-4 Inhibitor Linagliptin verbessert den Wundheilungsprozess in ob/ob Mäusen*. *Diabetologie und Stoffwechsel*, 2010. 5(1): p. 186.
99. Saboo, A., et al., *Wound healing effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: An emerging concept in management of diabetic foot ulcer—A review*. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*.
100. Wu, A.C., et al., *Unraveling macrophage contributions to bone repair*. *BoneKEy Rep*, 2013. 2.
101. Xing, Z., et al., *Multiple roles for CCR2 during fracture healing*. *Disease Models & Mechanisms*, 2010. 3(7-8): p. 451-458.

8. Erklärung

Die Arbeit wurde am Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung der BG Unfallklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Andreas Nüssler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Sabrina Ehnert.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Sabrina Ehnert von mir selbst mit Unterstützung durch Dr. Sabrina Ehnert durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich nach Anleitung durch Dr. Sabrina Ehnert.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 13.07.2018