

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HALS-NASEN-UND-OHRENHEILKUNDE
PROF. DR. J. STRUTZ
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ZELLBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG
KUTANER KELOIDE
-
EINE IN-VITRO-STUDIE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Isabella Förstl

2014

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HALS-NASEN-UND-OHRENHEILKUNDE
PROF. DR. J. STRUTZ
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ZELLBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG
KUTANER KELOIDE
-
EINE IN-VITRO-STUDIE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Isabella Förstl

2014

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Holger Gassner

2. Berichterstatter:

PD Dr. Dr. Tobias Ettl

Tag der mündlichen Prüfung:

15. Juli 2015

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	9
1.1 Allgemeines Erscheinungsbild eines Keloids	9
1.2 Physiologische Wundheilung	11
1.3 Gestörte Wundheilung	13
1.3.1 Narbenarten.....	14
1.3.2 Unterschiede zwischen Keloid und hypertropher Narbe	15
1.3.3 Präventive Maßnahmen zur Narbenvermeidung	16
1.4 Entstehung eines Keloids	18
1.4.1 Ätiologie der Keloidbildung.....	18
1.4.2 Theorien zum Pathomechanismus des Keloids.....	18
1.5 Prädispositionen für die Keloidbildung	19
1.6 Therapiemöglichkeiten und Prognose	20
1.6.1 Chirurgische Therapie.....	21
1.6.2 Konservative Therapie	22
1.6.3 Stufenschema und Kombinationstherapien.....	24
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	26
2 Material	27
2.1 Zellkultur	27
2.2 Medien	27
2.3 Assays	27
2.4 Chemikalien und Lösungen	28
2.5 Sonstige Materialien	29
2.6 Geräte	30
3 Methoden	32
3.1 Zellkultur	32
3.1.1 Arbeitsbedingungen und Kultivierung der Zellen	32
3.1.2 Anzucht der Keloidfibroblasten.....	32
3.1.3 Splitten, Passagieren	33
3.1.4 Auftauen der Zellen	33
3.1.5 Einfrieren der Zellen	34
3.1.6 Experimente zur Zellproliferation.....	34

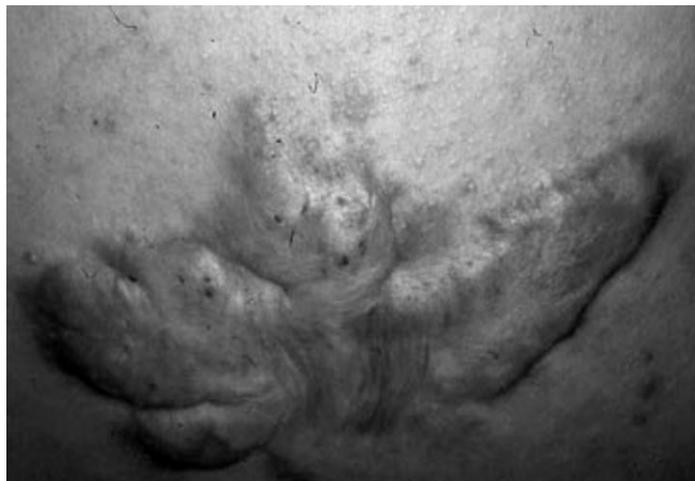
3.1.6.1	Resazurin-Assay.....	34
3.1.6.2	Zellzahlbestimmung im 6-Well-Plattensystem	35
3.1.6.3	Dehnversuch	35
3.1.6.4	Experimente unter dem Einfluss von Botulinumtoxin A.....	37
3.1.6.4.1	Resazurin-Assay mit Botulinumtoxin A.....	37
3.1.6.4.2	Inkubation mit Botulinumtoxin A im 6-Well-Plattensystem.....	38
3.1.7	Mikroskopfotographie	39
3.2	Expressionsanalyse.....	39
3.2.1	Proteinexpressionsanalyse.....	39
3.2.2	Genexpressionsanalyse.....	40
3.2.2.1	RNA-Isolierung (Quiagen RNeasy Mini)	40
3.2.2.2	Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	41
3.2.2.3	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	42
3.3	Statistische Auswertung.....	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Proliferation	43
4.1.1	Resazurin-Assay	43
4.1.2	Zellzahlbestimmung im 6-Well-Plattensystem.....	44
4.1.3	Dehnversuch.....	45
4.1.4	Zellproliferation unter dem Einfluss von Botulinumtoxin A	46
4.1.4.1	Resazurin-Assay.....	46
4.1.4.2	6-Well-Plattensystem	51
4.2	Proteinexpression.....	55
4.2.1	Basale Expressionswerte	55
4.2.1.1	Interleukin 6 (IL-6).....	55
4.2.1.2	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	56
4.2.2	Proteinexpression nach mechanischer Dehnung	56
4.2.2.1	Interleukin (IL-6).....	56
4.2.2.2	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	57
4.2.3	Proteinexpression nach Inkubation mit Botulinumtoxin A.....	58
4.2.3.1	Interleukin 6 (IL-6)	58
4.2.3.2	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	61
4.2.3.3	Transforming growth factor β_1 (TGF- β_1).....	65

4.3 Genexpression	68
4.3.1 Basale Werte	68
4.3.1.1 Interleukin 6 (IL-6)	69
4.3.1.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)	69
4.4 Digitale Fotografien der Zellen	70
5 Diskussion	73
5.1 Wachstumsverhalten der Zellen	73
5.1.1 Betrachtung des Wachstumsverhaltens von Keloidfibroblasten gegenüber normalen Fibroblasten.....	73
5.1.2 Wachstumsverhalten von Keloidfibroblasten und normalen Fibroblasten nach mechanischer Belastung	75
5.1.3 Wachstumsverhalten nach Inkubation mit Botulinumtoxin A	78
5.2 Proteinexpression und Genexpression	81
5.2.1 Basale Expression auf Proteinebene und Genniveau bei normalen und Keloidfibroblasten.....	81
5.2.1.1 Interleukin 6 (IL-6)	81
5.2.1.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)	83
5.2.2 Expression von IL-6 und VEGF nach mechanischer Belastung.....	85
5.2.3 Proteinexpression nach Inkubation mit Botulinumtoxin A.....	87
5.2.3.1 Interleukin 6 (IL-6)	87
5.2.3.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)	88
5.2.3.3 Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1).....	89
5.3 Digitale Fotografien der Zellen	91
6 Zusammenfassung	93
7 Literaturverzeichnis	94
8 Anhang	102
8.1 Verzeichnis der Tabellen	102
8.2 Verzeichnis der Abbildungen	102
8.3 Verzeichnis der Abkürzungen	105
8.4 Danksagung	107
8.5 Lebenslauf	108

1 Einleitung

1.1 Allgemeines Erscheinungsbild eines Keloids

Narben jeglicher Form repräsentieren das Ergebnis eines Wundheilungsprozesses und können je nach Art und Ausprägung Zeichen einer physiologischen oder gestörten Wundheilung sein [1, 2]. Die nachfolgende Dissertation befasst sich mit einer speziellen Narbenausprägung, dem Keloid (Abb. 1). Aus klinischer Sicht handelt es sich bei Keloiden um gutartige, fibroproliferative Hauttumore, die eine progressive Form der gestörten dermalen Wundheilung darstellen und bisher nur beim Menschen beobachtet werden konnten [3, 4]. Als überschießende Narbenmassen infiltrieren sie durch Überschreitung der ursprünglichen Begrenzung der Wunde [5] das gesunde Nachbargewebe innerhalb Epidermis und Dermis [3, 6] und zeigen in der Regel keine Tendenz zur spontanen Rückbildung [7-9].



▲ Abb. 1: Beispiel für das klinische Erscheinungsbild eines Keloids: Aknekeloid an der Schulter [10].

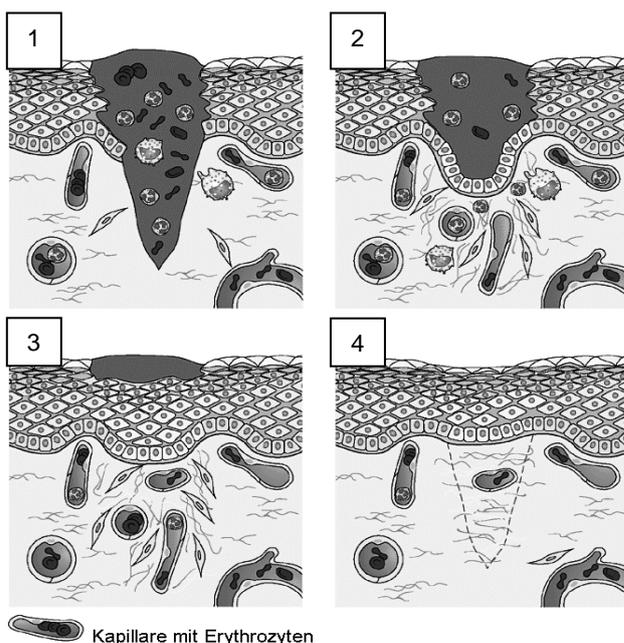
Erstmals beschrieben wurde diese Narbenform im 17. Jahrhundert v. Chr. im „Edwin Smith Papyrus“ im Sinne einer überschießenden Wundheilung [11]. In der 45. Fallbeschreibung werden hier unregelmäßige, tumoröse Wucherungen einer geheilten Wunde erwähnt, welche keine Entzündungszeichen und als Schlussfolgerung daraus keine Wundinfektion aufweisen. Die Prägung des wissenschaftlichen Fachbegriffes „*Cheloide*“ erfolgte allerdings erst im Jahre 1816 durch Jean-Louis-Marc Alibert. Er leitete diesen Terminus vom griechischen

Wort „*chele*“ (= Krebssschere) ab und verwies somit bei seiner Beschreibung des tumorösen, aber benignen Narbenwachstums auf die Ähnlichkeit der Narbenausläufer mit der Form einer Krebssschere [12]. 1854 führte Thomas Addison wiederum die Differenzierung einer spontan aufgetretenen von einer sich posttraumatisch einstellenden Wundheilungsstörung ein. Er wählte hierfür die Bezeichnungen „echtes“ und „falsches Keloid“ [13]. Die bis heute gebräuchliche Unterscheidung zwischen Keloid und hypertropher Narbe basiert auf histologischen und klinischen Merkmalen. Sie erfolgte erstmals 1962 durch Mancini und wurde im Jahre 1970 durch Peacock bestätigt [14]. Die Unterscheidungskriterien dieser beiden Narbenformen werden unter 1.3.2 näher behandelt.

Neben dem Risiko unkontrollierten Wachstums können die zum Teil schmerzhaften und juckenden Keloide auch aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit in den betroffenen Gewebsarealen und durch die damit verbundenen funktionellen, sowie kosmetischen Einschränkungen eine große Belastung für die Patienten darstellen [9]. Keloide gehen zwar teilweise in eine Ruhephase über und zeigen in dieser Zeit kein weiteres Wachstum, gleichzeitig aber auch keine Rückbildung des Narbengewebes [15-17]. Während ihrer Überschreitung des ursprünglichen Wundareals breiten sie sich sowohl in vertikaler als auch in horizontaler Richtung aus [18]. Die Richtung ihres horizontalen Wachstums resultiert hierbei in charakteristischen Formen mit Abhängigkeit von der jeweiligen Narbenlokalisation. So weisen Keloide im Brustbereich eine eher krebsscherenartige Form auf, an der Schulter zeigen sie hingegen schmetterlings- oder hantelförmige Wucherungen [18]. Man unterscheidet im Allgemeinen zwischen einer leichten und einer schweren Form. Handelt es sich um eine leichte Ausprägung, zeigt sich beim Patienten eine umschriebene, juckende Narbe mit Erstreckung über das gesunde Gewebe hinaus. Diese kann sich noch bis zu ein Jahr nach der Verletzung entwickeln und weist keine Rückbildungstendenz auf. Schwere Formen sind relativ groß und mehr als 0,5 cm erhaben, ebenfalls meist schmerzhaft oder juckend, mit Ausbreitung in das gesunde Gewebe. Ihre Ausdehnung kann noch über Jahre hinweg fortauern [19]. Grundsätzlich stellen Keloide bis heute eine große Herausforderung für den behandelnden Arzt dar. Trotz einer großen Vielfalt an Therapieoptionen existiert noch keine definitiv wirksame, nebenwirkungs- oder rezidivfreie Therapieform. Sowohl die große Bandbreite therapeutischer Möglichkeiten als auch die Unfähigkeit, ein standardisiertes Verfahren zur effektiven Keloidbehandlung zu identifizieren, spiegeln das eingeschränkte Verständnis des genauen Pathomechanismus sowie der molekularen Zusammenhänge dieser Wundheilungsstörung wieder [10]. Wichtige Voraussetzung zur Erforschung der Keloidentstehung und deren effizienter Therapie ist ein genaues Verständnis der Prozesse im Rahmen der physiologischen Wundheilung.

1.2 Physiologische Wundheilung

Eine Verletzung der Haut führt unter normalen Umständen zum unmittelbaren Einsetzen der physiologischen Wundheilung. Über Aktivierung einer komplexen Kaskade von überwiegend zytokingesteuerten, strukturierten Abläufen führt sie zum vollständigen Verschluss des Defekts sowie zur Wiederherstellung der Funktionalität der beschädigten Region durch Vernarbung in Verbindung mit Epithelialisierung [3, 16]. Dieses Geschehen kann in verschiedene, ineinandergreifende Phasen unterteilt werden (Abb. 2). Man unterscheidet die Exsudation, welche in Hämostase und Entzündungsreaktion unterteilt werden kann, sowie die Phasen der Proliferation und des Remodellings [8, 20, 21]. Diese Vorgänge können sowohl überlappend als auch synchron in einer Wunde stattfinden [16].



1) Hämostase:

> Auffüllen des Wundspalts durch Exsudation von Blutbestandteilen mit koaguliertem Blut und Fibrinbestandteilen

2) Entzündung bzw. resorptive Phase:

> Resorption des Blutkoagels durch Exsudatmakrophagen des dermalen Bindegewebes
> gleichzeitig Migration des basalen Epithels zwischen Blutschorf und Granulationsgewebe

3) Proliferation:

> Bildung von Narbengewebe aus Granulationsgewebe; zudem Erneuerung des Plattenepithels an der Oberfläche durch Proliferation vom basalen Epithel aus

4) Remodelling:

> Wunde schließt sich allmählich und zieht sich zusammen, eine Narbe entsteht
> letztlich ausdifferenziertes Plattenepithel an der Oberfläche, in der Tiefe gefäßarme Narbe
> Phase kann bis zu 1 Jahr lang dauern

▲ **Abb. 2: Phasen der Wundheilung am Beispiel einer Hautwunde (modifiziert nach Roche Lexikon Medizin, Urban & Fischer, 2003 [22]).**

Die ideale Narbe sollte einer feinen Linie ähneln, welche sich möglichst kaum vom gesunden Umgebungsgewebe bezüglich Pigmentierung, Niveau und Stabilität unterscheidet [8]. Allerdings kann Narbengewebe letztendlich hinsichtlich seiner Endfestigkeit maximal Werte von 80% der gesunden Haut erreichen [2]. Eine *restitutio ad integrum* ist nur während der

Embryonalentwicklung möglich [23]. Insgesamt wird im Laufe dieser Vorgänge zellreiches und matrixarmes Ausgangsgewebe durch zellarmes, matrixreiches Gewebe ersetzt [3]. Die Narbenbildung wird grundsätzlich von einer Vielzahl exogener und endogener Faktoren beeinflusst. Unter anderem spielen Lokalisation, zugrundeliegende Pathogenese, das operative Vorgehen des Chirurgen, Einwirkung von Zugkräften und Spannung auf die Wundränder sowie mögliche Wundinfekte eine entscheidende Rolle. Gleiches gilt für Hauttyp, Alter oder Lebenswandel des Patienten [8, 16].

Auf zellulärer Ebene stellen dermale Fibroblasten, deren Integrine und die umgebende Extrazellulärmatrix entscheidenden Faktoren dar. Ein Gleichgewicht zwischen diesen Bestandteilen ist Voraussetzung für eine regulär ablaufende Wundheilung [3]. Des Weiteren sind Endothelzellen, Thrombozyten und Keratinozyten für den komplexen Ablauf bedeutend [21]. Die dominierende Zelle des Narbengewebes ist der Fibroblast. Er ist verantwortlich für die Kollagensynthese und die Bildung wichtiger Bestandteile der Extrazellulärmatrix, unter anderem auch von Enzymen, welche in die reparative Phase involviert sind [8]. Die Steuerung von Migration, Morphologie sowie Differenzierung der Zellen oder auch die Strukturierung des Zytoskeletts erfolgt wiederum über die Extrazellulärmatrix [24]. Die Kontakte und der Informationsaustausch zwischen den Fibroblasten und der umgebenden Matrix, sowie die Kommunikation der Zellen untereinander wird mittels Integrinen ermöglicht [3, 25, 26]. Es handelt sich bei ihnen um Zelladhäsionsrezeptoren, genauer um Heterodimere, welche aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind und auf der Oberfläche von Bindegewebszellen exprimiert werden. Man unterscheidet bisher drei β -Untereinheiten, $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$. Über nonkovalente Bindungen mit unterschiedlichen α -Untereinheiten erhält man letztlich eine Gruppe von 22 verschiedenen Intergrinen [27]. Durch ihre transmembrane Architektur sind sie befähigt als Kommunikationsbrücke zwischen Zellen und Matrix zu fungieren. Denn neben einer extrazellulären besitzen sie auch eine zellinterne Einheit [25]. Beim so ermöglichten Informationsfluss wird allgemein zwischen „*outside-in signaling*“, mit Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade über Bindung eines spezifischen Liganden an entsprechende Heterodimere, und „*inside-out signaling*“ unterschieden. Auf dem „*inside-out*“-Weg können wiederum Zellen Einfluss auf die Rezeptoraffinität oder Konformation von Integrinen nehmen und letztlich eine Änderung auf Ebene des zellulären Phänotyps oder der Matrixzusammensetzung herbeiführen [25, 26]. Zu der Gruppe der auf Fibroblasten exprimierten Integrinen gehören unter anderem $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$. $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ gelten als wichtigste Kollagenrezeptoren dermalen Fibroblasten und werden in einer kollagenreichen Matrix verstärkt exprimiert [24, 26, 28]. Die Integrinexpression selbst steht

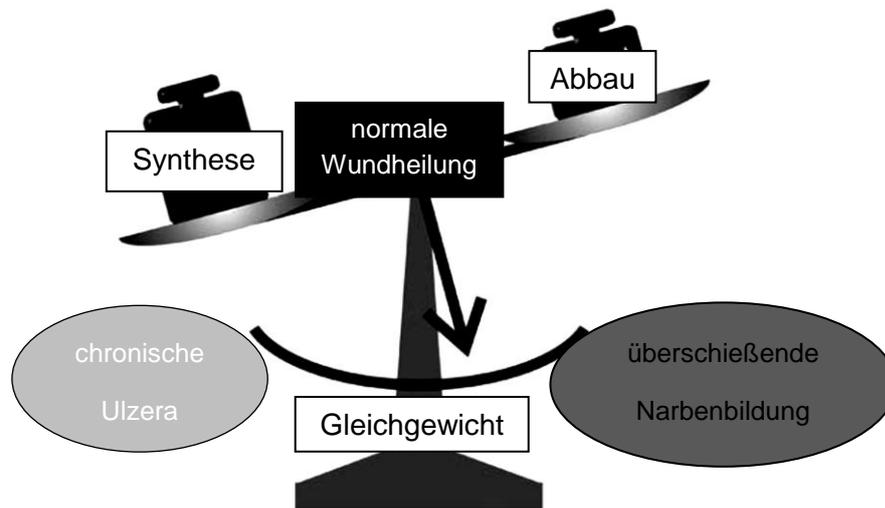
unter dem Einfluss von Zytokinen, unter anderem dem *transforming growth factor* β (TGF- β). Er spielt eine Schlüsselrolle als Wachstumsfaktor mit Einfluss auf Beginn und Beendigung der Gewebereparatur [29]. Weitere entscheidende Faktoren sind beispielsweise der *platelet-derived growth factor* (PDGF), der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder die Interleukine, u.a. IL-1, IL-6 oder IL-8. Die Synthese der verschiedenen Wachstumsfaktoren erfolgt durch Zellen wie die Thrombozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Keratinozyten. Diese Proteine können unterteilt werden in Kompetenz- und Progressionsfaktoren. Erstere mobilisieren Zellen aus der Ruhephase, Progressionsfaktoren hingegen induzieren in der Zielzelle einen neuen DNA-Syntheszyklus [21]. Die Fibroblasten werden insbesondere durch PDGF, TGF- β und Zytokine Richtung EZM gelockt [21]. Die Fibroblastenbewegung erfordert allerdings freie Zonen. Diese werden durch ein aktiviertes fibrinolytisches System erzeugt, dessen Enzyme mononukleären Makrophagen und Fibroblasten entstammen: Plasminogen-Aktivator, interstitielle Kollagenase (MMP-1), Gelatinase (MMP-2) und Stromelysin (MMP-3) [30]. Durch die MMP-1-Kollagenase besteht auch noch nach Jahrzehnten die Möglichkeit der Umstrukturierung der Kollagenfasern im Narbengewebe. Man bezeichnet diesen Prozess als *Remodelling*. Hierfür ist ein stabiles Gleichgewicht zwischen den MMPs und deren Inhibitoren, den Gewebe-Metalloproteinaseinhibitoren (TIMP=*tissue inhibitor of metalloproteinases*), erforderlich [31].

Zusammenfassend erfährt im Laufe der Wundheilung und Narbenbildung das ehemals noch zellreiche, matrixarme Mesenchym eine Umstrukturierung zu zellarmem und matrixreichem Narbengewebe mit hohem Anteil an Kollagen Typ I. Dies findet unter Austausch von Strukturproteinen wie Kollagen Typ II oder Fibronectin gegen extrazelluläre Matrixmoleküle statt [3].

1.3 Gestörte Wundheilung

Eine Störung des Gleichgewichts zwischen den oben genannten Faktoren der physiologischen Wundheilung und deren Reparaturmechanismen kann zwei pathologische Extreme zur Folge haben: chronische Wunden - wie z.B. Ulzera nach adjuvanter Strahlenbehandlung – oder überschießende Narbenbildungen (Abb. 3). Zur zweiten Gruppe werden hypertrophe Narben und Keloide gerechnet [3, 8]. Es handelt sich um Maximalvarianten einer gestörten dermalen Wundheilung, welchen vor allem eine

Dysbalance zwischen Synthese und Abbau der Extrazellulärmatrix zugrunde zu liegen scheint [8, 32, 33].



▲ **Abb. 3: Auswirkungen einer Störung zwischen Synthese und Abbau der Extrazellulärmatrix,** Maximalvarianten derartiger Störungen können Hautulkus oder hypertrophe Narbe und Keloid darstellen [32, 33] (modifiziert nach [33]).

Im Laufe der Wundheilungsprozesse und je nach Dominanz der verschiedenen, einflussnehmenden Faktoren können unterschiedliche Narbenformen entstehen, physiologischer als auch pathologischer Natur.

1.3.1 Narbenarten

Die Narbenbildung wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und resultiert im Idealfall in einer feinen Linie. Zur Einteilung und Klassifizierung der möglichen Narbenarten und deren Varianten wurden im Verlauf der letzten Jahre zahlreiche Systeme vorgeschlagen [34-37]. Die Klassifizierung nach der „*Vancouver Scar Scale*“ findet unter ihnen heute die meiste Verwendung (Tab. 1) [38, 39]. Unterschieden werden die reife, unreife und hypertrophe Narbe sowie das Narbenkeloid [19, 38, 40-42].

Bei der reifen Narbe handelt es sich um eine helle, flache Narbe. Sie ist schmerzlos und erfordert keine Therapie. Die unreife Narbe hingegen ist leicht erhaben, rot, gelegentlich juckend oder schmerzhaft. Bei der unreifen Form wird im Laufe der Zeit oftmals eine normale

Ausreifung und Abflachung sowie Anpassung der Pigmentierung an die umgebende gesunde Haut beobachtet [19]. Sie zeigt darüber hinaus keine Wachstumstendenz und erfordert primär keine Therapie [16].

<u>Narbenformen</u>				
physiologisch	Formen der Wundheilungsstörung			
reife Narbe	hypertrophe Narbe		Keloidnarbe	
unreife Narbe	linear	großflächig	leichte Form	schwere Form

▲ Tab. 1: Einteilung der Narbenformen nach der *Vancouver Scar Scale*.

Folglich stehen das Keloid und die hypertrophe Narbe im Zentrum der Narbentherapie [16]. Die hypertrophe Narbe lässt sich bezüglich ihrer Ausdehnung in linear oder großflächig unterteilen, das Keloid wiederum in eine leicht oder eine schwere Form [19].

1.3.2 Unterschiede zwischen Keloid und hypertropher Narbe

Die Begriffe „hypertrophe Narbe“ und „Keloid“ werden heute teilweise immer noch als Synonyme verwendet. Das kann letztlich in Verbindung mit fehlerhafter klinischer Identifizierung und Diagnosestellung zu einem falschen Therapiekonzept führen. Besonders zwischen diesen beiden Narbenerscheinungen existieren zahlreiche klinische, pathologische und biochemische Unterschiede, die die Verschiedenheit der beiden Läsionen betonen [1, 15].

Im Falle der hypertrophen Narbe beginnt der Wundheilungsprozess zunächst mit normaler Narbenformierung. Die Bildung neuer Matrix dauert jedoch länger an und führt zu zunehmenden morphologischen und biochemischen Abweichungen. Ausgelöst wird sie meist durch ein Trauma der Haut oder einen chirurgischen Eingriff. Das Erscheinungsbild der hypertrophen Narbe zeigt sich in der Regel pink oder gerötet, oftmals juckend. Allerdings

beschränkt sie sich in ihrer Ausdehnung auf die Begrenzungen der ursprünglichen Wunde, ohne das gesunde Umgebungsgewebe zu infiltrieren [14, 43]. Gewöhnlich wird das Auftreten einige Wochen nach der Verletzung beobachtet. Die Zeitabläufe sind erheblich verlängert im Vergleich zur regulären Narbenbildung [8]. Nach einem raschen Größenwachstum folgt eine Ruhesequenz, die anschließend spontan in eine Phase der Rückbildung übergeht [1, 19]. Der gesamte Reifungsprozess kann sich über einen Zeitraum von bis zu zwei Jahren erstrecken [8]. Keloide hingegen folgen nicht diesem Schema aus Gewebsbildung, Ruhephase und Rückbildung. Sie können unmittelbar nach dem auslösenden Ereignis auftreten, gleichsam aber auch erst nach Jahren aus einer reifen Narbe entstehen [8]. Obwohl die Gewebsreaktion bei den Keloiden nicht die gleiche Intensität aufweist, wie sie in hypertrophen Narben beobachtet werden kann, übertreffen sie diese dennoch durch ihre kontinuierliche Proliferation und unregulierte Weiterentwicklung hinsichtlich Wachstum und Größe [11, 43-45].

Zu den wesentlichen Unterscheidungskriterien gehört zum einen das bereits erwähnte Wachstumsverhalten. Im Gegensatz zum Keloid beschränkt sich die Ausbreitung der hypertrophen Narbe auf die ursprüngliche Begrenzung der Wunde. Des Weiteren ist die Inzidenz bei der hypertrophen Narbe wesentlich höher als beim Keloid. Nach zwei Jahren ist bei der hypertrophen Narbe zudem eine langsame und meist spontane Rückbildung zu erwarten. Darüber hinaus zeigt sie keine Assoziation mit einem Hauttyp und kann in jedem Bereich des Körpers lokalisiert sein [16]. Keloide hingegen scheinen bevorzugt an Stellen erhöhter Mobilität oder Hautspannung aufzutreten, wie etwa im Brustbereich, der suprapubischen Region oder dem Oberarm [46]. Nach der Exzision hypertropher Narben kommt es in der Regel nicht zur Rezidivbildung. Bei Keloiden stellt diese jedoch oftmals die wesentliche Problematik in der Therapie dar.

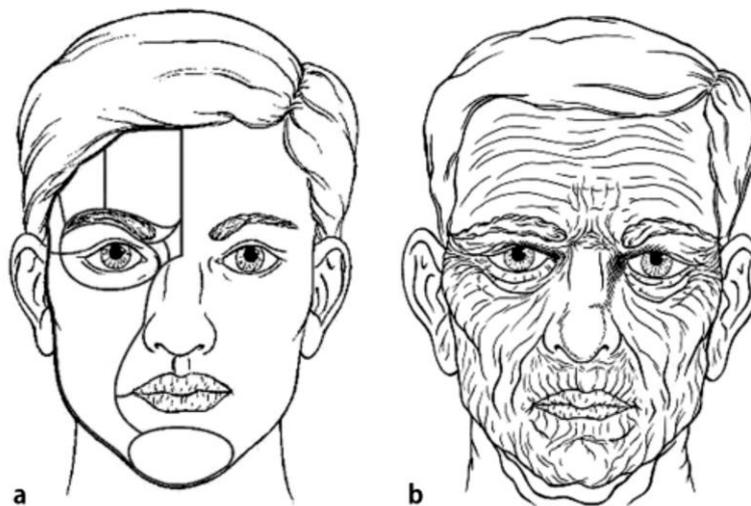
Um das Risiko dieser extremen Formen der Narbenbildung für den Patienten schon im Vorfeld möglichst gering zu halten, empfiehlt es sich, verschiedene präventive Maßnahmen zu ergreifen.

1.3.3 Präventive Maßnahmen zur Narbenvermeidung

Von grundlegender Bedeutung für eine komplikationsarme Wundheilung und ein minimales Risiko einer gestörten Narbenbildung sind eine optimale und schonende intraoperative

Gewebebehandlung [47-50] sowie die Beachtung der Hautspannungslinien. Die Existenz dieser Linien stellte Dupuytren bereits 1838 fest, ihre Bedeutung für die Chirurgie wurde aber erst 1907 durch Kocher erkannt [16]. Er war der Auffassung, dass eine optimale Narbenbildung nur dann möglich sei, wenn Inzisionen der Haut in den Verlauf dieser Linien gelegt würden [51, 52]. Heute spricht man hier von den RSTL, „*relaxed skin tension lines*“ (Abb. 4b). Als Linien minimaler Hautspannung verlaufen sie im Gesicht überwiegend im rechten Winkel zur mimischen Muskulatur [53]. Neben den RSTL sollten auch immer die ästhetischen Untereinheiten (Abb. 4a) bei der Schnittführung im Gesichtsbereich berücksichtigt werden [16]. Diese wurden von Gonzales-Ulloa erstmals beschrieben und nachfolgend von Burget weiterentwickelt [54].

Ebenso von Bedeutung ist eine atraumatische Operationstechnik. Neben Vermeidung einer Infektion der Wunde sollte bei der Behandlung auf eine gründliche Blutstillung geachtet werden. Darüber hinaus ist für einen regelrechten Wundheilungsprozess unter Eversion der Wundränder immer eine sorgfältige Hautnaht [16] und eine präoperativ positive Nährstoffbilanz anzustreben [55].



▲ **Abb. 4:**
 a Ästhetische Einheiten („*aesthetic subunits*“)
 b Verlauf der RST-Linien („*relaxed skin tension lines*“) [56].

Für das postoperative Wundmanagement ist besonders der Verband entscheidend, um das Risiko einer Entzündungsreaktion durch Verletzung oder Infektion möglichst gering zu halten [57]. Optimale Feuchtigkeit für eine komplikationsarme Wundheilung wird durch einen Okklusionsverband ermöglicht [16]. Des Weiteren stellte sich heraus, dass Injektionen von

Botulinumtoxin A zur Reduktion der Wundspannung führten und so für eine Optimierung des Wundheilungsprozesses hilfreich sind [58, 59].

Trotz präventiver Maßnahmen kann das Risiko für die Ausbildung der fibroproliferativen Keloidnarbe jedoch nicht definitiv eliminiert werden, insbesondere da sich in der Bevölkerung unterschiedlich stark ausgeprägte Prävalenzen zeigen.

1.4 Entstehung eines Keloids

1.4.1 Ätiologie der Keloidbildung

Es gilt heute als gesichert, dass die entscheidenden Faktoren für die Ausbildung von Keloiden eine genetische Prädisposition und eine Traumatisierung der Haut sind [8]. Ein spezifisches Gen konnte zwar noch nicht identifiziert werden, allerdings ist bei Menschen dunkelhäutiger Herkunft ein 2- bis 19-fach erhöhtes Risiko zu beobachten [3]. Keloide entwickeln sich im Allgemeinen nach einer Verletzung oder Verbrennung der Haut und treten meistens im Laufe des Heilungsprozesses einer auf chirurgischem oder anderem Wege zugefügten Wunde auf [8]. Neben Inzisionen zählen Verbrennungen, Injektionen, Impfungen, Piercings, Tätowierungen oder auch Insektenstiche zu den adäquaten Traumata [2, 5, 8, 10]. Nicht selten ist eine Keloidbildung nach kutanen Entzündungen, bevorzugt nach Akne, zu beobachten [10]. Einige Patienten können nicht einmal von Verletzungen oder Verbrennungsgeschehnissen berichten. Das auslösende Ereignis wurde entweder vergessen oder gar nicht erst bemerkt. Dies spricht für die Eigenart des Keloids, teilweise erst nach einem langen, ereignislosen Zeitintervall zu entstehen [8].

1.4.2 Theorien zum Pathomechanismus

Der dermale Fibroblast scheint in der Keloidnarbe ebenso wie bei der physiologischen Narbenbildung eine entscheidende Rolle als Effektorzelle einzunehmen [3]. Keloidfibroblasten weisen eine gesteigerte Genexpression für Matrixkomponenten, wie Kollagen, Fibronectin oder Elastin, sowie für Zytokine auf. Bei diesen handelt es sich vor allem um die Wachstumsfaktoren TGF- β_1 und - β_2 („*transforming growth factors*“). Diese inhibieren den Kollagenabbau und ihre erhöhte Expression auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene führt zur Steigerung der Kollagensynthese und zur Matrixbildung [60]. Es

existieren zahlreiche Untersuchungen, die eine gesteigerte Sensibilität für TGF- β_1 in Keloidfibroblasten nachweisen konnten [7, 61, 62]. Zudem konnte durch Stimulation der Keloidfibroblasten mit TGF- β_1 eine bis zu 12-mal höhere Kollagenproduktion als bei normalen Fibroblasten und eine bis zu 3-mal höhere Produktion als bei hypertrophen Narben erreicht werden [63, 64]. Letztendlich konnte noch keine eindeutige Aussage dazu gemacht werden, ob die Keloidentwicklung als Folge vermehrter Kollagensynthese und Matrixvermehrung, eines verminderten Abbaus dieser Substanzen oder einer Kombination beider Mechanismen zu sehen ist [3]. Ein weiterer Aspekt der Einflussnahme von Fibroblasten auf die Keloidentwicklung könnte eine gestörte Apoptoserate sein [65, 66]. Diese wurde in Fibroblasten gesunder Haut und in Keloidfibroblasten untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass bei gesunden Fibroblasten eine doppelt so hohe Apoptoserate auftrat [67]. Sayah *et al.* untersuchten 64 für die Apoptose verantwortliche Gene in Keloiden und normaler Haut. Sie stellten eine deutlich geringere Expression bei 8 dieser 64 Gene in Keloiden fest. Daraufhin kamen sie zu der Schlussfolgerung, dass sich Keloidfibroblasten vermutlich dem programmierten Zelltod entziehen und so Unabhängigkeit von Apoptoseprozessen besitzen [68].

Ein anderer Überlegungsansatz bezieht sich darauf, dass das Einwirken mechanischer Spannung auf eine Wunde die Fibroblastenproliferation stimuliert und eine vermehrte Synthese und Ablagerung von Kollagen bewirkt. Bevorzugte Lokalisationen der Keloide sind Körperstellen hoher Gewebespannung [14, 69-71]. Das könnte auch eine Erklärung dafür liefern, dass Keloide zum Großteil bei jungen Menschen entstehen und bei älteren nur selten auftreten, da mit zunehmendem Alter die Haut eine vergleichsweise geringere Spannung aufweist [14, 72]. Allerdings existieren ebenso Prädilektionsstellen, die nicht mit dieser Theorie übereinstimmen und keine großen Zugkräfte im Gewebe zeigen [14]. Des Weiteren wird vermutet, dass Melanin und bzw. oder Melanozyten eine Rolle spielen könnten. Denn mit Zunahme der angeborenen Hautpigmentierung steigt auch die Inzidenz von Keloiden. Noch fehlen zu diesem Thema allerdings weiterführende Studien [73].

1.5 Prädispositionen für die Keloidbildung

Das Keloid stellt eine Form der Wundheilungsstörung dar, die bisher nur beim Menschen beobachtet werden konnte und dabei unter bestimmten Gegebenheiten gehäuft auftritt (Tab. 2). So sind Keloide in höherem Lebensalter eher selten zu erwarten. Bevorzugt

sind Patienten zwischen dem 10. und 30. Lebensjahr sowie in den Phasen von Pubertät oder Gravidität betroffen. Es besteht kein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung zwischen den Geschlechtern. Frauen wie Männer sind gleichermaßen betroffen [8, 74]. Allerdings ist die Inzidenz unter Dunkelhäutigen deutlich erhöht. Es scheint eine genetische Prädisposition für Keloidbildung bei Dunkelhäutigen zu bestehen [43, 75]. Darüber hinaus wurden bisher noch keine Keloidnarben bei Albinos beschrieben [16]. Eine genetische Prädisposition sowie eine familiäre Häufung werden zwar allgemein anerkannt, allerdings konnte bis heute weder ein spezifisches Gen noch eine Gengruppe identifiziert werden [3].

Bevorzugte Körperstellen für das Auftreten eines Keloids sind unter anderem Regionen mit erhöhter Gewebespannung. Hier sind besonders der obere Brustbereich, Deltoid, Rücken [14, 69-71], Schultern oder Hautareale über den Beugemuskeln der Extremitäten zu nennen. Aber auch an Ohrläppchen oder Wangen treten sie gehäuft auf [76], obwohl hier nur eine geringe Krafteinwirkung auf das Gewebe vorherrscht. Erhöhte Haut- oder Wundspannungen nach operativen Eingriffen können in diesem Sinne Risikofaktoren bei der Wundheilung darstellen, die das Auftreten eines Keloids begünstigen [1].

Risikofaktoren	
Kategorie	erhöhtes Risiko bei Zutreffen
Alter des Patienten	10-30 Jahre
Abstammung	dunkelhäutig
Familienanamnese	für Keloide positiv
Wundverhältnisse	erhöhte Haut- oder Wundspannung

▲ Tab. 2: Mögliche Risikofaktoren für Keloide.

1.6 Therapiemöglichkeiten und Prognose

Die Problematik des unvollständigen Verständnisses des genauen Pathomechanismus der Keloidenstehung spiegelt sich auch in der Vielfalt an Behandlungsmöglichkeiten wieder. Bis heute gibt es kein standardisiertes Verfahren, welches allgemeingültig Effektivität und zugleich Rezidivfreiheit bietet. Es finden sich chirurgische, konservative und zum Teil auch experimentelle Therapieansätze sowie Kombinationen der verschiedenen

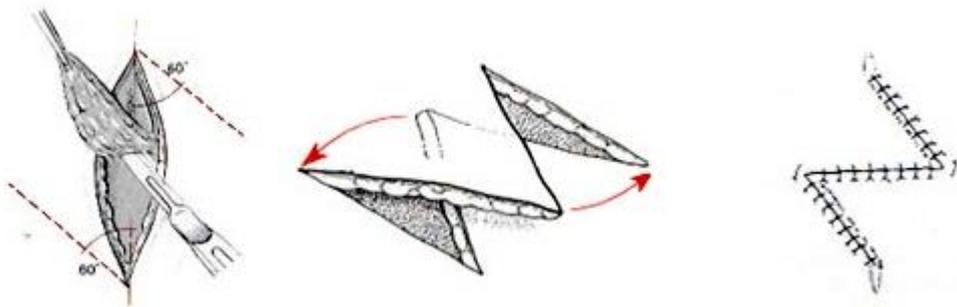
Behandlungskonzepte. Allerdings kann noch keine einheitliche Aussage hinsichtlich der Wirksamkeit der unterschiedlichen Therapieformen getroffen werden, da bis jetzt noch zu wenige evidenzbasierte Studien vorliegen [3]. Keloide erfordern therapeutische Maßnahmen, sobald sie symptomatisch werden oder kosmetisch einschränken [77]. Vor allem Größe, Volumen und Exophytie der Narbe sollen verringert werden, ebenso eventuell bestehende Erytheme oder funktionelle Einschränkungen. Auch die subjektiven Unannehmlichkeiten wie Jucken, Schmerzen oder Spannungsempfinden gilt es zu minimieren. Als Endergebnis wird ein kosmetisch ansprechendes Resultat bei möglichst geringer Rezidivquote angestrebt [78]. Der Patient muss hierbei immer darüber aufgeklärt werden, dass durch die Behandlung im besten Fall eine normale Narbe und nicht der Zustand vor der Keloidbildung erreicht werden kann [10].

1.6.1 Chirurgische Therapie

Ein alleiniges operatives Verfahren in der Keloidbehandlung ist zwar eine schnelle und verhältnismäßig einfache Lösung, es kann jedoch mit einem erhöhten Risiko für Rezidivbildungen assoziiert sein. Es entstehen oftmals neue Narbengebilde mit noch größerer Ausprägung. Die Rezidivraten liegen dabei zwischen 45 und 100%. Eine Keloidtherapie unter rein chirurgischen Gesichtspunkten sollte daher stets sehr zurückhaltend durchgeführt werden [10].

Die primäre Narbenexzision mit direktem Wundverschluss stellt die einfachste Variante der operativen Narbenkorrektur dar. Wie alle Narbenexzisionen sollte sie möglichst an einer reifen Narbe durchgeführt werden [49]. Das Narbengewebe wird entfernt und anschließend ein Vorschubklappen gebildet, um möglichst spannungsfreie Wundränder zu erhalten [73]. Man unterscheidet zudem die extramarginale Exzision, mit kompletter Entfernung des Narbengewebes, von der intramarginalen Variante. Letztere erzielt deutlich bessere Ergebnisse hinsichtlich der Rezidivquote. Die Exzisionsnarbe liegt dabei innerhalb der Keloidgrenzen [10, 73]. Bei kleineren Keloiden ist auch eine Z-Plastik denkbar (Abb. 5). Es handelt sich hierbei um die Transposition zweier Dreieckslappen mit insgesamt drei gleichlangen Schenkeln, die jeweils im Winkel von 60° zueinander angeordnet sind. Das Resultat ist die Verlängerung einer verkürzten Strecke auf Kosten der Breite. Die Narbe wird also länger, aber auch unauffälliger. Begründung hierfür ist die so entstandene

Unterbrechung der Narbe und die Ausrichtung einzelner Schenkel des „Z“ in die Hautfaltenlinien [73].



▲ Abb. 5: Durchführung der Z-Plastik in 3 Schritten [79].

Eine weitere chirurgische Variante ist der 2004 von Kim *et al.* beschriebene „*Fillet-Lappen*“ (Abb. 6) [80]. Ohne Kontinuitätsunterbrechung wird die Haut über dem Keloid als Lappen angehoben. Nach anschließender Keloidentfernung werden die Hautlappen wieder miteinander vernäht. Auf diesem Weg wird kein Hauttransplantat zur Deckung benötigt und es liegen keine Wundflächen frei. Nach dieser Vorgehensweise wurden 9 Keloide von den Autoren behandelt, mit dem Ergebnis, dass 34 Monate nach dem operativen Eingriff alle Lappen noch vital und gut durchblutet waren [80].



▲ Abb. 6: Keloid am Ohrläppchen vor (links) und nach Therapie durch *Fillet-Lappentechnik* (rechts) [73].

1.6.2 Konservative Therapie

Seit Mitte der 1960er-Jahre setzt man intraläsionale Kortikosteroide bei Keloiden ein. Sie zählen inzwischen zu den am besten etablierten konservativen Therapieoptionen. Am häufigsten wird Triamcinolonacetonid verwendet und streng intraläsional injiziert, wobei die besten Therapieerfolge bei noch aktiven, hellroten Keloiden beobachtet wurden. Die Ansprechrate liegt in diesen Fällen bei ca. 50-100%, Rezidive finden sich bei etwa 9-50% der Patienten. Durch Injektion der Kortikosteroide kommt es zur Hemmung der Fibroblastenproliferation, die Kollagensynthese wird inhibiert und zusätzlich die Kollagenasenproduktion gesteigert. Gleichzeitig findet eine Reduktion der Konzentration der Kollagenaseninhibitoren statt. Als Nebenwirkungen sind die Schmerzhaftigkeit der Injektion, aber auch subkutane Atrophien, Teleangiektasien und Pigmentverschiebungen zu nennen [10, 73].

Ein weiteres Standardtherapieverfahren in der Keloidbehandlung ist die Kryotherapie [42, 60, 81]. Die einfache, kostengünstige und schnell durchführbare Therapieform eignet sich besonders bei aktiven, gut durchbluteten Keloidformen in jeder Altersklasse oder Lokalisation [10]. Als Kältemittel wird flüssiger Stickstoff verwendet. Der Therapieeffekt bei der Kältebehandlung wird vor allem durch Hemmung der Fibroblastenproliferation und der Kollagensynthese erzielt. Darüber hinaus scheint es unter dem Kälteeinfluss zu einer Differenzierung der Keloidfibroblasten zu normalen Fibroblasten zu kommen [82]. Bei den Keloiden wird speziell die Kontakttherapie eingesetzt, deren alleinige Anwendung in 51-74% der Fälle eine komplette Rückbildung bzw. deutliche Abflachung bewirkt [81, 82]. Zur Rezidivrate finden sich Werte zwischen 0% und 45%. Als Nebenwirkungen werden Gefrierschmerz während der Therapie und die häufige Blasenbildung mit anschließenden Erosionen am folgenden Tag genannt. Für eine effektive Therapie sind meist zwei bis acht Behandlungszyklen durchzuführen, mit ausreichenden Heilungsphasen zwischen den einzelnen Zyklen [10].

Eine Kompressionstherapie empfiehlt sich besonders zur Abflachung größerer Keloide oder zur Keloidprophylaxe. Als weiterführende Behandlung nach Keloidexzision erzielt sie ähnlich gute Ergebnisse wie durch eine postoperative Kortisoninjektion in mehreren Sitzungen [76]. Die Therapie wird meist in Form maßgeschneiderter Kompressionsbekleidung oder Ohrclips angewandt und führt wohl durch lokale Hypoxie zu einer Abnahme der Fibroblastenzahl und der interkollagenen Kohäsion, sowie zur Zunahme der Kollagenaseaktivität [83, 84].

Der Nutzen von Silikongelfolien ist eher fraglich. Auch von der aktuellen deutschen Leitlinie zur Therapie pathologischer Narben wird ihre Wirkung als ungenügend verifiziert aufgeführt [2]. Eine internationale Expertenkommission hingegen empfiehlt ihre Anwendung als *First-line*-Therapie von Keloiden [19]. Als Wirkmechanismus der Silikongelee bzw. -folien wird die Hydrierung des Gewebes bei Okklusion der Keloide vermutet [85]. Die der Narbengröße angepassten Folien müssen mindestens 12-24 h pro Tag über 6-12 Monate getragen werden. Ihre Erfolgsquote in der Keloidtherapie liegt etwa bei 40% [86]. Da diese Therapieform sowohl einfach anzuwenden als auch nichtinvasiv und schmerzfrei ist, eignet sie sich besonders zur Anwendung bei Kindern [73].

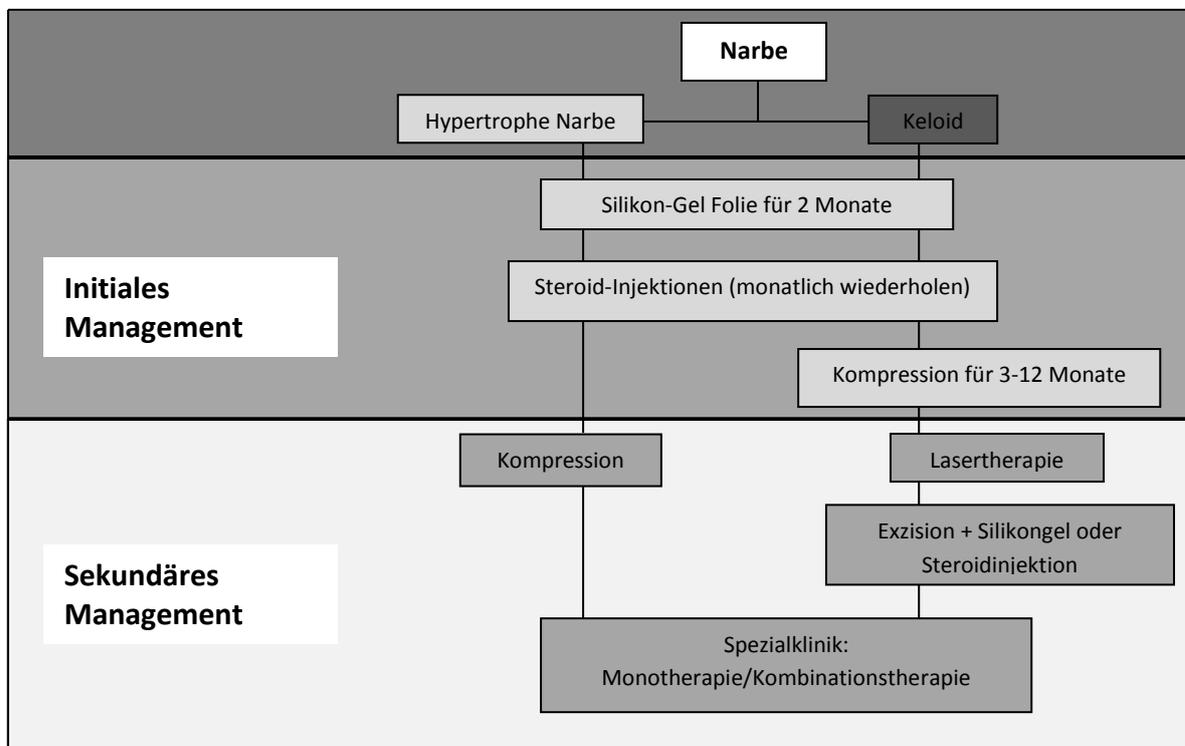
Mittels einer Radiotherapie kann die Fibroblasten- und Endothelzellproliferation gehemmt werden [73]. Sie findet als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Behandlungsformen Anwendung. Besonders gängig ist ihr Einsatz nach chirurgischer Exzision [60, 87, 88].

Des Weiteren werden verschiedene ablative und nichtablative Laser angewandt [89], unter anderem CO₂-Laser oder Farbstofflaser (FPDL) [10]. Auch der Einsatz von Botulinumtoxin A wird immer wieder kontrovers diskutiert. Es existieren Studien, in denen ein positiver Effekt auf Symptome wie Schmerzen oder eine Größenabnahme bei Keloidpatienten beschrieben wurde [77, 90]. Gleichermäßen gibt es Testreihen, die keine signifikanten Veränderungen der Keloide unter dem Einfluss von Botulinumtoxin A feststellen konnten [91]. Andere Konzepte beinhalten die Anwendungen von 5-Fluorouracil [92], Interferon- α , - β und - γ [93-95], Bleomycin [96] oder Kalzium-Kanal-Blockern [78, 97, 98]. Unter den Antihistaminika konnten besonders H₁-Rezeptor-Antagonisten eine Linderung des Juckreiz und Brennens bewirken [99-102]. Auch Therapien mit Penicillamin, β -Aminopropionitril und Colchicin wurden beschrieben [73, 103].

1.6.3 Stufenschema und Kombinationstherapien

Da sich noch keine der Therapieoptionen als standardisiert erwiesen hat, wurde ein Stufenschema für die Keloidtherapie von einer internationalen Expertenkommission vorgeschlagen (Abb. 7) [19]. Demnach werden bei frischen Keloiden keine aggressiven Behandlungsoptionen oder Kombinationstherapien empfohlen. Vielmehr wird die Anwendung

von Silikongelfolien und bzw. oder intraläsionalen Kortikosteroiden sowie einer Kompressionstherapie nahegelegt, falls diese möglich sein sollte.



▲ **Abb. 7: Internationales Stufenschema** (modifiziert nach Mustoe *et al.* [19]).

Am vielversprechendsten sind aber im Allgemeinen die Kombinationstherapien bei Einsatz von zwei oder mehreren Verfahren zur Steigerung der Wirksamkeit und Vermeidung von Rezidiven. Hier sind unter anderem die Kombinationen aus Exzision und Kortikosteroiden, CO₂-Laser und Kortikosteroiden, Exzisionen in Verbindung mit Kompressions-, Silikongel- oder Radiotherapie sowie CO₂-Laser-Anwendung zusammen mit Kryotherapie zu nennen. Auf diese Art können Heilungsraten von bis zu 80% erreicht werden [10]. Sinnvolle Grundlage jeder Keloidbehandlung ist zudem grundsätzlich ein offener Dialog zwischen Behandler und Patient über alle bestehenden und möglichen Therapieoptionen einschließlich deren Risiken. So wird dem Patienten die Entwicklung einer realistischen Erwartungshaltung gegenüber den Chancen und Erfolgsaussichten der einzelnen Behandlungsverfahren ermöglicht [4].

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten das Proliferationsverhalten und die Sekretion wundheilungsrelevanter Wachstumsfaktoren und Zytokine von patientenspezifischen Keloidkulturen auf zellulärer Ebene charakterisiert werden.

Ein Ziel der Arbeit war die Kultivierung der patientenspezifischen Keloidfibroblasten unter Standardbedingungen. Deren Proliferation und Proteinsyntheseleistung sollten beim Vergleich der Kulturen untereinander und gegenüber normalen dermalen Fibroblasten (NHF) analysiert werden. Da Keloide prinzipiell sehr unterschiedlich auf die diversen Therapieformen ansprechen und bei Patienten oftmals variierende Krankheitsverläufe beobachtet werden, sollte die zelluläre Charakterisierung dem genauen Verständnis der individuellen Schwankungen zwischen patientenspezifischen Proben dienen.

Des Weiteren wurde eine Darstellung des Einflusses mechanischer Krafteinwirkung in Form zyklischer Dehnung während der Kultivierung angestrebt. So sollte die Rolle dieses Faktors im Rahmen der Keloidpathogenese und eines komplikationsarmen Heilungsverlaufs nach Keloidexzision eruiert werden.

Als drittes Ziel sollte ermittelt werden, ob der therapeutische Effekt von Botulinumtoxin A in der Keloidbehandlung anhand patientenspezifischer Keloidgewebeproben auf zellulärer Ebene reproduzierbar ist und sich so eine positive Wirkung von Botulinumtoxin A in der Therapie begründen ließe. Ferner sollte analysiert werden, ob für die Wundheilung relevante Zytokine und Wachstumsfaktoren unter dem Einfluss von Botulinumtoxin A entscheidend moduliert werden.

2 Material

2.1 Zellkultur

Zellart	Herkunft
NHF	Bio Whittaker <i>Europe</i> , Verviers, Belgien
KF A, B, C	HNO-Universitätsklinik Mannheim, <i>Germany</i>
KF D, E, F, G, H	HNO-Universitätsklinik Regensburg, <i>Germany</i>

▲ Tab. 3: Verwendete Zellkulturen.

2.2 Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
NHF-Einfriermedium	50% DMEM/F-12 (1:1), 40% FKS, 10% DMSO
NHF-Nährmedium	89% DMEM/F-12 (1:1), 10% FKS, 1% P/S

▲ Tab. 4: Verwendete Medien.

2.3 Assays

Bezeichnung	Herkunft	Verwendung
ELISA Kit	R&D DuoSet human FGF basic: DY233 human ICAM-1/CD54: DY720 human IL6: DY206 human TGF β_1 : DY240 human VCAM-1/CD106: DY809 human VEGF: DY293B alles von R&D Systems, Minneapolis, USA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>

Bezeichnung	Herkunft	Verwendung
Reverse Transcription System	Invitrogen, Carlsbad, <i>California</i> , USA	Reverse Transkription
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, <i>Germany</i>	RNA Isolierung
<i>Syber Green Kit</i>	Invitrogen, Carlsbad, <i>California</i> , USA	qRT-PCR

▲ Tab. 5: Verwendete Assays.

2.4 Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Herkunft	Verwendung
Albumin bovine (BSA)	Fraktion V, Biomol, Hamburg, <i>Germany</i>	ELISA: <i>Reagent Diluent</i>
Botulinumtoxin A (Allergan)	1 IU pro 100 µl in PBS 1x Pharimex GmbH, Osnabrück, <i>Germany</i>	Zellkultur
0,4 M Citratpuffer	4,72 g Na-Citrat, 3,36 g Citronensäure-Monohydrat, 3,12 g MES, auf 40 g mit H ₂ O steril, alles von Roth, Karlsruhe, <i>Germany</i>	2x Urea Peroxid
Citronensäure-Monohydrat	Roth, Karlsruhe, <i>Germany</i>	0,4 M Citratpuffer
DMA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	TMB Stock
DMEM/F-12 (1:1)	Gibco, <i>life technologies</i> , Carlsbad, <i>California</i> , USA	Zellkultur: Nährmedium
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Zellkultur: Einfriermedium
FKS	Invitrogen, Carlsbad, <i>California</i> , USA	Zellkultur: Nährmedium
MES	Roth, Karlsruhe, <i>Germany</i>	0,4 M Citratpuffer
Na-Citrat	Roth, Karlsruhe, <i>Germany</i>	0,4 M Citratpuffer
PBS 10x	80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ , alles von Roth, Karlsruhe, <i>Germany</i>	ELISA: Waschpuffer, Verdünnung <i>Capture Antibody</i>
PBS steril	Dulbecco's PBS (1x), PAA (The Cell Culture Company) without Ca & Mg, Cölbe, <i>Germany</i>	Zellkultur: Spülung der Zellen
P/S	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Zellkultur: Nährmedium

Bezeichnung	Zusammensetzung/Herkunft	Verwendung
<i>Reagent Diluent</i>	1 % Albumin bovine (BSA) in PBS 1x filtriert 0,2 µm	ELISA: Blocken, Verdünnung <i>Detection Antibody</i> , Streptavidin
Resazurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Zellkultur
<i>Stop Solution</i>	10,32% H ₂ SO ₄ , 89,68% H ₂ O Merck, Darmstadt, <i>Germany</i>	ELISA
Streptavidin	0,5 % Streptavidin HRP in PBS 1x	ELISA
<i>Substrat Solution</i>	2 % TMB Stock in 1:1 Mischung von 2x Urea-Peroxid und H ₂ O	ELISA
TBABH	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	TMB Stock
TMB	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	TMB Stock
TMB Stock	120 mg TMB, 10 ml DMA, 21 mg TBABH (50 mM in DMA/TBABH)	ELISA: <i>Substrat Solution</i>
Trypsin	Invitrogen, Carlsbad, <i>California</i> , USA	Zellkultur
Tween20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	ELISA: Waschpuffer
Urea	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	2x Urea Peroxid
2x Urea Peroxid	38 mg Urea auf 40 ml Citratpuffer (0,4 M)	ELISA: <i>Substrat Solution</i>
Waschpuffer	0.05 % Tween20 in PBS 1x, pH 7,2-7,4	ELISA

▲ Tab. 6: Verwendete Chemikalien und Lösungen.

2.5 Sonstige Materialien

Bezeichnung	Herkunft
<i>Cedex Smart Slides</i>	Roche, Mannheim, <i>Germany</i>
Cups	Eppendorf, Hamburg, <i>Germany</i>
Dehnplatten Bioflex culture plates	<i>Flexcell international</i> , Hillsborough, <i>North Carolina</i> , USA
Falcon	Greiner <i>Bio-One</i> , Frickenhausen, <i>Germany</i>

Bezeichnung	Herkunft
Minisart-Filter	Sartorius, Göttingen, <i>Germany</i>
Glaspipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, <i>Germany</i>
Kryocups	Nalgene, Gehrden, <i>Germany</i>
MicroWell 96-Well-Platten, nunc™, serving life science	VWR International GmbH, Darmstadt, <i>Germany</i>
Multipipette Aufsätze	Eppendorf biopur, Hamburg, <i>Germany</i>
Neubauer Zählkammer 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Brand, Wertheim, <i>Germany</i>
Parafilm	Pechiney, Düsseldorf, <i>Germany</i>
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, <i>Germany</i>
Pipettenspitzen ep.T.I.P.S. Standard	Eppendorf, Hamburg, <i>Germany</i>
6-Well-Platten	Greiner <i>Bio-One</i> , Frickenhausen, <i>Germany</i>
BD Falcon-96-well <i>Cell Culture Plate</i>	BD Biosciences, San Jose, <i>California, USA</i>
Zellkulturflaschen	Greiner <i>Bio-One</i> , Frickenhausen, <i>Germany</i>

▲ Tab. 7: Verwendete Materialien.

2.6 Geräte

Bezeichnung	Herkunft
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus GmbH, <i>Thermo electron corporation</i> , Hanau, <i>Germany</i>
<i>Cedex XS Analyzer</i>	Innovatis von Roche <i>Applied Science</i> , Mannheim, <i>Germany</i>
Dehngerät	Entwicklung des Labors für plastische Gesichtschirurgie der Universität Regensburg, <i>Germany</i>
Fotoapparat: <i>Power shot G3 digital camera</i>	Canon, Tokio, Japan
<i>Laminar Flow</i> Werkbank Hera safe	Kendro, Hamburg, <i>Germany</i>

Bezeichnung	Herkunft
Mikroskop	Zeiss, Jena, <i>Germany</i>
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, <i>Germany</i>
Pipettus accu-jet ® pro	Brand, Wertheim, <i>Germany</i>
Stickstofftank (flüssig)	<i>Air Liquid Medical GmbH, Düsseldorf, Germany</i>
Tecan	Genios, Frankfurt am Main, <i>Germany</i>
Thermozykler MX 3005P	Stratagene, <i>California, USA</i>
Vortexer vortex-genie 2	<i>Scientific Industries, New York, USA</i>
Wasserbecken (37°C)	GFL, Burgwedel, <i>Germany</i>
Zentrifuge miniSpin	Eppendorf, Hamburg, <i>Germany</i>
Zentrifuge Rotina 35 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, <i>Germany</i>

▲ Tab. 8: Verwendete Geräte.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Arbeitsbedingungen und Kultivierung der Zellen

Die im Folgenden beschriebenen Experimente der Zellkultur wurden mit normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und Keloidfibroblasten (KF) unter sterilen Bedingungen an einer *Laminar-flow*-Werkbank durchgeführt. Alle Fibroblastenarten wurden in T75- und T125-Zellkulturflaschen mit 13 bzw. 25 ml NHF-Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Der Austausch des Nährmediums erfolgte alle 3 bis 4 Tage. Hierfür wurde das verbrauchte Medium unter Schonung des Zellrasens abgesaugt und durch das gleiche Volumen frischen Mediums ersetzt.

3.1.2 Anzucht der Keloidfibroblasten

Die Gewebeexplantate zur Anzucht der Keloidfibroblasten stammten von Patienten mit einzelnen oder mehreren Keloiden im Kopf- und Halsbereich und wurden von der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Regensburg (Prof. Dr. H. Gassner) und des Universitätsklinikums Mannheim (Prof. Dr. H. Sadick, Dr. G. Bran) zur Verfügung gestellt (Ethikvotum „Molekularbiologisches Eigenschaften von Keloiden und hypertrophen Narben“ (Nummer 10-101-0241, Ethik-Kommission Universitätsklinikum Regensburg), sowie „Untersuchungen zur Pathophysiologie von Keloiden bei Patienten mit Wundheilungsstörungen“ (2011-256N-M, Ethik-Kommission II Universitätsklinikum Mannheim)). Die Patienten wurden vor dem Eingriff um ihre Zustimmung gebeten, die Gewebe für die geplanten Untersuchungen verwenden zu dürfen. Zunächst wurde das Keloidgewebe nach operativer Exzision an der Klinik in physiologischer Kochsalzlösung unter Kühlung transportiert und sofort weiterverarbeitet. Unter sterilen Bedingungen wurde das Gewebe nach Spülung mit PBS mit einem Skalpell von Haut- und Fettgewebe getrennt und in 10 bis 20 mm große Stücke zerkleinert. Zur Anzucht der Primärkultur wurden diese Keloidproben in T 25-Flaschen mit 4 bis 5 ml NHF-Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle und Mediumwechsel nach jeweils drei bis vier Tagen wurde die Zelladhäsion der Keloidfibroblasten aus dem Gewebe am Flaschenboden und deren fortschreitende

Zellproliferation über mehrere Wochen beobachtet. Sobald eine ausreichende Fibroblastenansiedelung stattgefunden hatte, wurde das Keloidgewebe aus den Zellkulturflaschen entfernt. Die Keloidfibroblasten befanden sich nun in P0 und wurden nach Abtrypsinierung auf neue Zellkulturflaschen verteilt und weiterhin bei 37°C inkubiert.

3.1.3 Splitten, Passagieren

Nach dem Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% in den Zellkulturflaschen wurden die Zellen gesplittet und auf neue Flaschen aufgeteilt, um sie so in der optimalen Wachstumsphase zu halten.

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen danach mit ca. 15 ml PBS gespült. Nach gleichmäßiger Verteilung von 1 ml (T75) bzw. 2 ml (T125) Trypsin wurde die Flasche kurz bei 37°C inkubiert. Nach 2 bis 3 Minuten erfolgte eine mikroskopische Kontrolle, wonach das Trypsin mit 5 bis 10 ml NHF-Medium neutralisiert, die Flasche mehrmals mit dem Medium durchgespült und die Zellsuspension in ein steriles Falcon pipettiert wurde. 10 µl davon wurden mittels Neubauer-Zählkammer in 4 Quadraten ausgezählt: $\frac{\text{gezählte Zellzahl} \times 10\,000}{4}$

Ca. 400 000 Zellen wurden auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

3.1.4 Einfrieren der Zellen

Das Medium wurde abgesaugt und die Flasche mit PBS gespült. Die Zellen wurden mit 1 bis 2 ml Trypsin bedeckt und nach 2 bis 3 min Inkubation bei 37°C mit 5 bis 10 ml NHF-Medium abgespült. Dann wurde das Medium samt Zellen in ein steriles Falcon umgefüllt und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Im Anschluss wurden die Zellen im Falcon bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, der entstandene Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in NHF-Einfriermedium resuspendiert. Es folgte die Verteilung von 400 000 bis 500 000 Zellen in jeweils 1,5 ml Einfriermedium auf die Kryocups.

Die Cups wurden zunächst mittels einer Kryokonservierungsbox im -80°C Schrank platziert und am nächsten Tag in den Flüssig-Stickstofftank überführt, um den Einfrierprozess möglichst langsam zu gestalten.

3.1.5 Auftauen der Zellen

Die Cups mit den tiefgefrorenen Zellen wurden aus dem Stickstofftank möglichst zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, während zeitgleich je nach Flaschengröße 13 ml (T75) oder 25 ml (T125) NHF-Nährmedium in den Zellkulturflaschen vorgelegt und im Brutschrank angewärmt wurden. Der Inhalt der Cups wurde daraufhin auf die Flaschen verteilt und diese anschließend bei 37°C inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte am ersten Tag nach der Aussaat, die nachfolgenden in Abständen von 3 bis 4 Tagen.

3.1.6 Experimente zur Zellproliferation

Zur Untersuchung der Zellproliferation der verschiedenen Keloidfibroblasten im direkten Vergleich untereinander und zu NHF wurden die nachfolgenden Experimente durchgeführt. In den Versuchen wurden KF A, KF B, KF C, KF D, KF E, KF H und NHF ausgesät und Fibroblasten in den Passagen 3 bis 9 eingesetzt.

3.1.6.1 Resazurin-Assay

Die 96-Well-Platten für das Resazurin-Assay wurden immer doppelt angesetzt, um Messungen am 3. und 4. Versuchstag durchzuführen. Nach dem Absaugen des Mediums wurde mit PBS gespült und die Zellen anschließend abtrypsiniert. Nach Neutralisierung mit NHF-Medium wurden die Zellen darin möglichst vollständig in ein Falcon überführt und im Anschluss 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde dekantiert und das Zellepellet in 5 bis 10 ml Medium resuspendiert. Es folgte das Auszählen der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer oder am *Cedex XS Analyzer* und die Verdünnung der Zellsuspensionen. In den Experimenten wurden Konzentrationen von 20.000 bzw. 30.000 Zellen/ml eingesetzt. Alle Zelltypen wurden in den gleichen Konzentrationen ausgesät. Nach der Verdünnung wurden 100 µl der verschiedenen Zellsuspensionen für 8-fach Werte in die Wells der 96-Well-Platten pipettiert.

Nach Mediumwechsel am nächsten Tag wurden am 3. bzw. 4. Tag jeweils auf eine der Platten 10 µl Resazurin bei gedämmtem Licht unter der Sterilbank pipettiert und diese wieder

bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Zellviabilität zur Beurteilung des Proliferationsverhaltens erfolgte mittels Fluoreszenzmessung nach 3 h und 4 h am Tecan (*excitation wavelength* 545 nm, *emission wavelength* 590 nm).

3.1.6.2 Zellzahlbestimmung im 6-Well-Plattensystem

Die Zellproliferation wurde auch mittels 6-Well-Plattensystem untersucht. Das Abtrypsinieren, Zentrifugieren und Auszählen der Zellen erfolgte wie unter 3.1.6.1 beschrieben. Es wurden 40.000 Zellen in 2 ml auf jedes Well verteilt. Jeder Zelltyp wurde im Doppelansatz ausgesät. Danach wurden die Platten bei 37°C inkubiert.

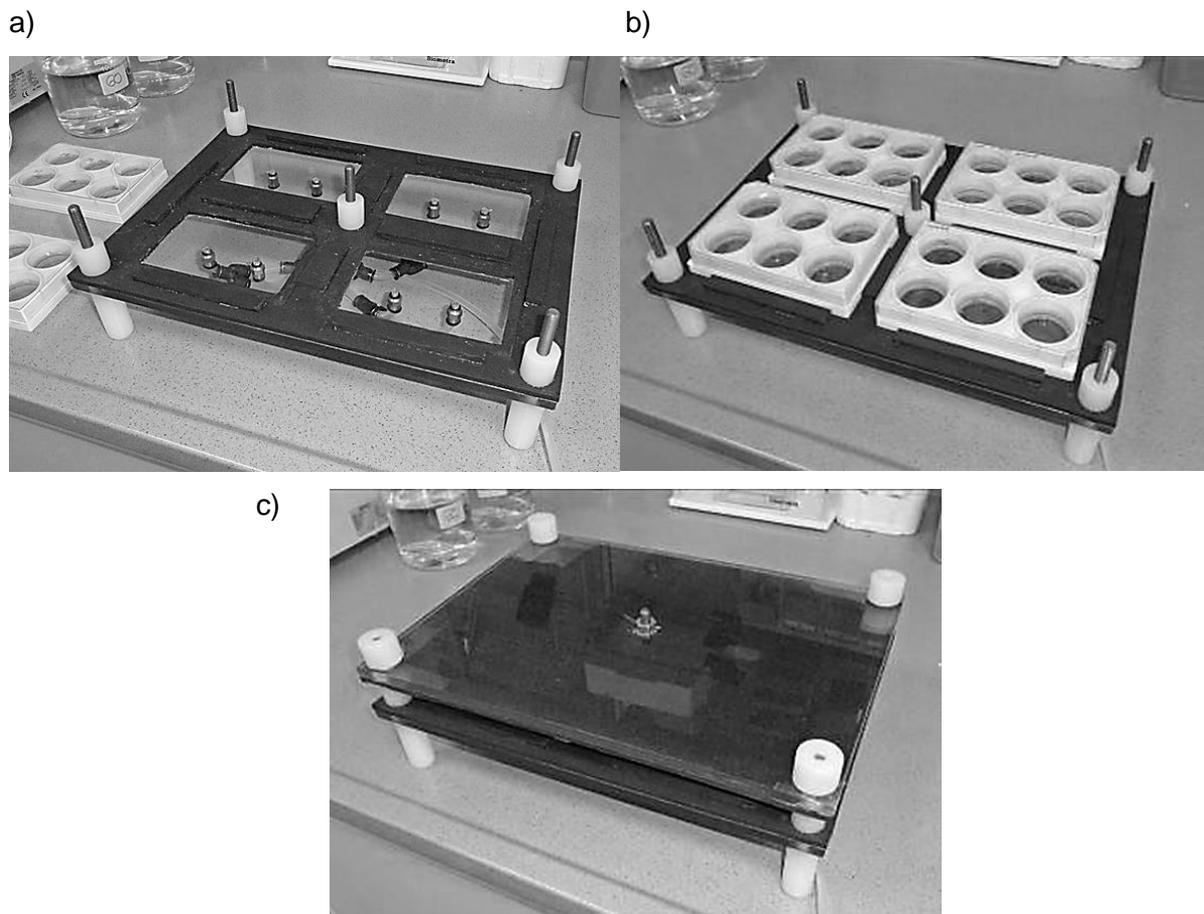
Am darauffolgenden Tag erfolgte der Mediumwechsel. In jedes Well wurden 2 ml frisches Medium pipettiert. Am 5. Tag fanden das Auszählen der Zellen und die Gewinnung der Zellüberstände und Zellpellets statt. Die Überstände wurden abgenommen, in 2 ml Eppendorfcups überführt und zur Entfernung von Zellresten bei 13.000 rpm 2 min zentrifugiert. Sie wurden in 1,5 ml Eppendorfcups umgefüllt und bei -20°C für die spätere Proteinbestimmung eingefroren. Die Zellen wurden mit 300 µl Trypsin abgelöst, mit 700 µl Medium neutralisiert und in ein 1,5 ml Eppendorfcup pipettiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte am *Cedex XS Analyzer* und im Anschluss die Zentrifugation der Zellsuspensionen bei 13.000 rpm für 2 min. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet im Restvolumen resuspendiert und Duplikate in ein Eppendorfcup zusammengeführt. Die Cups wurden nochmals bei 3000 rpm 2 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Pellets bei -20°C für die RNA-Isolierung eingefroren.

3.1.6.3 Dehnversuch

Zur Simulation der mechanischen Belastung einer Wunde wurde ein Gerät zur zyklischen Dehnung adhärenter Zellen entwickelt (Abb. 8). Die Auswirkung von zyklischer Dehnung auf die Zellproliferation sowie die Zytokinsekretion untersuchte man durch Auszählen der gedehnten bzw. ungedehnten Zellen nach 70 Stunden. Die Dehnung erfolgte mittels Vakuumpumpe im Minutentakt und unter Steuerung durch eine Zeitschaltuhr. Der Versuchsansatz wurde wie unter 3.1.6.1 beschrieben durchgeführt. Von jedem Zelltyp wurden 60.000 Zellen in 4 ml Medium pro Well der Dehnplatten im Doppelansatz ausgesät.

Jede Dehnplatte wurde 2-fach angesetzt, wovon später nur eine der zyklischen Dehnung ausgesetzt wurde. Es folgte Inkubation bei 37°C.

Nach Mediumwechsel am nächsten Tag wurden die Platten am 3. Versuchstag in die Dehnkammer eingespannt und die zyklische Dehnung im Minuten-Takt im Brutschrank für die folgenden 72 Stunden gestartet. Die Platten mit den ungedehnten Kontrollen wurden ebenfalls bei 37°C inkubiert.



▲ Abb. 8: Aufbau der im Labor entwickelten Dehnkammer zur zyklischen Zelldehnung
 a) im unbesetzten Zustand, b) voll belegt mit vier 6-Well-Platten,
 c) in geschlossenem Zustand, bereit zur Dehnung.

Nach Beendigung der Dehnung erfolgte die Gewinnung der Überstände und das Auszählen der gedehnten und ungedehnten Zellen. Die Überstände (4 ml) wurden abgenommen, in je ein 15 ml Falcon pipettiert, 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und im Anschluss auf drei 1,5 ml Eppendorfcups verteilt. Nach zweimaligem Waschen mit je 4 ml PBS wurden die

Zellen mit 500 µl Trypsin abtrypsiniert, mit 1 ml Medium neutralisiert und dann in 1,5 ml Eppendorfcups pipettiert. Das Auszählen der Zellen und die Herstellung der Pellets erfolgten wie unter 3.1.6.2 beschrieben. Die Überstände und Zellpellets wurden anschließend bei -20°C tiefgefroren.

3.1.6.4 Experimente unter dem Einfluss von Botulinumtoxin A

Die Effekte von Botulinumtoxin A (BT A) auf NHF und Keloidfibroblasten wurden mittels Resazurin-Assay und Zellkultivierung in 6-Well-Platten untersucht. Das verwendete Botulinumtoxin A wurde im Vorfeld der Experimente in PBS auf eine Konzentration von 10.0 IU pro ml verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

3.1.6.4.1 Resazurin-Assay mit Botulinumtoxin A

Das Ansetzen des Versuchs erfolgte wie unter 3.1.6.1 beschrieben. Jede Zellart wurde 20-fach auf der 96-Well-Platte ausgesät.

Am 2. Tag wurden fünf Ansätze aus NHF-Medium, PBS und Botulinumtoxin A für den Mediumwechsel hergestellt: Kontrolle, 1 IU, 2.5 IU, 5 IU und 10 IU BT A (Tab. 9). Der Anteil an Medium war in allen Ansätzen gleich. Das Restvolumen setzte sich bei den Ansätzen für 1 bis 5 IU BT A aus PBS und Botulinumtoxin zusammen. Die Kontrolle enthielt zusätzlich zum Medium nur PBS, der Ansatz für 10 IU BT A nur Botulinumtoxin A. Das Medium in den 96-Well-Platten wurde durch 100 µl mit 0 bis 10 IU BT A ersetzt, wobei von jedem der Ansätze 4-fach Werte pipettiert wurden.

Nach 48 h und 72 h wurden wie unter 3.1.6.1 10 µl Resazurin zugegeben und die Fluoreszenzmessungen nach 3 h und 4 h am Tecan durchgeführt.

	BT A	PBS	Medium
Kontrolle	/	1,5 ml	4,5 ml
1 IU	150 µl	1,350 ml	4,5 ml
2.5 IU	375 µl	1,125 ml	4,5 ml
5 IU	750 µl	750 µl	4,5 ml
10 IU	1,5 ml	/	4,5 ml

▲ **Tab. 9: Beispiel für das Mischungsverhältnis der Ansätze für ein Resazurin-Assay** mit einem Gesamtvolumen von 6 ml pro Ansatz.

3.1.6.4.2 Inkubation mit Botulinumtoxin A im 6-Well-Plattensystem

Der Versuchsansatz erfolgte wie unter 3.1.6.2 beschrieben. Für jede Zellart wurde eine 6-Well-Platte angesetzt.

Am nächsten Tag wurden wie unter 3.1.6.4.1 Ansätze aus NHF-Medium, PBS und Botulinumtoxin A für Kontrolle, 1 IU und 2.5 IU BT A hergestellt (Tab. 10). Dann wurde das Medium in den Wells durch 2 ml der Ansätze ersetzt und dabei pro Platte jeder der drei Ansätze 2-fach pipettiert.

Am 5. Tag erfolgte das Abnehmen und Auszählen der Zellen und Überstände sowie das Einfrieren der Pellets und Überstände wie unter 3.1.6.2 beschrieben.

	BT A	PBS	Medium
Kontrolle	/	1,563 ml	23,437 ml
1 IU	625 µl	938 µl	23,437 ml
2.5 IU	1,563 ml	/	23,437 ml

▲ **Tab. 10: Beispiel für das Mischungsverhältnis der Ansätze für ein Proliferationsassay mit 6-Well-Platten** und einem Gesamtvolumen von 25 ml pro Ansatz.

3.1.7 Mikroskopfotographie

Um die Morphologie der Keloidfibroblasten untereinander und mit NHF bezüglich Zellgröße, Zellform und Siedlungsmuster zu vergleichen, wurden mithilfe einer speziellen Kamera über einen Okularaufsatz digitale Fotografien am Mikroskop angefertigt. Als Zeitpunkt wurde das Ende der Proliferationsversuche kurz vor dem Abnehmen der Überstände und der Zellen gewählt.

3.2 Expressionsanalyse

3.2.1 Proteinexpressionsanalyse

Zur Analyse der Expression verschiedener Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und proinflammatorischer Zytokine wurde die Detektion auf Proteinebene mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Hierfür wurde das Verfahren des *Sandwich-ELISAs* mit *Capture-* und *Detection-Antibody* gewählt.

Je 100 µl des nach Herstellerangaben in steril filtriertem 1x PBS gelösten *Capture Antibody* wurden auf der 96-Well-Platte verteilt, die Platte mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde jedes Well mit ca. 400 µl Waschpuffer, welcher anschließend möglichst vollständig entfernt wurde, dreimal gewaschen. Darauf folgte das Blocken der Platte mit 300 µl *Reagent Diluent* für mindestens eine Stunde. Für den Standard wurde eine 7-Punkt-Verdünnungsreihe in *Reagent Diluent* ausgehend von einer maximalen Konzentration von 250-1000 pg/ml erstellt. Nach dem Blocken und erneuten Waschen erfolgte die Verteilung von je 100 µl des Standards, der Proben bzw. des *Reagent Diluent* als Blank. Nach Abdecken der Platte mit Parafilm wurde diese wieder über Nacht inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen am nächsten Tag folgte die Zugabe von je 100 µl des nach Herstellerangaben in *Reagent Diluent* gelösten *Detection Antibody*. Nach zwei Stunden Inkubation und erneutem Waschen wurden 100 µl Streptavidin pipettiert und die Platte für 20 min dunkel gelagert. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl *Substrat Solution* pipettiert und die Platte daraufhin solange dunkel gelagert, bis ein ausreichender Farbumschlag

ersichtlich war. Es folgte das Abstoppen des ELISAs mit 50 μ l *Stop Solution* und die möglichst zügige Fluoreszenzmessung am Tecan (Filter: *measurement wavelength* 450 nm).

3.2.2 Genexpressionsanalyse

Die Expressionsanalyse der im ELISA untersuchten Faktoren erfolgte ebenfalls mittels Detektion auf RNA-Ebene. Nach Isolierung der RNA und deren Umschreibung in cDNA durch Reverse Transkription wurde die quantitative PCR (qRT-PCR) im two-step-Verfahren angewandt.

3.2.2.1 RNA-Isolierung (Quiagen RNeasy Mini)

Die RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) in einem Säulensystem. Zu Beginn wurden zwei verschiedene Ansätze *Puffer work solution* als Lysispuffer unter Verwendung des RLT- und des RPE-Puffers hergestellt (Tab. 11).

1. Puffer work solution	1 ml RLT-Puffer und 10 μ l β -Mercaptoethanol (1%)
2. Puffer work solution	4 Volumenanteile Ethanol (96-100%) zu Volumenanteil RPE-Puffer

▲ Tab. 11: Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze der *Puffer work solution* als Lysispuffer.

Auf die Zellpellets wurden 350 μ l des ersten Lysispuffers pipettiert und durch längeres Vortexen eine vollständig homogene Zellsuspension erzeugt. Nach Ausfällen der RNA durch Zugabe von 350 μ l 70% Ethanol wurden 700 μ l Probe jeweils in eine Säule in einem 2 ml Eppendorfcup pipettiert. Diese wurden anschließend für 15 sec bei > 8000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von 700 μ l RW1-Puffer auf die Säule wurde erneut 15 sec bei > 8000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Für den DNA-Verdau wurden 10 μ l DNase und 70 μ l RDD-Puffer pro Probe gemischt und 80 μ l davon auf die Säule pipettiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min erfolgte ein Waschgang mit 350 μ l RW1-Puffer und anschließend die Zentrifugation für 15 sec bei > 8000 g. Der

Durchfluss und das Eppendorfcup wurden verworfen und die Säule in ein neues Eppendorfcup platziert. Nach Zugabe von 500 µl RPE-Puffer als 2. *Puffer work solution* folgte die Zentrifugation für 15 sec bei > 8000 g. Dann wurden erneut 500 µl RPE-Puffer in die Säule pipettiert und durch Zentrifugieren für 2 min bei > 8000 g die Silicagel-Membran getrocknet. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfcup platziert und 30-50 µl RNase-freies Wasser aufpipettiert. Durch Zentrifugieren für 1 min bei > 8000 g wurde die RNA eluiert. Im Anschluss folgte die Konzentrationsbestimmung der RNA im Picodrop in ng/ml, woraufhin die RNA zügig bei -80°C tiefgefroren wurde.

3.2.2.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte im Zuge der reversen Transkription unter Eiskühlung. Die isolierte RNA wurde auf Eis aufgetaut und mit RNase- und DNase-freiem Wasser auf 10 µl in der für den Versuchsansatz benötigten Konzentration verdünnt. Es folgten die Denaturierung der RNA-Verdünnung für 5 min bei 65°C im *Invitrogen Superscript* und die Herstellung des *MasterMix* auf Eis (Tab. 12). Die Proben wurden 1 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit jeweils 9 µl des *MasterMix* versetzt. Alle weiteren Erwärmungs- und Abkühlungsphasen fanden im *Invitrogen Superscript* statt. Nach Erwärmung auf 42°C für 2 min wurde 1 µl *Superscript* pro Ansatz pipettiert. Dann wurde für 50 min wieder auf 42°C erhitzt, anschließend für 15 min auf 70°C und danach auf 4°C abgekühlt. Für eine weitere Lagerung wurden die Proben bei -20°C tiefgefroren.

MasterMix	1 x
Oligo dT	1 µl
10mM dNTP	1 µl
5xRT Puffer	4 µl
0,1M DTT	2 µl
RNase Out	1 µl

▲ Tab. 12: Zusammensetzung des *MasterMix*-Ansatzes für 10 µl RNA.

3.2.2.3 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Die Quantifizierung der cDNA wurde mithilfe der quantitativen *real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) unter Verwendung des *Syber Green Kit* durchgeführt. Für jede der cDNA-Proben wurden Ansätze von 50 µl mit RNase- und DNase-freiem Wasser und mindestens 35 ng cDNA hergestellt. Es folgte die Bereitstellung des jeweiligen *MasterMix* mit den *Primern* der gewünschten Proteine und von GAPDH als *house keeping gene*. Je 5 µl der verdünnten cDNA wurden als *Template* auf die 96-Well-Platte pipettiert (n=9). Als Kontrolle wurde zusätzlich für jeden *Primer* eine *no-template-control* (NTC) mit 5 µl RNase-freiem Wasser statt cDNA angesetzt. Anschließend erfolgte die Verteilung von 20 µl *MasterMix*. Jeder *MasterMix* wurde pro *Template* dreifach pipettiert. Es folgte die Abdeckung der Platte mit einer Schutzfolie und die Zentrifugation für 2 min bei 4000 U/min. Die PCR lief daraufhin im Thermozykler in 42 Zyklen ab.

3.3 Statistische Auswertung

Die Auswertungen und die Erstellung der Graphen wurden entweder mit Excel 2010 oder mit Graphpad prism 5.02 (GraphPad Software, Inc., CA 92037 USA) erstellt. Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des Mann-Whitney-Test (unpaired two-tailed t-test) in Graphpad prism 5.02 durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Balken und Standardabweichungen. Die Fehlerbalken in den Graphen repräsentieren die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, sofern keine anderen Angaben vorliegen. Statistische Signifikanz wurde festgelegt auf $p < 0,05$. Die Signifikanzwerte wurden mit * ($p < 0,05$, signifikant), ** ($p < 0,01$, sehr signifikant), *** ($p < 0,001$, hochsignifikant) und ns ($p \geq 0,05$, nicht signifikant) gekennzeichnet. Die Aussaat der Versuche erfolgte in Doppel- oder Dreifachansätzen in unabhängigen Wells (jeweils genauere Angaben in den Beschreibungen der einzelnen Experimente unter „Methoden“). Der Parameter n steht für die Anzahl unabhängiger Versuchsansätze. Durchgezogene Striche über den Balken in den Graphen beschreiben die Signifikanz der darunter eingeschlossenen Balken zur Kontrolle, Symbole (ns, *, **, ***) direkt über den Balken betreffen das Signifikanzverhalten des jeweiligen Balken zur Kontrolle.

4 Ergebnisse

Die Versuche wurden mit normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und den Keloidfibroblasten (KF) A-H durchgeführt. Diese entstammten den Gewebeproben von sechs verschiedenen Keloidpatienten. Die Gruppe enthielt Patienten beider Geschlechter und unterschiedlicher Altersgruppen mit Keloiden in zum Teil unterschiedlicher Lokalisation am Ohr (Tab. 13).

Keloid-Fibroblastenkultur	Geschlecht	Alter	Entnahmestelle
KF A	weiblich	44	vorderer Helix-Rand
KF B	weiblich	14	hintere Concha
KF C	männlich	24	hinterer Helix-Rand
KF D	weiblich	23	Ohrläppchen
KF E	männlich	24	Ohrläppchen
KF H	weiblich	56	Ohrläppchen

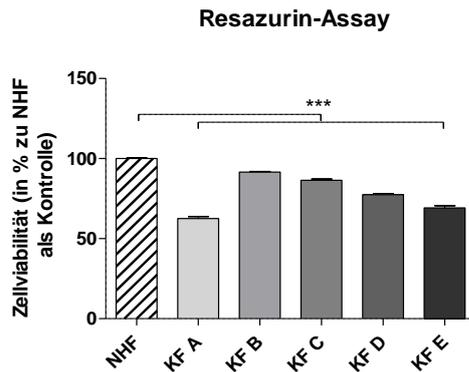
▲ Tab. 13: Demografie der Keloidpatienten und Entnahmestellen.

4.1 Proliferation

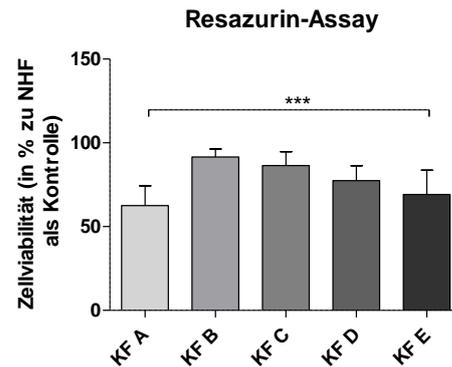
4.1.1 Resazurin-Assay

Die Bestimmung der Viabilität der Zellen im Resazurin-Assay zur Beurteilung ihres Proliferationsverhalten zeigte eine hochsignifikant ($p < 0,001$) erniedrigte Zellvermehrung aller untersuchten Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu den normalen dermalen Fibroblasten (NHF) (Abb. 9). Die NHF wiesen eine deutlich erhöhte Proliferation gegenüber jeder einzelnen Keloidfibroblastenart auf, die größte Differenz (37,40%) ergab sich zwischen NHF und KF A ($p < 0,0001$). Des Weiteren betragen die Proliferationswerte von KF B 91,52% ($p < 0,0001$), von KF C 86,49% ($p < 0,0001$), von KF D 77,40% ($p < 0,0001$) und von KF E 69,20% ($p < 0,0001$) des NHF-Wertes. Auch die Keloidfibroblasten untereinander zeigten eine

deutliche Streuung innerhalb der Proliferationstendenzen auf. Die Keloidfibroblasten A-E zeigten beim direkten Vergleich aller einzelnen Kulturen zueinander hochsignifikante ($p < 0,0001$) Unterschiede bezüglich des Anstiegs der Zellzahl. Es ergaben sich Differenzen von 5,03% (KF B zu KF C) bis 28,08% (KF A zu KF B). Die Proliferation wurde auch hierfür jeweils an NHF als Kontrolle gemessen (Abb. 10).



▲ **Abb. 9: Zellviabilität im Resazurin-Assay: Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu NHF.**



▲ **Abb.10: Zellviabilität im Resazurin-Assay: Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich untereinander, Wachstum in % zu NHF als Kontrolle angegeben.**

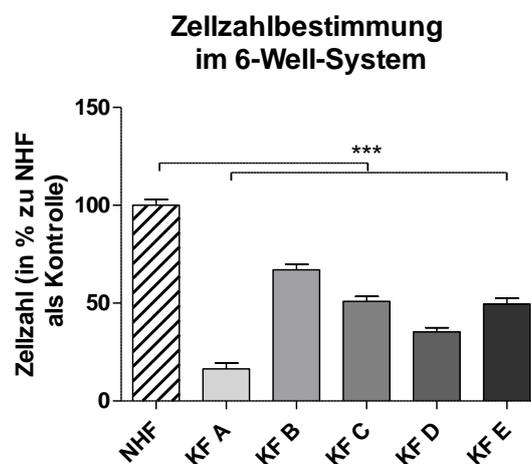
▲ **Abb. 9, 10: Zellviabilität im Resazurin-Assay: Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach Inkubation für 72 h in NHF-Nährmedium,** Zellzahlbestimmung durch Viabilitätsmessung mittels Resazurin und Fluoreszenzmessung im Tecan (verwendete Daten: nach 72h, 4h nach Resazurinzugabe). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n=6$). Statistische Signifikanzwerte wurden mit: $p \geq 0,05$ (ns, nicht signifikant), $p < 0,05$ (*, signifikant), $p < 0,01$ (**, sehr signifikant), $p < 0,001$ (***, hochsignifikant) festgelegt und genau gekennzeichnet. Durchgezogene Striche über mehrere Balken beschreiben die Signifikanzen innerhalb der jeweiligen Gruppe von Balken. Symbole (*, ns) direkt über einem Balken beschreiben das Signifikanzverhalten dieses Balkens zur Kontrolle.

4.1.2 Zellzahlbestimmung im 6-Well-Plattensystem

Die Proliferation im Sinne einer Zellzahlzunahme über den Beobachtungszeitraum der normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und der Keloidfibroblasten (KF) A-E im 6-Well-System mit elektronischer Zellzahlbestimmung im *Cedex XS Analyzer* ergab ebenfalls eine signifikant erniedrigte Proliferation von KF A-E gegenüber den NHF (Abb. 11). Auch hier wiesen KF A die niedrigsten Werte auf, sie erreichten nur 16,48% ($p=0,0002$) der NHF-Proliferation, die höchste Zellvermehrungsrate ergab sich bei KF B mit 67,01% ($p < 0,0001$). Bei den übrigen Keloid-Kulturen zeigte die Analyse für KF C eine um

49,04% ($p < 0,0001$), für KF D eine um 64,67% ($p < 0,0001$) und für KF E eine um 50,39% ($p < 0,0001$) erniedrigte Proliferation gegenüber NHF als Kontrolle.

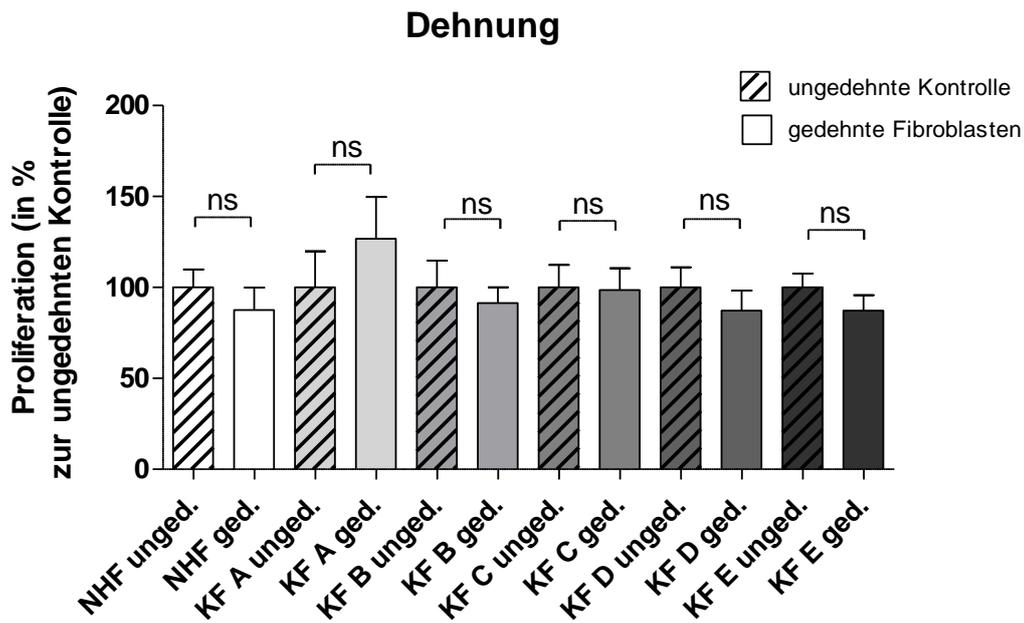
Die Betrachtung der Keloidfibroblasten untereinander ergab stark divergierende Wachstumsmuster. Besonders die Keloidfibroblastenkultur A zeigte eine deutlich verringerte Proliferationstendenz gegenüber den übrigen Fibroblasten KF B-E. Die Differenz zwischen den Proliferationswerten der einzelnen Kulturen betrug für KF B eine um 50,53% ($p = 0,0004$), für KF C um 34,48% ($p = 0,0004$), für KF D um 18,85% ($p = 0,0009$) und für KF E um 33,13% ($p = 0,0002$) höhere Vermehrungsrate als bei KF A.



▲ **Abb. 11: Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach Inkubation für 96 h in NHF-Medium.** Bestimmung der Zellkonzentration mittels *Cedex XS Analyzer*. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF: $n = 6$, KF A: $n = 5$, Kulturen B-E: $n = 6$).

4.1.3 Dehnversuch

Die zyklische Dehnung im Minutentakt über 70 h in der Dehnkammer ergab weder bei den NHF noch bei den Keloidfibroblasten (KF) A-E eine signifikante Veränderung der Zellproliferation im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle der einzelnen Kulturen. Weder eine Stimulation noch eine Hemmung der Proliferation konnte unter dem Einfluss der Dehnung festgestellt werden (Abb. 12).



▲Abb. 12: Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) A-E und normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach zyklischer Dehnung im Minutentakt über 70 h mit Vergleich der gedehnten Probe zu einer ungedehnten Kontrolle, Bestimmung der Zellkonzentration mittels *Cedex XS Analyzer*. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=4).

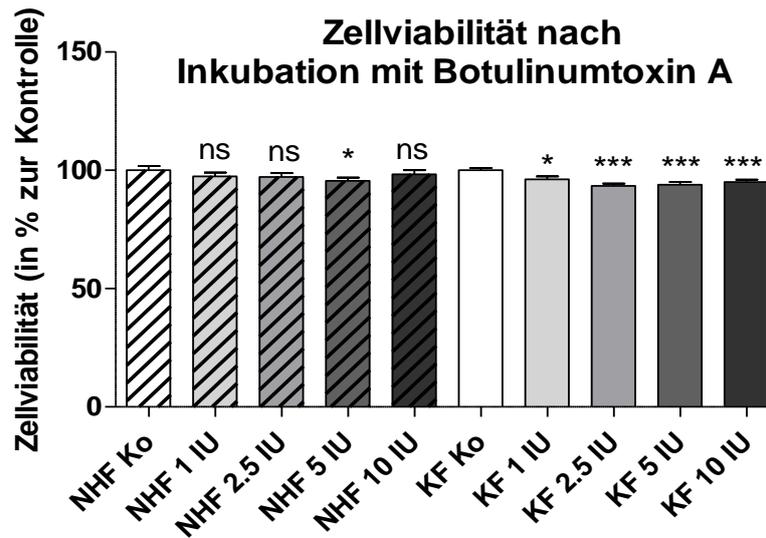
4.1.4 Zellproliferation unter dem Einfluss von Botulinumtoxin A

Im Folgenden wurde der Einfluss von Botulinumtoxin A (BT A) auf das Proliferationsverhalten von normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und der Keloidfibroblasten (KF) A-H analysiert. Eingesetzt wurden konstante Konzentrationen von 1.0 IU, 2.5 IU, 5.0 IU und 10.0 IU BT A.

4.1.4.1 Resazurin-Assay

Im Resazurin-Assay zeigte sich im Zuge der Zellviabilitätsmessung beim Einsatz von 1.0 IU, 2.5 IU, 5.0 IU und 10 IU BT A für NHF nur bei einer Konzentration von 5.0 IU BT A eine signifikante Verminderung der Proliferation um 4,49% ($p=0,04$) im Vergleich zur Kontrolle. Unter dem Einfluss von 1.0 IU, 2.5 IU und 10.0 IU BT A ergab sich keine signifikante Veränderung der Zellvermehrung (Abb. 13). Bei Betrachtung der Keloidfibroblasten (KF) A-H

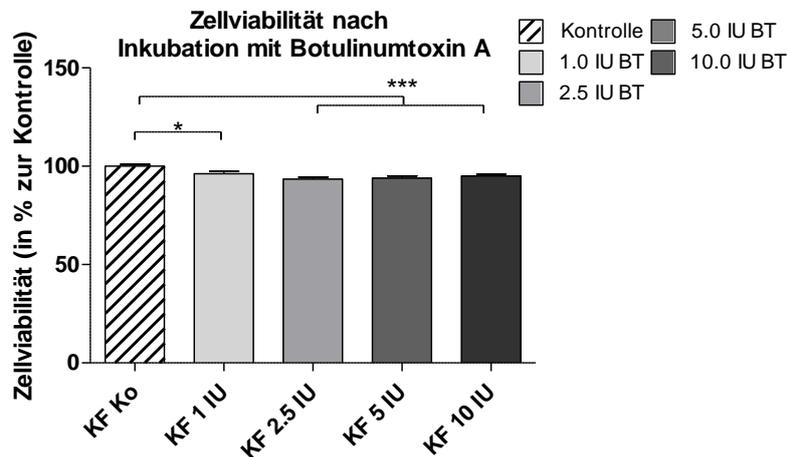
als Gesamtheit war bei einer Konzentration von 1.0 IU BT A eine signifikante Reduktion der Proliferation um 3,76% ($p=0,0262$) erkennbar, bei 2.5 IU, 5.0 IU und 10.0 IU BT A war die Zellvermehrung jeweils um 6,58% ($p<0,0001$), 6,10% ($p=0,0001$) und 4,99% ($p=0,001$) signifikant erniedrigt (Abb. 13).



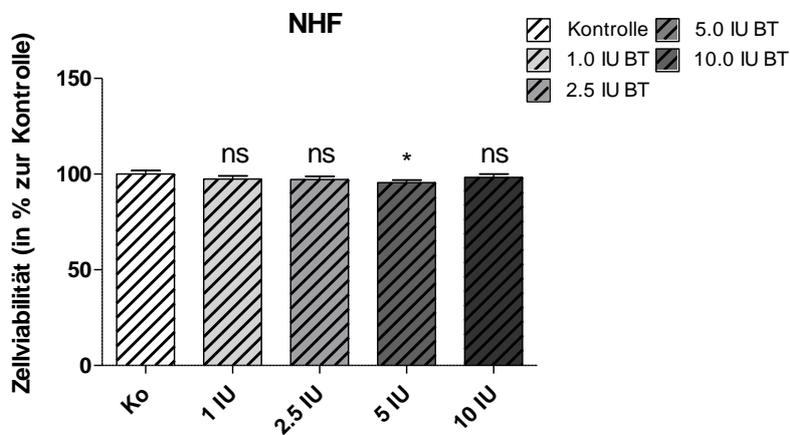
▲ **Abb. 13: Zellviabilität von normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und der Keloidfibroblasten (KF) A-H insgesamt im Resazurin-Assay mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU, 2.5 IU, 5.0 IU und 10.0 IU pro 100 µl NHF-Nährmedium) für 72 h bei Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, Zellzahlbestimmung mittels Resazurin und Fluoreszenzmessung im Tecan (verwendete Daten: nach 96 h Inkubation, 4 h nach Resazurinzugabe). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF und KF H: n=4, KF A-E: n=3).**

Die einzelnen Keloidfibroblasten A-H zeigten nur teilweise Veränderungen unter dem Einfluss des BT A (Abb. 14-21). KF C, D und H waren bei keiner der eingesetzten Konzentrationen von BT A signifikant verändert. KF A ließen nur bei 2.5 IU BT A eine um 10,25% ($p=0,0404$) signifikant reduzierte Proliferation erkennen (Abb. 16). KF B hingegen zeigte signifikant verringerte Werte nach Inkubation mit allen vier Konzentrationen von BT A (Abb. 17). Die Proliferation betrug jeweils 95,89% ($p=0,0043$) bei 1.0 IU BT A, 93,11% ($p=0,0002$) bei 2.5 IU BT A, 91,59% ($p=0,0009$) bei 5.0 IU BT A und 92,81% ($p=0,0009$) bei 10.0 IU BT A des Versuchsergebnisses der unbehandelten Kontrolle. Auch die Keloidkultur E war bei jeder eingesetzten Konzentration von BT A signifikant vermindert (Abb. 20). Die Reduktion der Zellzahl von KF E gegenüber der Kontrolle betrug in Reihenfolge der aufsteigenden Konzentrationen des BT A die Werte 4,73% ($p=0,0351$), 7,95% ($p=0,0073$),

7,28% ($p=0,0051$) und 5,20% ($p=0,0262$). Die geringste Proliferation fand also bei Inkubation mit 2.5 IU BT A statt. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration nahm die Zellvermehrung wieder zu.

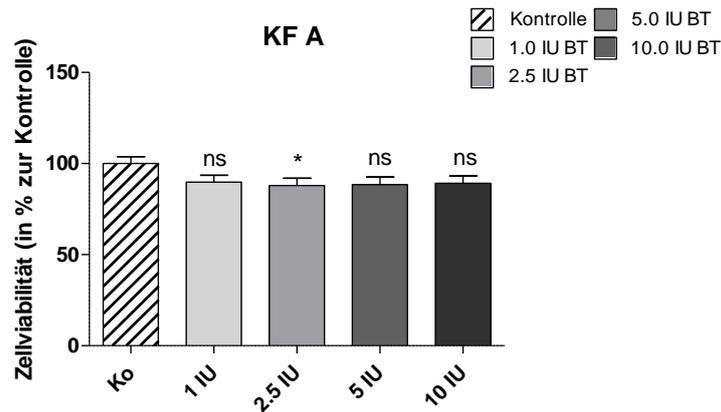


▲ Abb. 14: Zellviabilität aller Keloidfibroblasten (KF) A-H im Resazurin-Assay.

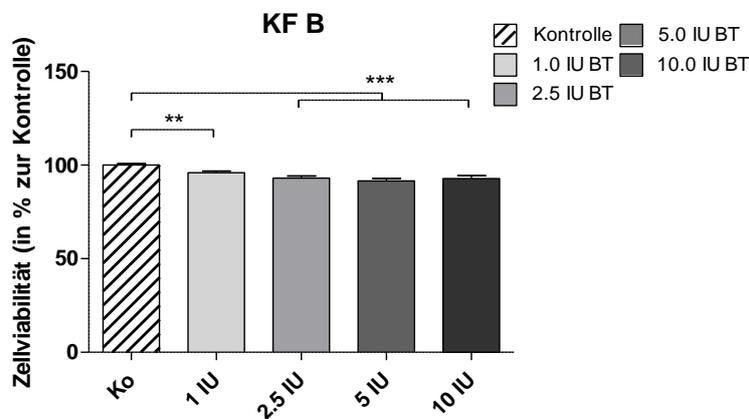


▲ Abb. 15: Zellviabilität von normalen dermalen Fibroblasten (NHF) im Resazurin-Assay.

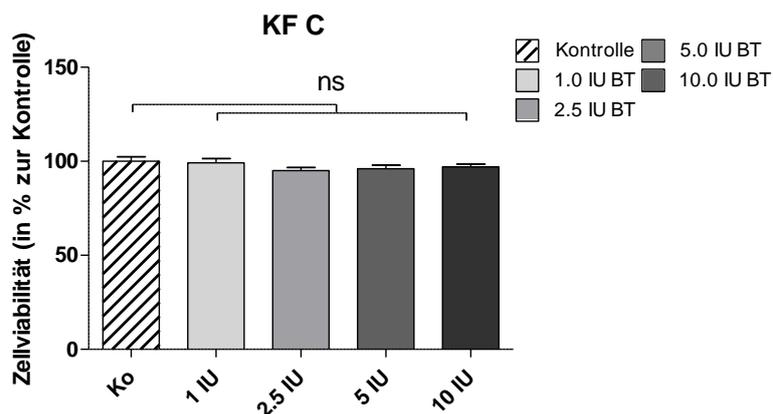
Abb. 14-21: Normale dermale Fibroblasten (NHF) und Keloidfibroblasten (KF) A-H im Resazurin-Assay mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU, 2.5 IU, 5.0 IU und 10.0 IU pro 100 μ l NHF- Nährmedium) für 72 h beim Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, Zellviabilitätsbestimmung mittels Resazurin und Fluoreszenzmessung im Tecan (verwendete Daten: nach 96 h Inkubation, 4 h nach Resazurinzugabe). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF und KF H: $n=4$, KF A-E: $n=3$). BT= Botulinumtoxin A.



▲ Abb. 16: Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) A im Resazurin-Assay.

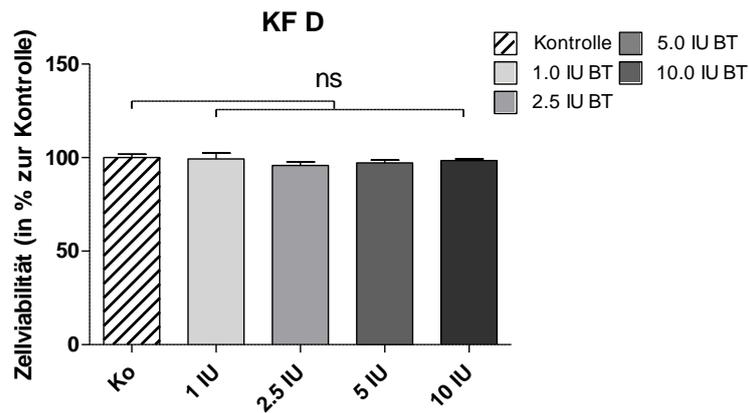


▲ Abb. 17: Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) B im Resazurin-Assay.

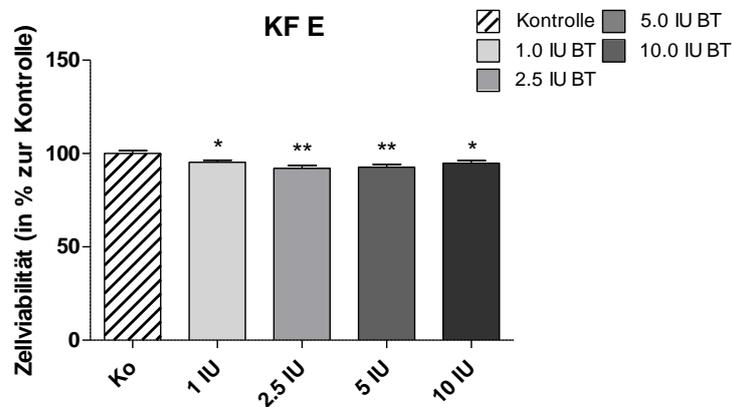


▲ Abb. 18: Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) C im Resazurin-Assay.

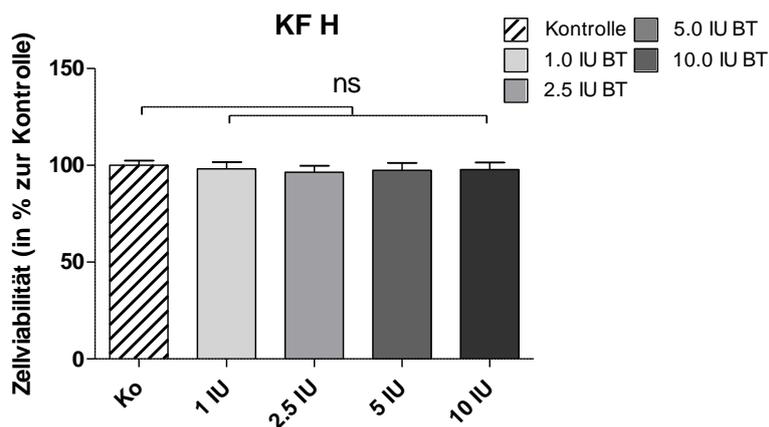
Abb. 14-21: Normale dermale Fibroblasten (NHF) und Keloidfibroblasten (KF) A-H im Resazurin-Assay mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU, 2.5 IU, 5.0 IU und 10.0 IU pro 100 µl NHF- Nährmedium) für 72 h beim Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, Zellviabilitätsbestimmung mittels Resazurin und Fluoreszenzmessung im Tecan (verwendete Daten: nach 96 h Inkubation, 4 h nach Resazurinzugabe). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF und KF H: n=4, KF A-E: n=3). BT= Botulinumtoxin A.



▲ Abb. 19: Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) D im Resazurin-Assay.



▲ Abb. 20: Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) E im Resazurin-Assay.

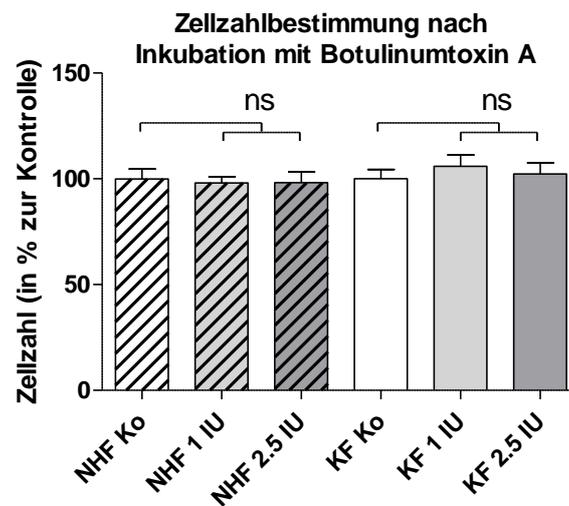


▲ Abb. 21: Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) H im Resazurin-Assay.

Abb. 14-21: Normale dermale Fibroblasten (NHF) und Keloidfibroblasten (KF) A-H im Resazurin-Assay mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU, 2.5 IU, 5.0 IU und 10.0 IU pro 100 μ l NHF- Nährmedium) für 72 h beim Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, Zellviabilitätsbestimmung mittels Resazurin und Fluoreszenzmessung im Tecan (verwendete Daten: nach 96 h Inkubation, 4 h nach Resazurinzugabe). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF und KF H: n=4, KF A-E: n=3). BT= Botulinumtoxin A.

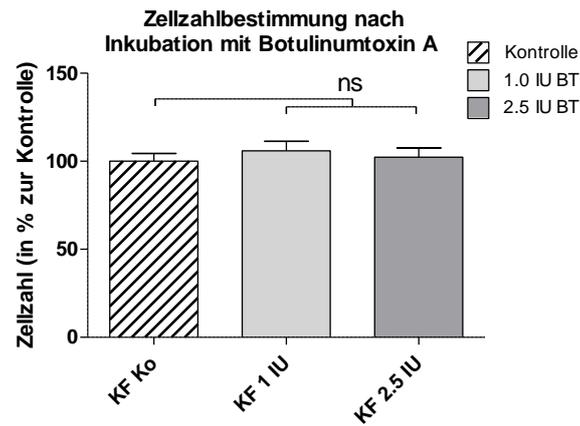
4.1.4.2 6-Well-Plattensystem

Im Rahmen der Versuchsreihe in 6-Well-Systemen wurde der Einfluss von BT A in den Konzentrationen 1.0 IU und 2.5 IU auf das Proliferationsverhalten der Fibroblasten untersucht. Weder für NHF noch für die Keloidfibroblasten A-H ergaben sich signifikante Veränderungen der Zellvermehrung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 22).

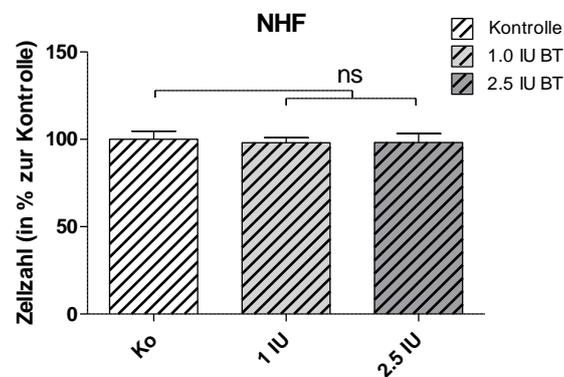


▲ **Abb. 22:** Zellproliferation von normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und aller Keloidfibroblasten (KF) A-H mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h bei Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, Bestimmung der Zellkonzentration mittels *Cedex XS Analyzer*. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF und KF H: n=4, KF A-E: n=3).

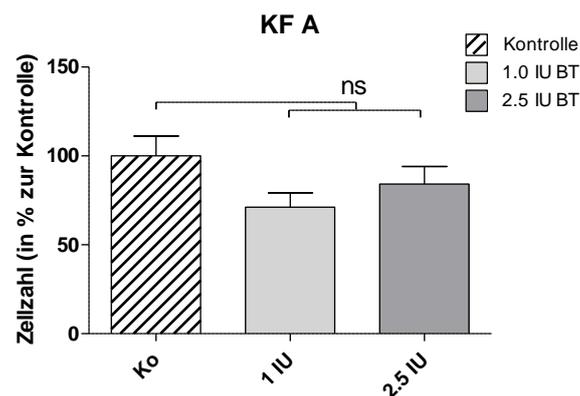
Sowohl die Betrachtung aller Keloidfibroblasten (KF) A-H als Gesamtheit, als auch die Analyse der Keloidfibroblasten A, B, D, E und H im Einzelnen ergaben keine Signifikanzen bezüglich eines veränderten Proliferationsverhaltens der Fibroblasten unter dem Einfluss des BT A im Vergleich zur Kontrolle. Nur KF C zeigte bei einer Konzentration von 1.0 IU BT A einen signifikanten Anstieg der Zellzahl um 18,02% ($p=0,0304$) (Abb. 23-30).



▲ Abb. 23: Zellproliferation aller Keloidfibroblasten (KF) A-H.

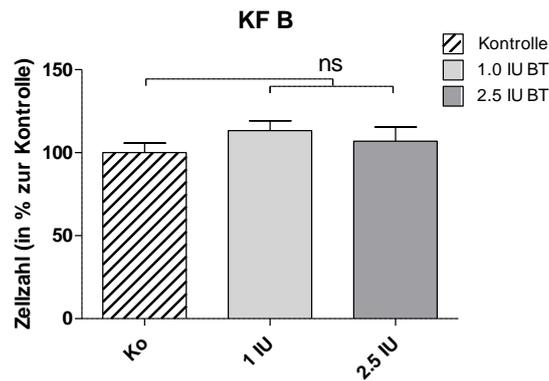


▲ Abb. 24: Zellproliferation von normalen dermalen Fibroblasten (NHF).

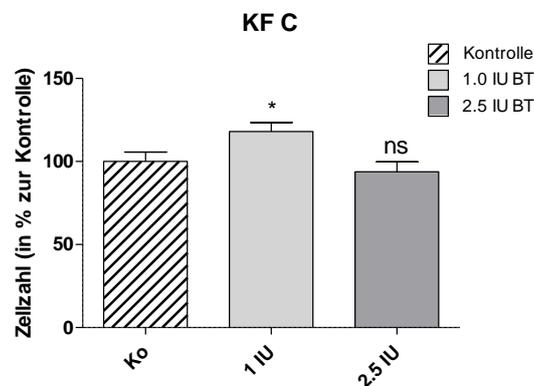


▲ Abb. 25: Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) A.

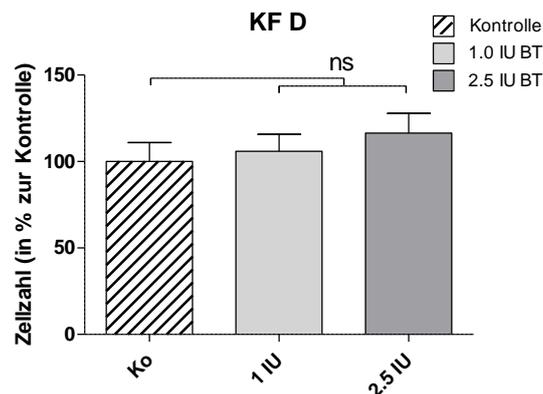
Abb. 23-30: Zellproliferation von normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und der einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-H mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h bei Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, Bestimmung der Zellkonzentration mittels Cedex XS Analyzer. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF und KF H: n=4, KF A-E: n=3). BT= Botulinumtoxin A.



▲ Abb. 26: Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) B.

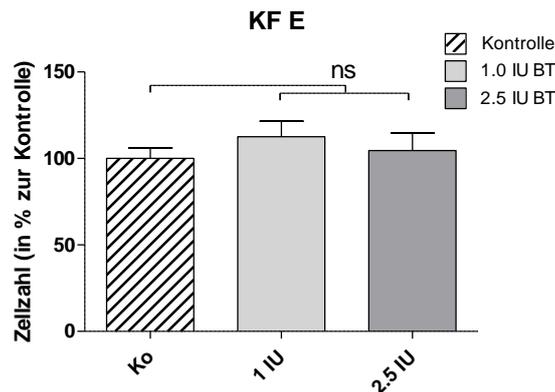


▲ Abb. 27: Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) C.

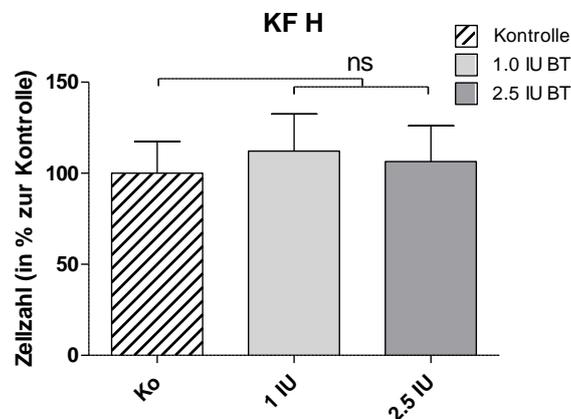


▲ Abb. 28: Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) D.

▲ Abb. 23-30: Zellproliferation von normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und der einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-H mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h bei Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, Bestimmung der Zellkonzentration mittels *Cedex XS Analyzer*. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF und KF H: n=4, KF A-E: n=3). BT= Botulinumtoxin A.



▲ Abb. 29: Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) E.



▲ Abb. 30: Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) H.

Abb. 23-30: Zellproliferation von normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und der einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-H mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h bei Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, Bestimmung der Zellkonzentration mittels *Cedex XS Analyzer*. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF und KF H: n=4, KF A-E: n=3). BT= Botulinumtoxin A.

Insgesamt war keine eindeutige Tendenz in der Beeinflussung des Proliferationsverhaltens der Fibroblasten unter dem Einfluss von Botulinumtoxin A erkennbar. Die Ergebnisse in den verschiedenen Kulturen waren sehr unterschiedlich (Abb. 23-30). So gab es bei den NHF kaum Schwankungen der Zellvermehrung bei 1.0 IU und 2.5 IU BT A (Abb. 24), KF A zeigte hingegen bei 1.0 IU BT A ein Absinken und bei 2.5 IU BT A wiederum einen Anstieg der Proliferation (Abb. 25). KF D ließ jeweils bei 1.0 IU und 2.5 IU BT A tendenziell eine Steigerung der Zellvermehrung erkennen (Abb. 28). Im Gegensatz dazu war bei KF B, C und E die Proliferation bei 1.0 IU BT A leicht erhöht, bei 2.5 IU hingegen leicht erniedrigt. Diese Schwankungen zeigten allerdings keine signifikanten Ausprägungen.

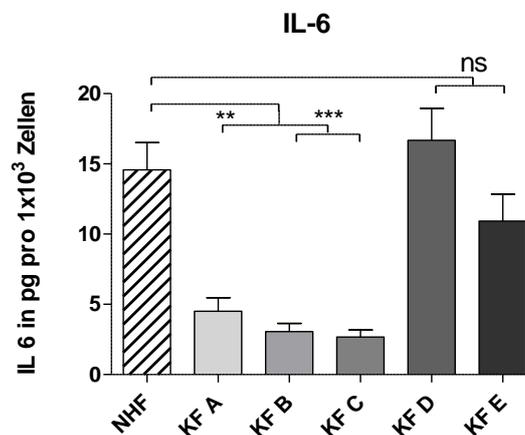
4.2 Proteinexpression

Im Folgenden wurde die Proteinexpression basal und im Speziellen unter dem Einfluss zyklischer Dehnung sowie der Einwirkung von Botulinumtoxin A (BT A) analysiert. Die Werte wurden in der Einheit pg pro 1×10^3 Zellen verwendet.

4.2.1 Basale Expressionswerte

4.2.1.1 Interleukin 6 (IL-6)

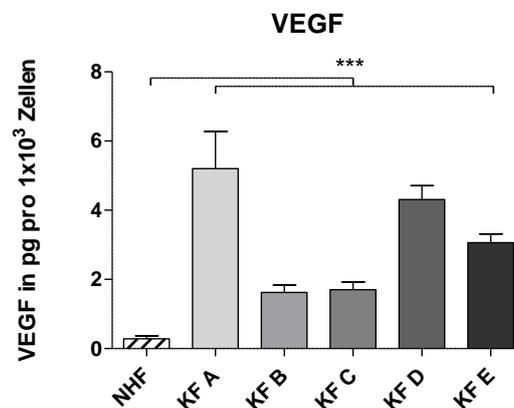
Die Expression von Interleukin 6 (IL-6) auf Proteinebene wurde in den Zellüberständen von normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und den Keloidfibroblasten (KF) A-E ermittelt (Abb. 31). Für KF A, KF B und KF C zeigte sich eine gegenüber den NHF signifikant erniedrigte Expression von IL-6. Im Einzelnen betrug sie für KF A 30,88% ($p=0,0021$), für KF B 21,00% ($p<0,0001$) und bei KF C 18,39% ($p<0,0001$) der NHF-Synthese. Die Analyse von KF D und KF E ergab keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression von IL-6 gegenüber den NHF-Werten.



▲Abb. 31: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach Inkubation für 96 h in NHF-Medium, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n=6$).

4.2.1.2 *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*

Auch der *vascular endothelial growth factor (VEGF)* wurde für NHF und KF A-E aus den Zellüberständen ermittelt. Die Analyse ergab eine signifikant erhöhte Expression des Proteins bei allen Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich mit NHF, bei welchen kaum eine Expression detektierbar war (Abb. 32). Die stärkste Syntheseleistung zeigte KF A, welche mit 5,20 pg pro 1×10^3 Zellen 18,57-mal höher als bei den NHF war ($p < 0,0001$). KF B wies 5,82-fach ($p < 0,0001$) und KF C 6,11-fach erhöhte Werte gegenüber NHF auf ($p < 0,0001$). Für KF D ergab sich eine 15,39-fach ($p < 0,0001$), bei KF E eine 10,93-fach ($p < 0,0001$) stärkere Expression als in der Kontrolle.



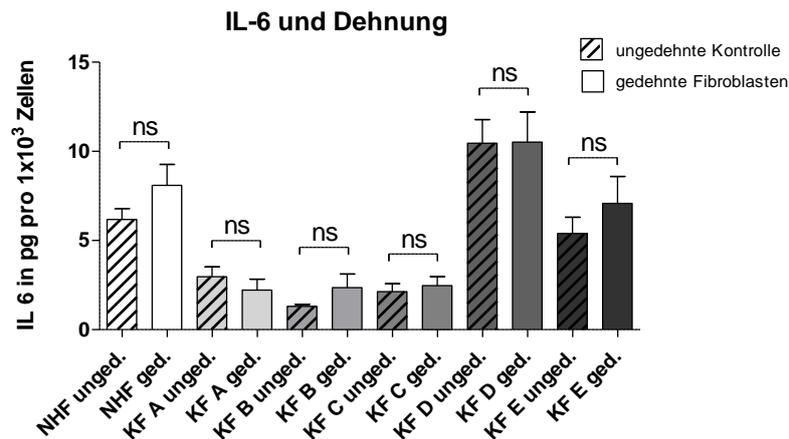
▲Abb. 32: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor (VEGF)* in Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach Inkubation für 96 h in NHF-Medium, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n=6$).

4.2.2 Proteinexpression nach mechanischer Dehnung

Aus den Zellüberständen der Dehnversuche mit NHF und KF A-E wurde die Expression der Proteine IL-6 und VEGF ermittelt und auf signifikante Unterschiede bei Vergleich der gedehnten Probe zur ungedehnten Kontrolle untersucht.

4.2.2.1 Interleukin 6 (IL-6)

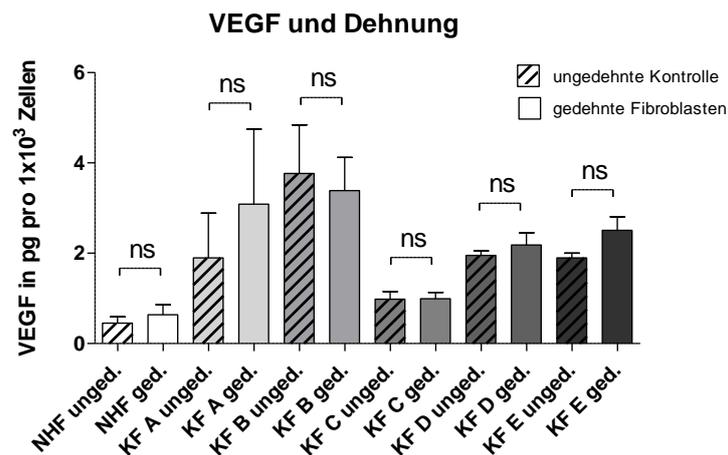
Sowohl NHF als auch die Keloidfibroblasten (KF) A-E zeigten unter dem Einfluss der Dehnung keine signifikant erhöhte oder erniedrigte Expression von IL-6 (Abb. 33).



▲ **Abb. 33: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) A-E und normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach zyklischer Dehnung** im Minutentakt über 70 h mit Vergleich der gedehnten Probe zu einer ungedehnten Kontrolle, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=4).

4.2.2.2 *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)

Der Einfluss der Dehnung zeigte bei der Analyse der Expression von VEGF auf Proteinebene weder für die NHF noch für die Keloidfibroblasten A-E eine signifikante Erhöhung oder Erniedrigung der Werte im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle (Abb. 34).



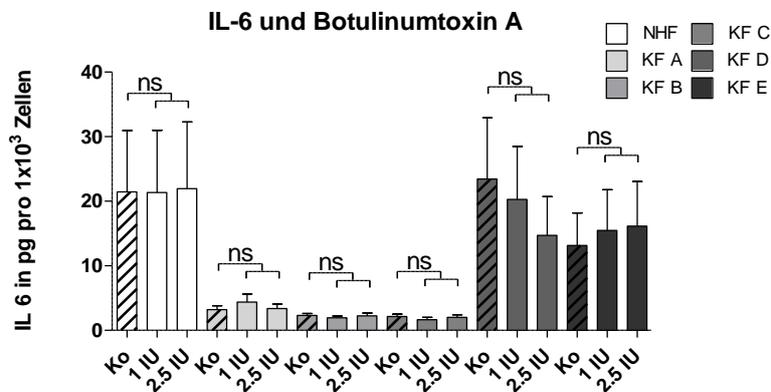
▲ **Abb. 34: Proteinexpression des vascular endothelial growth factor (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) A-E und normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach zyklischer Dehnung** im Minutentakt über 70 h mit Vergleich der gedehnten Probe zu einer ungedehnten Kontrolle, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=4).

4.2.3 Proteinexpression nach Inkubation mit Botulinumtoxin A

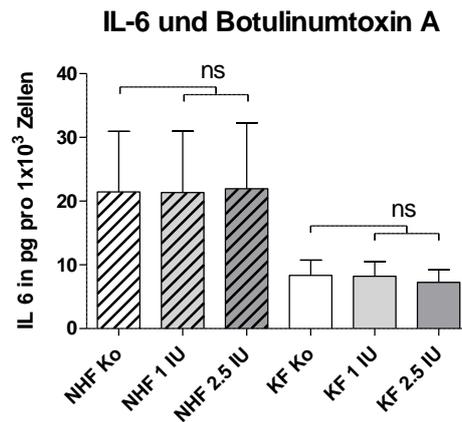
Unter Verwendung der Zellüberstände aus den Versuchsansätzen mit Botulinumtoxin A (BT A) in Konzentrationen von 1.0 IU und 2.5 IU wurde der Einfluss von BT A auf die Proteinexpression der Fibroblasten analysiert. Untersucht wurden IL-6, VEGF und TGF- β_1 .

4.2.3.1 Interleukin 6 (IL-6)

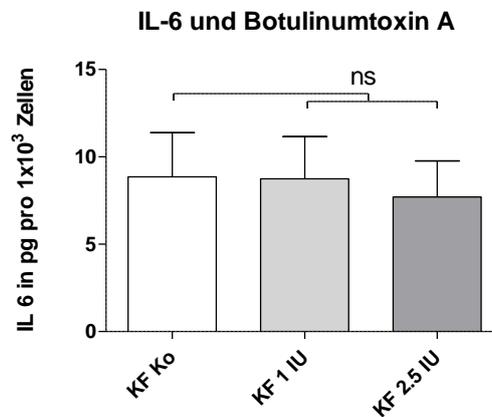
Die Expression von IL-6 auf Proteinebene war durch die Inkubation mit BT A weder bei den NHF noch den Keloidfibroblasten A-E signifikant erhöht oder erniedrigt gegenüber der jeweiligen Kontrolle. Dieses Ergebnis zeigte sich unabhängig von der Höhe der Konzentration des BT A (1.0 IU und 2.5 IU) (Abb. 35-43). Auch bei Betrachtung aller Keloidfibroblasten als Gesamtheit ergaben sich keine Signifikanzen (Abb. 36, 37).



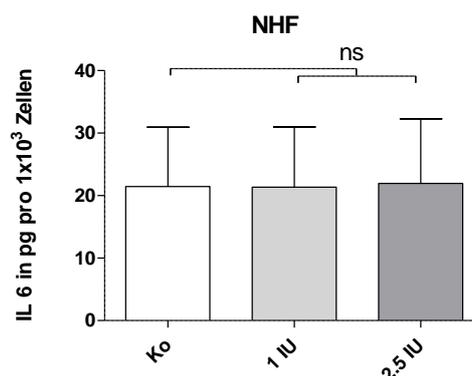
▲ Abb. 35: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in den Keloidfibroblasten (KF) A-E und normalen dermalen Fibroblasten (NHF) mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF: n=4, KF A-E: n=3).



▲ Abb. 36: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in allen verwendeten Keloidfibroblasten (KF) A-E insgesamt und in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).

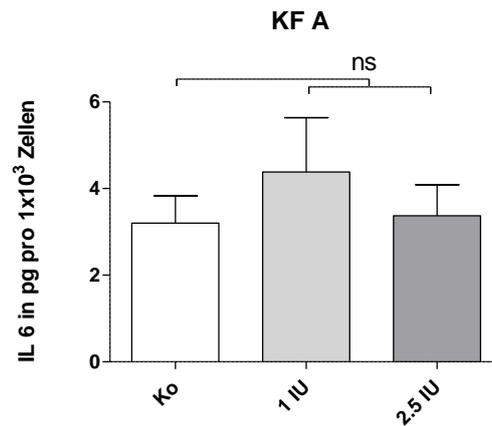


▲ Abb. 37: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in allen verwendeten Keloidfibroblasten (KF) A-E zusammen.

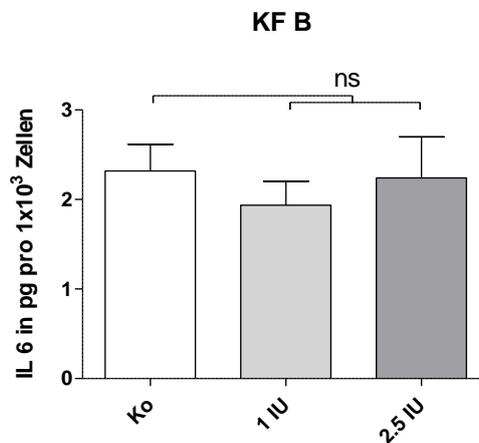


▲ Abb. 38: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).

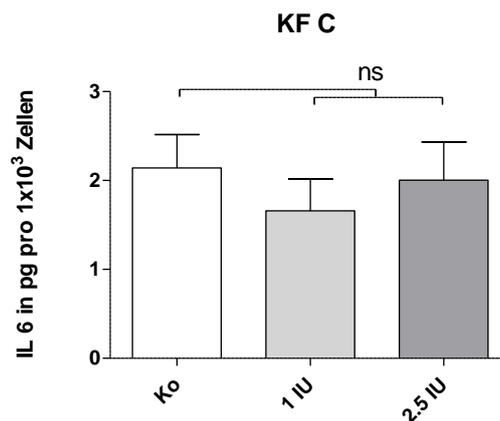
Abb. 36-43: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und den einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-E mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF: n=4, KF A-E: n=3).



▲ Abb. 39: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) A.

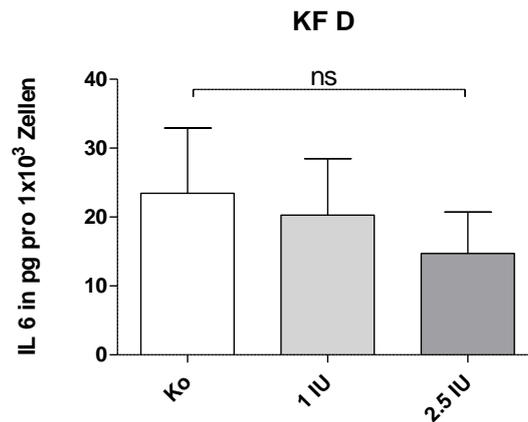


▲ Abb. 40: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) B.

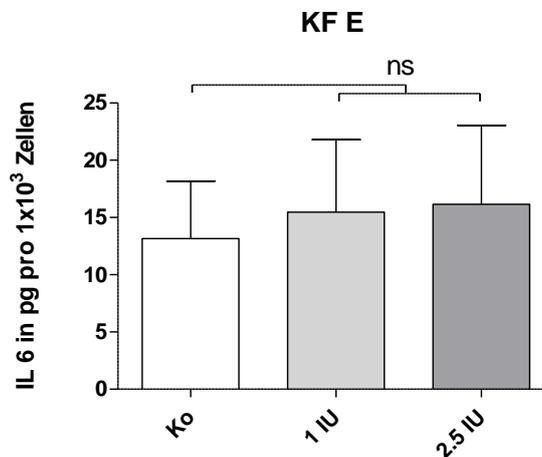


▲ Abb. 41: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) C.

Abb. 36-43: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und den einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-E mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF: n=4, KF A-E: n=3).



▲ Abb. 42: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) D.

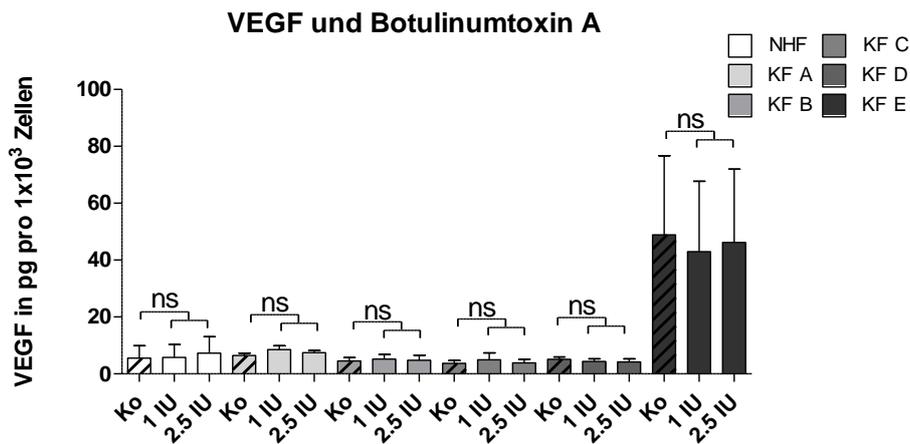


▲ Abb. 43: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) E.

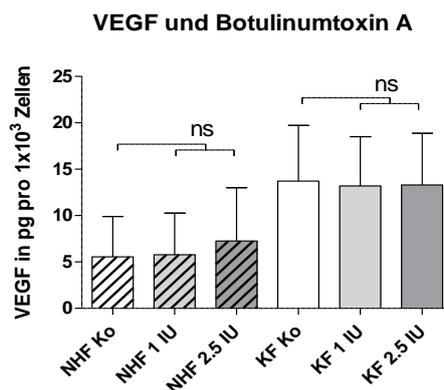
Abb. 36-43: Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und den einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-E mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (NHF: n=4, KF A-E: n=3).

4.2.3.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

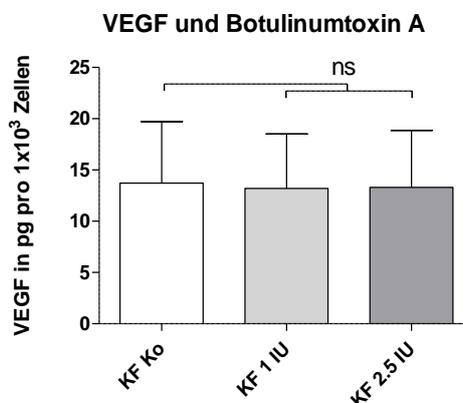
Unter dem Einfluss von BT A zeigte sich sowohl bei den NHF als auch bei KF A-E keine signifikant veränderte Expression von VEGF auf Proteinebene gegenüber der Kontrolle. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Höhe der Konzentration des BT A (1.0 IU und 2.5 IU) (Abb. 44-52). Die Betrachtung der Keloidfibroblasten als Gesamtheit ergab ebenfalls keine Signifikanzen (Abb. 45, 46).



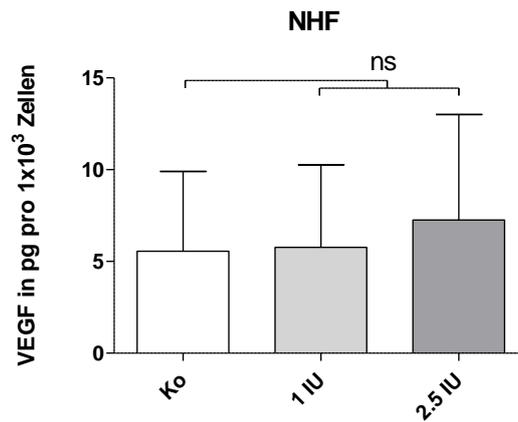
▲ Abb. 44: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) A-E und normalen dermalen Fibroblasten (NHF) mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=4).



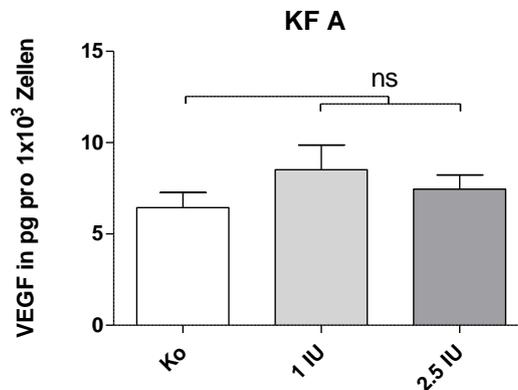
▲ Abb. 45: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in allen Keloidfibroblasten (KF) A-E insgesamt und in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).



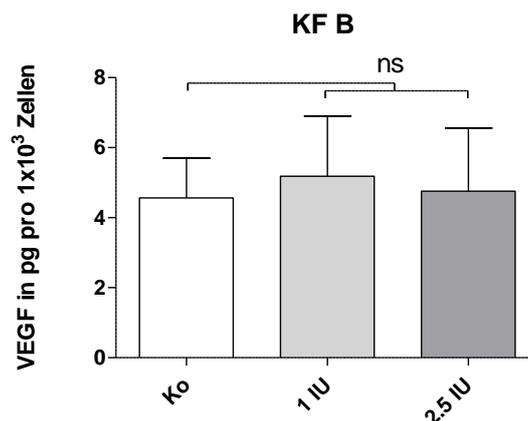
▲ Abb. 46: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in allen verwendeten Keloidfibroblasten (KF) A-E insgesamt.



▲ Abb. 47: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).

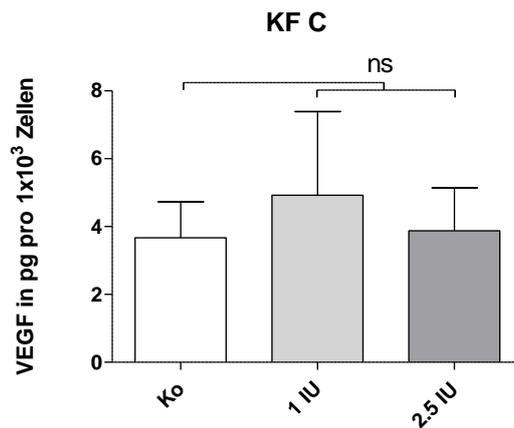


▲ Abb. 48: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) A.

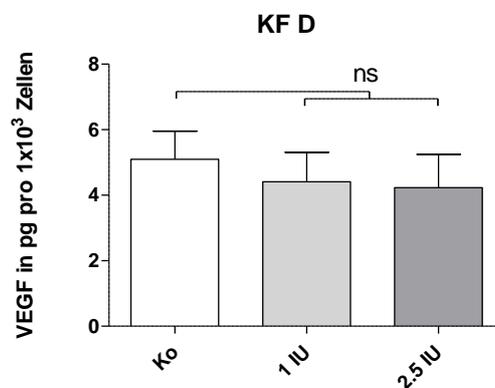


▲ Abb. 49: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) B.

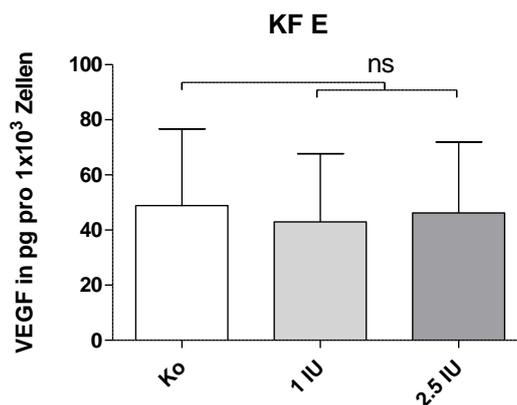
Abb. 45-52: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und den einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-E mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n=4$).



▲ Abb. 50: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) C.



▲ Abb. 51: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) D.

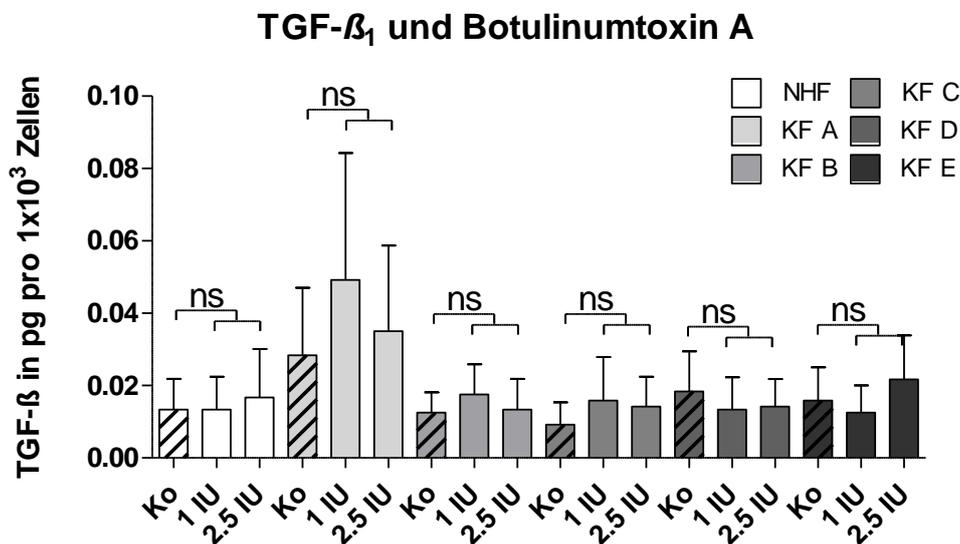


▲ Abb. 52: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) E.

Abb. 45-52: Proteinexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und den einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-E mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=4).

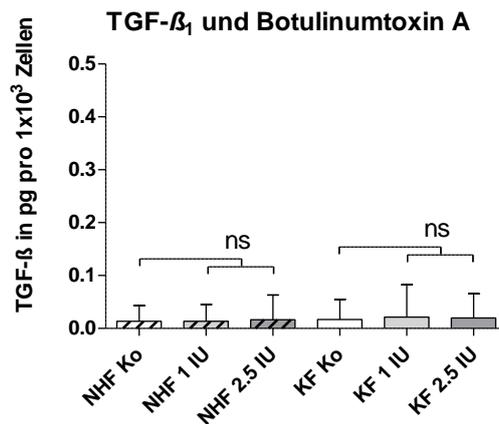
4.2.3.3 Transforming growth factor β_1 (TGF- β_1)

Die Expression von TGF- β_1 auf Proteinebene war durch die Inkubation mit BT A weder bei NHF noch bei den Keloidfibroblasten A-H signifikant verändert gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Dieses Ergebnis zeigte sich unabhängig von der Höhe der Konzentration des BT A (1.0 IU und 2.5 IU) (Abb. 53-61). Auch bei Betrachtung aller Keloidfibroblasten als Gesamtheit ergaben sich keine Signifikanzen (Abb. 54, 55).

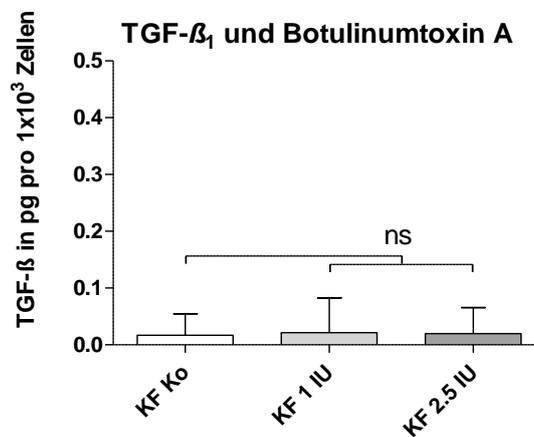


▲ Abb. 53: Proteinexpression des *transforming growth factor* β (TGF- β) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und den einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-E mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=4).

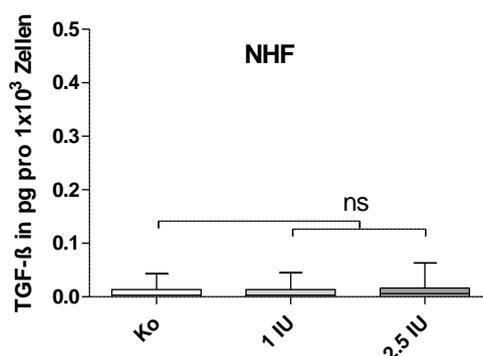
Insgesamt war die Expression des *transforming growth factors* β_1 in allen untersuchten Fibroblastenkulturen gerade noch im detektierbaren Bereich.



▲ Abb. 54: Proteinexpression des *transforming growth factor* β₁ (TGF-β₁) in allen verwendeten Keloidfibroblasten (KF) A-E insgesamt und in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).

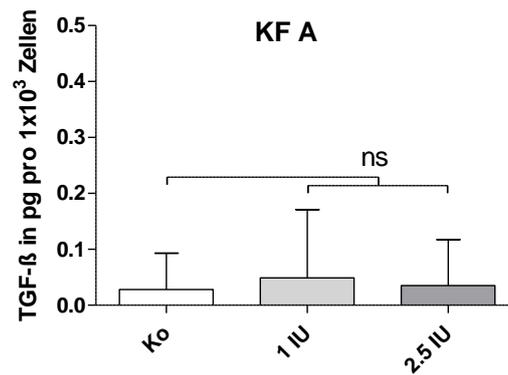


▲ Abb. 55: Proteinexpression des *transforming growth factor* β₁(TGF-β₁) in allen verwendeten Keloidfibroblasten (KF) A-E insgesamt.

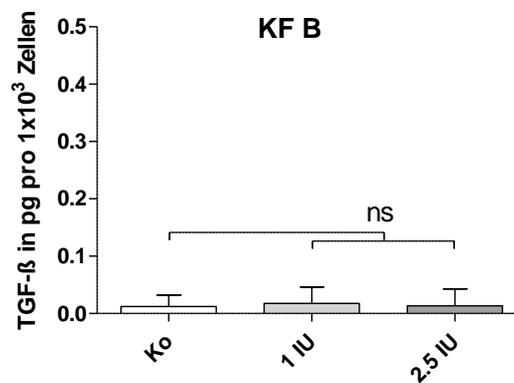


▲ Abb. 56: Proteinexpression des *transforming growth factor* β₁ (TGF-β₁) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).

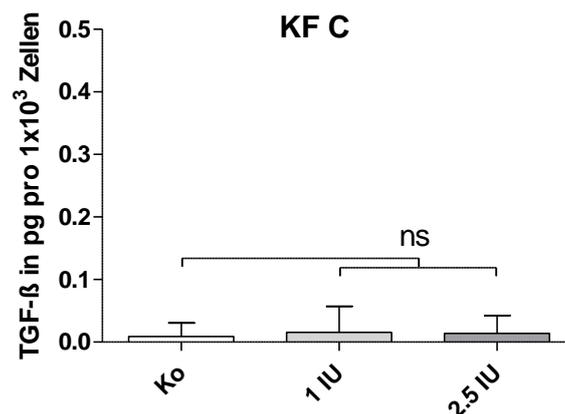
Abb. 54-61: Proteinexpression des *transforming growth factor* β₁ (TGF-β₁) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und den einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-E mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=4).



▲ Abb. 57: Proteinexpression des *transforming growth factor* β_1 (TGF- β_1) in Keloidfibroblasten (KF) A.

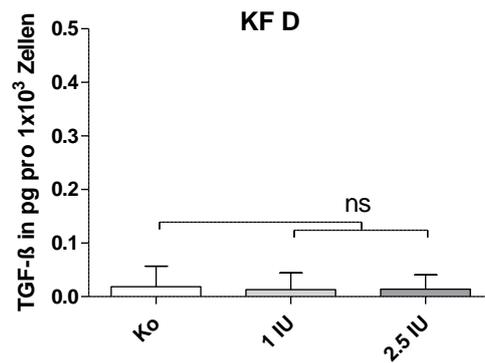


▲ Abb. 58: Proteinexpression des *transforming growth factor* β_1 (TGF- β_1) in Keloidfibroblasten (KF) B.

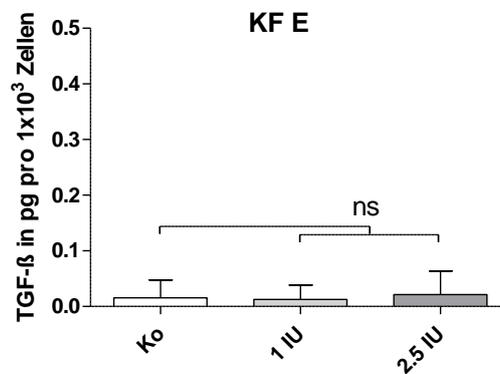


▲ Abb. 59: Proteinexpression des *transforming growth factor* β_1 (TGF- β_1) in Keloidfibroblasten (KF) C.

Abb. 54-61: Proteinexpression des *transforming growth factor* β_1 (TGF- β_1) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und den einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-E mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h, detektiert mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=4).



▲ Abb. 60: Proteinexpression des *transforming growth factor* β_1 (TGF- β_1) in Keloidfibroblasten (KF) D.



▲ Abb. 61: Proteinexpression des *transforming growth factor* β_1 (TGF- β_1) in Keloidfibroblasten (KF) E.

Abb. 54-61: Proteinexpression des *transforming growth factor* β_1 (TGF- β_1) in *normal human fibroblasts* (NHF) und den einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-E mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU und 2.5 IU pro 4 ml NHF-Nährmedium) für 72 h, detektiert mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=4).

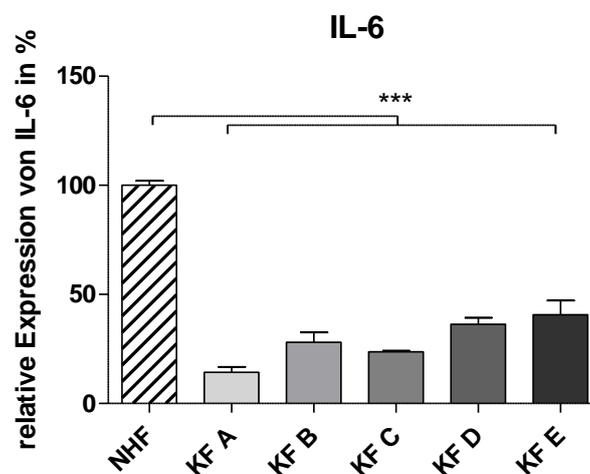
4.3 Genexpression

4.3.1 Basale Werte

Die basale Expression der Faktoren IL-6 und VEGF wurde nach Analyse auf Proteinebene mittels ELISA auch auf RNA-Ebene im Zuge der quantitativen *real-time* PCR (qRT-PCR) untersucht.

4.3.1.1 Interleukin 6 (IL-6)

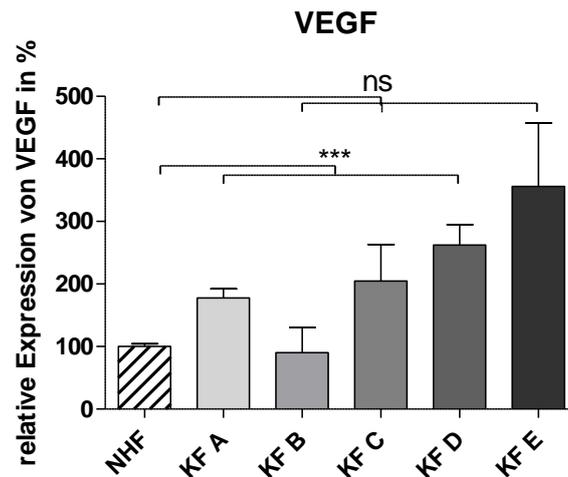
Die Keloidfibroblasten (KF) A-E zeigten auf RNA-Ebene eine hochsignifikant ($p < 0,001$) erniedrigte Expression von IL-6 gegenüber NHF als Kontrolle (Abb. 62). Im Einzelnen betragen die Expressionswerte bei KF A 14,30% ($p < 0,0001$), bei KF B 28,05% ($p < 0,0001$) und für KF C 23,65% ($p < 0,0001$) der Kontrolle. Bei KF D ergab die Analyse eine um 63,70% ($p < 0,0001$) und im Fall von KF E um 59,36% ($p < 0,0001$) niedrigere relative Expression.



▲ **Abb. 62:** relative Genexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach Inkubation für 96 h in NHF-Medium, ermittelt durch quantitative PCR (qRT-PCR). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung ($n=3$).

4.3.1.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

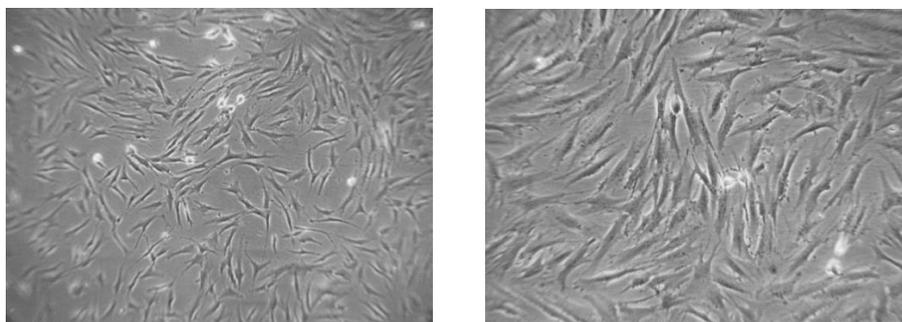
Die Analyse der relativen Expression von VEGF ergab für NHF und die Keloidfibroblasten A-E keine signifikant abweichende Expression bei KF B, KF C und KF E. Eine signifikante Erhöhung der relativen Expression gegenüber NHF zeigte sich bei KF A um 77,72% ($p < 0,0001$) und bei KF D um 162,14% ($p = 0,0002$) (Abb. 63).



▲ Abb. 63: relative Genexpression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach Inkubation für 96 h in NHF-Medium, ermittelt durch quantitative PCR (qRT-PCR). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=3).

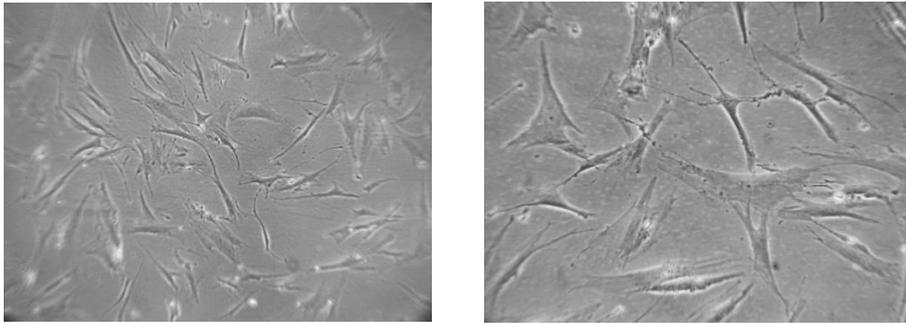
4.4 Digitale Fotografien der Zellen

Sowohl die NHF als auch die Keloidfibroblasten (KF) A-E wurden am letzten Tag der Proliferationsversuche mittels Mikroskopfotographie in 5-facher und 10-facher Vergrößerung abgelichtet. Die nähere Betrachtung ergab teilweise Unterschiede bezüglich Zellgröße, Zellform sowie Siedlungsmuster. Die NHF zeigten die für Fibroblasten typische Morphologie mit spindelförmiger Gestalt der Zellkörper und zahlreichen zytoplasmatischen Fortsätzen unter Ausbildung eines engmaschigen Fibroblastennetzes mit zum Teil paralleler Anordnung der Zellen (Abb. 64).



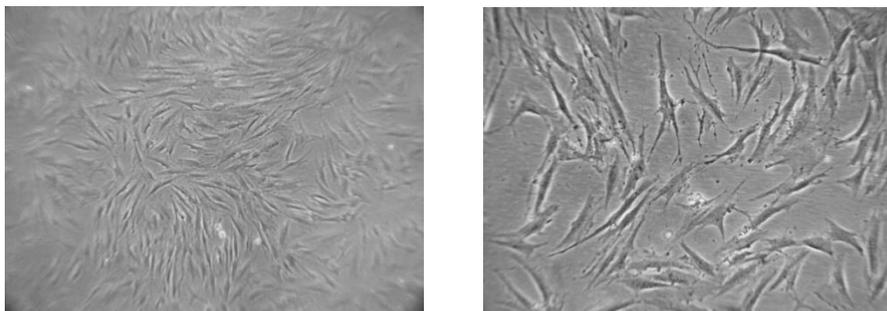
▲ Abb. 64: NHF, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.

KF A wiesen im direkten Vergleich mit den NHF deutlich größere Zellkörper mit weniger stark ausgeprägter Spindelform auf. Auch das Siedlungsmuster zeigte eine geringere Vernetzung und räumliche Beziehung der Zellen untereinander. Die Fibroblasten erschienen stark verbreitert und weniger strukturiert als die NHF (Abb. 65).

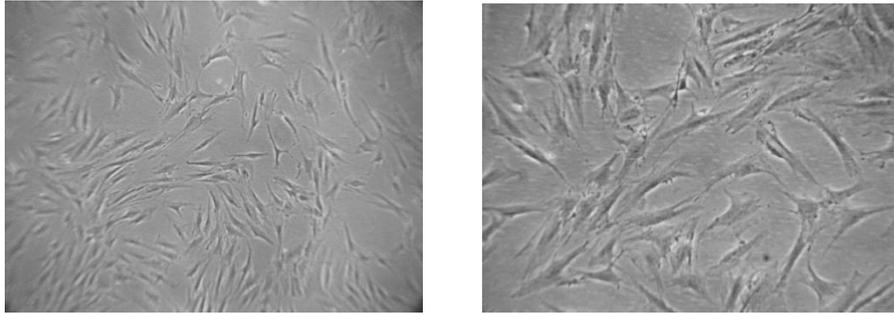


▲ **Abb. 65:** KF A, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.

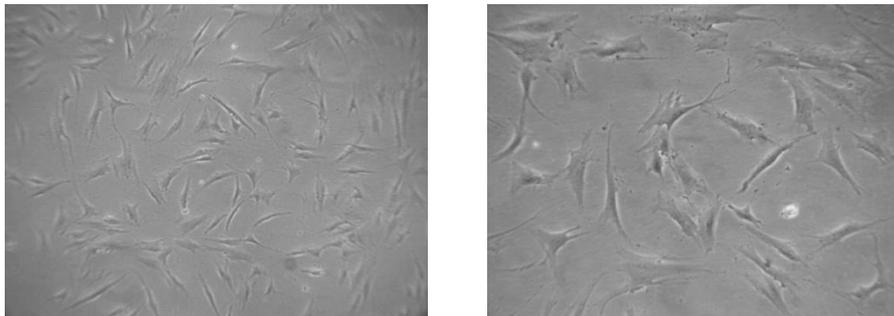
Ähnliches zeigte sich bei den Keloidfibroblasten (KF) B-E. Sie waren im Vergleich zu den NHF ebenfalls vergrößert und ließen eine eher breitere Spindelform mit dicken Zellfortsätzen erkennen (Abb. 66-69). Besonders die Bildanalyse von KF D ergab sehr verkürzte und stark von der klassischen Fibroblastenform abweichende, leicht plump wirkende Zellkörper (Abb. 68). Die größte Ähnlichkeit zu NHF bezüglich des engmaschigen Siedlungsmusters und der Zellform gab es bei KF B und KF C (Abb. 66, 67).



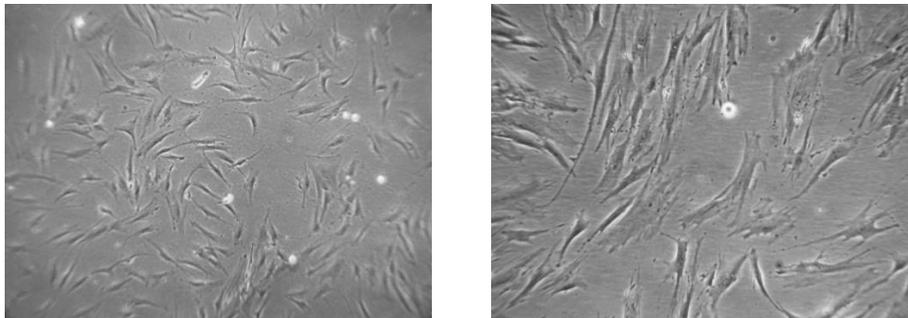
▲ **Abb. 66:** KF B, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.



▲ **Abb. 67: KF C**, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.



▲ **Abb. 68: KF D**, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.



▲ **Abb. 69: KF E**, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.

▲ **Abb. 64-69: Digitale Fotografien von NHF und KF A-E in 5-facher (links) und 10-facher (rechts) Vergrößerung.** Die Aufnahmen wurden mithilfe einer speziellen Kamera über einen Okularaufsatz am Mikroskop angefertigt. Als Zeitpunkt wurde das Ende der Proliferationsversuche kurz vor dem Abnehmen der Überstände und der Zellen gewählt.

5 Diskussion

5.1 Wachstumsverhalten der Zellen

5.1.1 Betrachtung des Wachstumsverhaltens von Keloidfibroblasten gegenüber normalen Fibroblasten

Keloide unterscheiden sich von normalen Narben durch exzessives Wachstum und Ausdehnung über die ursprünglichen Grenzen der Verletzung hinaus [14]. Es existieren zahlreiche Studien bezüglich der unterschiedlichen zellulären Aktivität von Keloidfibroblasten und Fibroblasten aus normaler Haut sowie aus reifen Narben. Mancini und Quaife beobachteten eine verlängerte hyperplastische Reaktion von Fibroblasten aus Wunden, welche sich später zu Keloiden entwickelten [104]. Auch Matsuko *et al.* zeigten eine erhöhte Fibroblastendichte in Keloiden im Vergleich zu normalem Granulationsgewebe. Sie vermuteten, dass die Fibroblastenproliferation in Keloiden *in vivo* erhöht ist [105]. Verschiedene Studien von Kirscher behandeln besonders die hyperzelluläre Natur der Keloide in ihrer frühen Entwicklungsphase [106-108]. Diese Unterschiede zwischen Fibroblasten aus Keloidgewebe und gesunder Haut verschwinden jedoch in der späteren Phase der Keloidentwicklung. Dann findet sich in Keloiden eine Proliferationsrate, welche nur noch ebenso groß oder geringer als in normalen Narben oder der Haut ist [104, 109]. Derartige Beobachtungen lassen vermuten, dass Keloidfibroblasten *in vivo* eine höhere Proliferationsrate aufweisen als normale dermale Fibroblasten, besonders in der frühen posttraumatischen Phase zu Beginn ihrer Entwicklung [110]. Gegensätzliche Ergebnisse zeigen hingegen *in vitro* Studien. Hier ergaben sich ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten für Keloidfibroblasten und normale Fibroblasten unter Standardbedingungen *in vitro* [109, 111-114]. Diegelmann *et al.* fanden beispielsweise keine Unterschiede zwischen Keloidfibroblasten und normalen humanen dermalen Fibroblasten in der *log*-Phase und der stationären Phase [112]. Eine *in vitro* Studie von McCoy *et al.* stellte zudem keine Unterschiede in der Lebensspanne von Keloidfibroblasten im Vergleich zu NHF unter Standardkulturbedingungen fest [113]. Calderon *et al.* formulierten in diesem Zusammenhang die Hypothese, dass die widersprüchlichen Aussagewerte dieser Beobachtungen mit den stabilen Kultivierungsbedingungen während der *in vitro* Studien in Verbindung stehen könnten [110]. In dieser Dissertation wurde das Wachstumsverhalten von Keloidfibroblasten *in vitro* untersucht und ein direkter Vergleich der einzelnen Keloidkulturen untereinander und zu normalen dermalen Fibroblasten als Kontrolle vollzogen. Sowohl die Ergebnisse des Resazurin-Assays als auch der 6-Well-Versuche zeigten eine gegenüber

den NHF signifikant verringerte Proliferationsrate für alle untersuchten Keloidkulturen. Die Keloidfibroblasten erreichten vereinzelt nur 17% des NHF-Wertes, maximal 95%. Diese Werte unterstützen somit die Ergebnisse anderer *in vitro* Studien [109, 111-114] und stehen ebenso wie diese im Widerspruch zu den *in vivo* Experimenten [104-108]. Eine mögliche Ursache hierfür könnte der Entwicklungsstand der Keloide sein, aus welchen die jeweiligen Fibroblasten gewonnen wurden. Möglicherweise stammen die Keloidkulturen mit vergleichsweise hoher Proliferationsrate aus noch jungen, unreifen Keloiden und zeigen daher eine noch verstärkte Vermehrungstendenz. Dies würde die Hypothese von Calderon *et al.* unterstützen [110]. Auch der Vergleich der einzelnen Keloidkulturen untereinander zeigte signifikante Schwankungen der Proliferation aller patientenspezifischer Fibroblasten. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in den unterschiedlichen Reife- und Entwicklungszuständen der verwendeten Keloide zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

Varmeh *et al.* untersuchten des Weiteren die Proliferation von Fibroblasten der Keloidränder sowie aus tiefer gelegenen zentralen Keloidbereichen. Zusätzlich verwendeten sie Fibroblasten normaler Haut als Kontrolle [115]. Die Proliferation der Fibroblasten des Randbereichs verhielt sich ähnlich wie diejenige der NHF. Die Keloidfibroblasten aus der tieferen Schicht zeigten jedoch eine wesentlich langsamere Vermehrungsrate. Die Autoren vermuteten zudem, dass Keloidfibroblasten ihre Proliferationsfähigkeit früher verlieren als NHF [115]. Allgemein besteht einer der gemeinsamen Aspekte zwischen Keloiden und malignen Tumoren in ihrer Fähigkeit zur verlängerten zellulären Proliferation [116]. Nach einer bestimmten Periode beenden Keloidfibroblasten jedoch ihre beschleunigte Zellvermehrung. Daher bleibt das Verhalten der Keloide grundsätzlich benigne [115]. Dies würde mit den Ergebnissen dieser Dissertation übereinstimmen, wenn man davon ausgeht, dass die verwendeten Keloidfibroblasten bereits die Anfangsphase der erhöhten Vermehrungsrate überschritten hätten. Insgesamt lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Fibroblastenproliferation von verschiedenen Faktoren abhängt und davon essentiell beeinflusst wird. Dabei handelt es sich vermutlich um den Reifegrad des Keloids sowie der genauen Entnahmestelle. Dies könnte der Grund für die so uneinheitlichen Ergebnisse der einzelnen Fibroblastenkulturen in den Experimenten dieser Dissertation sein. Andererseits könnten die Daten auch dafür sprechen, dass jedes Keloid für sich ein tendenziell anderes Verhaltens- und Wachstumsmuster aufweist und daher bis heute noch kein einheitliches Therapiekonzept gefunden werden konnte, welches einen Behandlungserfolg und Rezidivfreiheit bei der Mehrheit der Patienten gewährleisten kann. Weitere Studien mit Fibroblasten aus derselben Keloidregion mit gleichem Entwicklungsstand und gleicher Passage dürften erforderlich sein.

Eine Studie von Naylor *et al.* [117] beschäftigte sich zudem mit einer die Fibroblasten beeinflussenden Zellgruppe, den Fibrozyten, welche sich von den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) ableiten. Als Leukozyten-Subpopulation erhöhen Fibrozyten innerhalb eines Wundareals die Anzahl der Fibroblasten und deren Kollagenproduktion [118]. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass die PBMCs von Keloidpatienten eine stärkere Tendenz zur Differenzierung in Fibrozyten aufweisen [117]. Daher untersuchten sie die Kultivierung isolierter PBMCs von Keloidpatienten sowie einer Kontrollgruppe in serumfreiem Medium *in vitro* (jeweils n=10). Es zeigte sich eine fast 20-fach erhöhte Differenzierungsrate der PBMCs zu Fibrozyten für die Proben der Keloidpatienten gegenüber der Kontrolle [117]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine bei Keloidpatienten gesteigerte Fibrozytenbildung aus PBMCs einen möglichen Faktor in der Keloidpathogenese darstellen und dadurch die Vermehrung der Keloidfibroblasten steigern könnte. Da dieser Aspekt in unseren Versuchsansätzen nicht berücksichtigt wurde, könnte er möglicherweise einen der Gründe darstellen, weshalb die Proliferationsraten der Keloidfibroblasten *in vitro* geringer waren als die der normalen Fibroblasten.

5.1.2 Wachstumsverhalten von Keloidfibroblasten und normalen Fibroblasten nach mechanischer Belastung

Es ist bekannt, dass Keloide bevorzugt in Körperregionen auftreten, die erhöhte Mobilität aufweisen und vermehrter Spannung ausgesetzt sind [46]. Diese Narbenform kann als multifaktorielle Krankheit mit genetischer Prädisposition betrachtet werden, welche die Tendenz aufweist, sich von lokalen Störfaktoren wie mechanischer Krafteinwirkung beeinflussen zu lassen [119]. Es gibt zahlreiche Berichte, die eine mögliche Verhinderung der Ausbildung von Keloide oder hypertrophen Narben bzw. deren Rezidiven durch Reduktion mechanischer Kräfte auf die heilende Wunde beschreiben [120-122]. Auf der Basis dieser Beobachtungen konzentrierten sich Ogawa *et al.* 2011 in ihrer Studie darauf, während und nach chirurgischer Entfernung von Keloide und hypertrophen Narben die Hautspannung zu reduzieren. So sollte die Ausbildung eines Rezidivs vermieden werden [18]. Die Behandlung großer Keloidläsionen vollzogen sie daher mittels chirurgischer Exzision und anschließender subkutaner Nahttechnik mit geringer Spannung der Wundränder. Außerdem wurde eine Hautlappentechnik mit möglichst minimaler Zugwirkung auf die Wunde durch Belassen einer Fettschicht an der Lappenunterseite durchgeführt. 20 Patienten mit großen Keloide wurden mit dieser Lappentechnik und zusätzlich

postoperativer Radiotherapie behandelt. Als Resultat zeigte sich bei allen Patienten ein komplikationsarmer postoperativer Verlauf ohne Auftreten von Rezidiven. Die Autoren vermuten prinzipiell, dass die Mechanismen, die zur Bildung abnormer Narben führen, eine stark ausgeprägte und verlängerte Entzündungsphase einschließen [123], welche durch mechanische Kräfte auf die Haut ausgelöst wird [124, 125]. Hierbei nehmen ihrer Ansicht nach die mechanischen Kräfte die herausragende Rolle unter den kausalen Faktoren ein [18]. Es wurde auch festgestellt, dass sich bei der Verteilung von Krafteinwirkung um Keloide herum eine hohe Hautspannung an den Keloidrändern, eine geringe hingegen im Narbenzentrum findet [126]. Die Hautsteifigkeit in der Keloidumgebung korreliert zudem direkt mit dem Grad der Hautspannung. Diese Beobachtung erklärt, warum Keloide im Zentrum ihr Wachstum abstoppen, und Keloidexpansion in der Richtung des vorherrschenden Hautzugs auftritt [18]. In diesem Zusammenhang wird auch vermutet, dass sich die Wachstumsmuster von hypertrophen und normalen Narben eben aufgrund ihres unterschiedlichen Ansprechens auf diese Hautspannung von dem der Keloide unterscheiden [126]. Eine statistische Studie über 1034 anatomische Regionen an japanischen Patienten zeigte, dass Keloide an spezifischen Stellen wie vorderer Brust, Schulter, Skapula und suprapubischer Region auftreten [127]. Im Gegensatz hierzu treten hypertrophe Narben überall am Körper auf [18]. 2012 untersuchten Ogawa *et al.* [119] des Weiteren, inwiefern Körperflächen, die stärkerer Belastung während normaler Aktivitäten ausgesetzt sind, mit Arealen korrelieren, die erhöhte Raten an Keloiden nach Verletzung zeigen. Zum einen prüften sie die Hautspannungs- und Kontraktionsraten von neun verschiedenen Körperstellen. Zusätzlich wurde die Lokalisation von 1500 Keloiden bei 483 Patienten bestimmt und ihre Verteilung auf die neun Körperregionen beschrieben. Die Parietalregion und der Schienbeinbereich waren mit der geringsten Spannung bzw. Kontraktion assoziiert, während die suprapubische die höchsten Werte aufwies. Bezüglich der Keloidverteilung waren 733 im anterioren Brustbereich (48,9%) und 403 in der Skapularegion (26,9%) lokalisiert. Es fanden sich keine Keloide im Bereich der Kopfhaut und dem Schienbein, auch bei Patienten mit sonst zahlreichen Keloiden. Da diese Stellen kaum Hautstreckung oder Kontraktion ausgesetzt sind, scheint mechanische Krafteinwirkung ein wichtiger Trigger zu sein, der die Keloidbildung bei Patienten mit genetischer Prädisposition induziert [119]. Daher sind Studien zur Mechanotransduktion nützlich bei der Entwicklung klinischer Methoden zur Reduktion der Hautspannung im Bereich von Wunden und Narben zur Vorbeugung und Behandlung von Keloiden und hypertrophen Narben [119]. Studien zur Beziehung zwischen Hautspannung und Keloiden lassen zudem vermuten, dass die charakteristischen Schmetterlings-, Krebscheren- und Hantelformen der Narbengeschwulste größtenteils durch Richtung der mechanischen Kräfte auf die Wunde

und deren Umgebung bestimmt werden [123, 127]. Ogawa *et al.* vermuteten, dass auch bei genetisch prädisponierten Patienten Hautspannung bzw. mechanische Krafteinwirkung von außen nötig ist, um die Keloidbildung auszulösen [119]. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Regionen mit der höchsten Mobilität nicht vollständig mit den Ergebnissen der Keloidverteilung korrelieren. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass nicht nur Hautspannung, sondern auch die Hautstruktur die Entwicklung pathologischer Narben beeinflussen [119]. Studien die Ogawa *et al.* unterstützen sind Versuchsreihen, in welchen mittels servokontrollierten Geräten die Rückenhaut von Mäusen gedehnt wurde [128, 129]. Hier konnte gezeigt werden, dass die gestreckten Proben eine hochregulierte epidermale Proliferation und Angiogenese aufwiesen. Dabei handelt es sich um charakteristische Merkmale von Keloiden und hypertrophen Narben [128, 129]. Insgesamt sind mechanische Kräfte starke Modulatoren zellulärer Vorgänge, die zur abnormen Narbenbildung führen [130]. Aus diesen Gründen wurde der Einfluss mechanischer Krafteinwirkung auch im Rahmen dieser Dissertation untersucht. Zur Stimulation des mechanischen Zelltraumas wurde für diese Studie eine Apparatur zur zyklischen Dehnung von Zellen entwickelt. Die vorliegenden Daten entstammen aus Vorversuchen. Während des Studienzeitraums war aus technischen Gründen lediglich eine Dehnung im Minutentakt möglich. Dieser Versuchsaufbau entspricht daher nur bedingt der physiologischen Situation hinsichtlich der mechanischen Belastung einer Wunde. Es sollte eruiert werden, ob mechanische Störkräfte in Form von Dehnung einen Differenzierungsreiz auf die Keloidfibroblasten ausüben können. Es zeigte sich jedoch weder bei einer der untersuchten Keloidkulturen noch bei NHF eine veränderte Proliferationsrate unter Einwirkung der Kräfte. Diese Daten unterstützen also prinzipiell nicht die Vermutung, dass die Zuführung mechanischer Kräfte zu einer Steigerung der Proliferationsrate in Keloiden führt. Folgeversuche mit einer höherfrequenten Dehnungsrate erscheinen jedoch erforderlich.

Eine Arbeit von Calderon simulierte einen anderen mechanischen Einfluss auf Keloide [110]. Calderon *et al.* untersuchten hier in einem *in vitro* Modell die Hypothese, dass Fibroblasten aus Keloidgewebe nach künstlicher Verletzung eine in höherem Maß verstärkte Proliferation zeigen würden als normale humane dermale Fibroblasten (NHDF). Für den Versuchsablauf wurde eine speziell entwickelte Vorrichtung mit einer 25-er Nadel zur reproduzierbaren Abtragung von 16-20% der Zellen vom konfluenten Zellrasen verwendet. Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung zeigten, dass 24 und 48 h nach *in vitro* Verletzung der prozentuale Anstieg der Zellzahl sowohl bei den Keloidfibroblasten als auch bei den NHDF in der Gruppe der verletzten Fibroblasten signifikant stärker war als bei der Kontrolle. Die Differenz zwischen experimenteller Gruppe und Kontrollgruppe war wiederum bei den

Keloidfibroblasten signifikant größer als bei den NHDF [110]. Nach 72 h und 96 h waren jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr messbar. Als Grund hierfür vermuteten die Autoren entweder, dass der Zellrasen nach 72h bereits überfüllt war oder, dass die *in vitro* Wunde zu diesem Zeitpunkt bereits abgeheilt war [110]. Calderon *et al.* stellten die Hypothese auf, dass die erhöhte Proliferationsrate als Reaktion auf Verletzung, kombiniert mit der Eigenschaft der Keloidzellen, erhöhte Mengen an Kollagen und anderen Matrixmolekülen zu synthetisieren [131-138], zur Vermehrung von exzessivem fibrösem Gewebe in Keloiden beiträgt [110]. Diese Ergebnisse widersprechen der vorliegenden Studie zum Teil. Im Gegensatz hierzu [110] wurde die Proliferation in der vorliegenden Studie erst nach 72 h gemessen und nicht bereits nach 24 h. Bei Calderon *et al.* handelte es sich allerdings um ein einmalig zugefügtes Trauma, hier hingegen wurde ein zyklisch wiederholtes Trauma zugefügt.

5.1.3 Wachstumsverhalten nach Inkubation mit Botulinumtoxin A

Ein wichtiger Aspekt in der vorliegenden Dissertation ist die Eruiierung der Effekte von Botulinumtoxin A (BT A) in patientenspezifischen Zellkulturen humaner Keloide. Das Ziel war, die möglichen Einflüsse von BT A auf die Zellproliferation und, wie später erläutert, die Sekretion wundheilungsrelevanter Zytokine zu evaluieren.

Injektionen von BT A in Keloide repräsentieren ein Therapiekonzept, das sich grundsätzlich von dem Denkansatz unterscheidet, Wunden zu Beginn der Heilungsphase zu immobilisieren. Denn nicht die umgebende Muskulatur, sondern neoplastische Fibroblasten, werden so zum therapeutischen Angriffspunkt. Ziel ist somit weniger eine Reduktion der Entzündung durch die Ruhigstellung. Im Vordergrund stehen vielmehr trophische und metabolische Veränderungen innerhalb des Keloids [139]. Ein weiterer Unterschied ist der Zeitpunkt der Injektion. Während das Botulinumtoxin A zur Behandlung und Ruhigstellungfazialer Wunden bereits direkt nach dem Eingriff im Gesichtsbereich injiziert wird, liegt der Zeitpunkt hierfür in der Keloidbehandlung erst spät im Wundheilungsprozess [139].

Im Jahre 2008 veröffentlichten Zhibo *et al.* den ersten Bericht, der einen klinischen Erfolg von Botulinumtoxin-A-Injektionen bei Keloiden beschrieb [90]. Diese Studie betraf zwölf Patienten, welchen Botulinumtoxin A in Intervallen von drei Monaten über einen Zeitraum von maximal neun Monaten intraläsional injiziert wurde. Die Konzentrationen reichten von 70

bis 140 Einheiten pro Sitzung. Bei dem verwendeten Botulinumtoxin A handelte es sich um ein in Klinik und Forschung weniger weit verbreitetes Produkt. Produziert wurde es von der Lanzhou Biocompany in China. Der Therapieerfolg wurde mittels Patientenzufriedenheit, fotografischer Dokumentation und Prüfung durch einen unabhängigen Beobachter beurteilt. Die Bewertung der Fortschritte erfolgte auf der Grundlage von klinisch beobachteten Veränderungen in Größe und Umriss der Läsion. Bei allen Patienten konnte eine Verkleinerung und Abflachung der Keloide festgestellt werden. Es fand zeitgleich keine andere Therapiemaßnahme statt. Ein Jahr nach Therapieabschluss waren bei keinem der Patienten Anzeichen für eine Rückkehr der Symptome oder der Läsion erkennbar [90, 140]. Zhibo bezog sich auf eine Studie von Xiao *et al.* [141], welche Effekte von Botulinumtoxin A auf die Proliferation von Fibroblasten aus hypertrophen Narben berichteten. Die Ergebnisse von Xiao *et al.* [141] stammten aus Versuchen mit Fibroblasten aus acht Gewebeproben hypertropher Narben und wiesen auf einen antiproliferativen Effekt von BT A hin. Eine andere *in vitro* Studie befasste sich mit den Auswirkungen einer Inkubation mit BT A auf mikrovaskuläre Endothelzellen und Fibroblasten hinsichtlich Zellproliferation und Zytokinsynthese [142]. Die Versuche wurden an Fibroblasten aus gesunder, menschlicher Haut unter Verwendung des BT A in Konzentrationen von 1.0 IU, 2.5 IU, 5.0 IU und 10.0 IU durchgeführt. Die Inkubationszeiten betragen 48 und 72 Stunden. Es zeigten sich keine Veränderungen der Zellproliferation nach der Inkubation bei beiden Zellkulturen. Auch die Expression der untersuchten Zytokine und Wachstumsfaktoren (IL-6, MCP-2, VEGF, M-CSF, bFGF) war unverändert [142]. In der vorliegenden Studie wurden die Effekte einer Inkubation mit BT A auf normale dermale Fibroblasten (NHF) und Keloidfibroblasten (KF) verschiedener Patientenproben untersucht. Die Ergebnisse der Resazurin-Assays zeigen keine Beeinflussung der NHF-Proliferation durch das BT A, nur bei einer Konzentration von 5.0 IU war eine um 5% signifikant reduzierte Zellzahl feststellbar. Dies spricht nicht für eine konstante Beeinflussung der NHF durch BT A und deckt sich mit den Ergebnissen von Haubner *et al.* [142]. Die Daten zu den patientenspezifischen Zellkulturen aus Keloidläsionen unterstützen nicht die von Zhibo *et al.* vermutete Inhibition der Zellvermehrung durch BT A. Nach Inkubation für 48 und 72 Stunden mit zunehmenden Konzentrationen von BT A (1.0 IU bis 10.0 IU) und Fluoreszenzmessung nach Resazurin-Inkubation wurden nur minimale Differenzen von $\leq 10\%$ in der Zellviabilität beobachtet bei Vergleich der experimentellen und der Kontroll-Gruppe. Die einzelnen Keloidfibroblasten A-H zeigten nur minimale Veränderungen unter dem Einfluss des BT A. KF C, D und H wiesen bei keiner der eingesetzten Konzentrationen von BT A ein signifikant verändertes Zellvermehrungsverhalten auf. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Zellzahlbestimmung im 6-Well-System nach Inkubation mit 1.0 IU und 2.5 IU BT A für 72 h und anschließender

Zellzählung im *Cedex XS Analyzer*. Hier war nur ein signifikanter Anstieg der Proliferation bei KF C um 18% bei 1.0 IU messbar. Ansonsten zeigten sich keine signifikanten Schwankungen der Zellzahl durch den Einfluss des BT A, ebenso bei den NHF. Infolgedessen unterstützen diese Daten insgesamt nicht die Hypothese, dass die Injektion von Botulinumtoxin A einen Rückgang von Keloidgewebe durch Hemmung der Zellvermehrung bewirkt.

In vitro Studien über die Effekte von BT A auf Keloidfibroblasten konnten in der derzeitigen Literatur nicht gefunden werden. Xiao *et al.* [141] lieferten zwar mit ihrer Studie über den Einfluss von BT A auf Fibroblasten aus hypertrophen Narben einen interessanten Aspekt, allerdings ist in diesem Zusammenhang auf die Vielzahl an Unterschieden zwischen Keloiden und hypertrophen Narben zu verweisen. Diese beiden Narbenarten zeigen im Hinblick auf die zugrundeliegende Pathophysiologie, ihr klinisches Verhalten und das Ansprechen auf Therapiemaßnahmen fundamental unterschiedliche Charakteristika [15, 143]. Die Entwicklung der hypertrophen Narbe ist verbunden mit Spannung und kontinuierlicher mechanischer Irritation der heilenden Wunde. Eine Verminderung der Narbenhypertrophie kann durch Reduktion mechanischer Spannung im Läsionsbereich während der Heilungsphase bewirkt werden [139]. Der vermutliche Mechanismus, der dem therapeutischen Effekt einer Chemoimmobilisation auf hypertrophe Narben zugrunde liegt, ist die Reduktion wiederholter Mikrotraumen. Daraus folgt wiederum die Verminderung der chronischen Entzündungsstimuli auf die Narbenbildung [58, 144-147]. Dies sind Gründe, weshalb die Ergebnisse einer Studie mit hypertrophen Narben nicht auf Keloid-Experimente übertragen werden sollten. Zudem sind weitere *in vitro* Daten nötig, um die Ergebnisse dieser Studie zu bestätigen. Die Autoren zeigten hier durch ELISA-basierte Messungen von TGF- β_1 und Proliferations-Assays mit Farbmessung, dass durch BT A sowohl die Fibroblastenproliferation gehemmt als auch die Expression von TGF- β_1 vermindert war. Die Hemmung der Zellvermehrung erwies sich als dosisabhängig. Die Inkubationszeit betrug 1 bis 5 Tage [141].

Zhibo *et al.* [90] bezeichneten die genauen Mechanismen, welche einen Therapieerfolg in Keloiden durch Botulinumtoxin A bewirken könnten, als unklar und komplex. Die erste Hypothese hierzu bezog sich ebenfalls auf die Verminderung der Kontraktion von Muskeln und Haut nahe dem Keloidgewebe mit Senkung der Zugspannung während der Narbenbildung. Als zweite Theorie wurde aufgeführt, dass BT A die sekretomotorischen und trophischen Funktionen der Zellen unterdrücken könnte [90]. Bis jetzt ist jedoch der einzige

bewiesene Mechanismus von Botulinumtoxin A die Hemmung der Acetylcholin-Freisetzung an der neuromuskulären Endplatte [139, 148].

5.2 Proteinexpression und Genexpression

5.2.1 Basale Expression auf Proteinebene und Genniveau bei normalen und Keloidfibroblasten

5.2.1.1 Interleukin 6 (IL-6)

Keloide entwickeln sich im Allgemeinen nach einer Verletzung der Haut. Es wird vermutet, dass zahlreiche Faktoren die Ätiologie der Keloide beeinflussen. So verhält es sich beispielsweise mit der Exposition der Haut gegenüber Spannungen und Wundinfekten oder auch Fehlfunktionen des Immunsystems und genetischer Prädisposition [149, 150]. Die meisten dieser Faktoren sind involviert in Entzündungsreaktionen und Antworten des Immunsystems. Eine herausragende Rolle hierbei spielen die Zytokine. Diese, darunter besonders Interleukin 6 (IL-6), sind essentiell für die Kontrolle des Immunsystems und die interzelluläre Kommunikation [151]. Viele Studien zeigten bereits, dass Zytokine und insbesondere IL-6 in der Pathogenese fibroproliferativer Krankheiten mit erhöhter Kollagenproduktion mitwirken. So steht die IL-6-Produktion durch Fibroblasten in Verbindung mit der Pathophysiologie von Fibrosen in Assoziation mit rheumatoider Arthritis, progressiver Sklerodermie und pulmonaler interstitieller Fibrose [152-155]. Ebenso sind abnorme Wundheilungsläsionen wie die Keloide zu nennen [151]. Verschiedene Autoren beschrieben bereits eine erhöhte Genexpression sowie Synthese von IL-6 bei Keloidpatienten. Xue *et al.* [156] vermuteten aufgrund ihrer Ergebnisse eine erhöhte autokrine Regulation von IL-6 in Keloidfibroblasten. Dies würde für eine zentrale Rolle dieses Zytokins in der Pathogenese von Keloiden sprechen [156]. Es wurde auch gezeigt, dass IL-6 Fibroblasten zur Proliferation und Kollagensynthese anregt [157, 158]. Des Weiteren führt dieses Zytokin vermutlich durch Induktion der TGF- β_1 -Genexpression zur gesteigerten Kollagensynthese [151]. Fötale Wundheilung, welche gekennzeichnet ist durch minimale Entzündung und narbenlose Ausheilung, weist weniger Synthese von IL-6-Protein und IL-6-mRNA durch die fötalen Fibroblasten auf als bei adulten Fibroblasten. Applikation von IL-6 führt bei den fötalen Wunden wiederum zur Narbenbildung [159]. Insgesamt ist dieses Zytokin in zahlreiche biologische Prozesse involviert. Dies wurde unter anderem durch Studien an IL-6-defizienten Mäusen belegt [160, 161]. Als Resultat zeigten sich bei den Mäusen eine reduzierte Reepithelialisierung und Angiogenese sowie eine beeinträchtigte Wundheilung. Da dieses

Zytokin also eine wichtige Rolle in der Keloid-Pathogenese zu spielen scheint, wurde seine basale Expression durch die Keloidfibroblasten in der vorliegenden Dissertation bestimmt. Die Ergebnisse der einzelnen Keloidkulturen zeigten ein eher uneinheitliches Expressionsmuster. Bei KF A, B und C wurden signifikant erniedrigte Werte bestimmt. Die Expression war hier 69% bis 81% geringer als bei den NHF. Sonst ließ sich keine signifikant veränderte Proteinsynthese feststellen. Diese Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zur Studie von Xue *et al.* [156]. Hier wurden bis zu 6-fach erhöhte Werte für die IL-6-Synthese von Keloidfibroblasten im Vergleich zu normalen Fibroblasten ermittelt. Ghazizadeh *et al.* untersuchten 2007 die Rolle des IL-6-Signalwegs in der Keloidpathogenese und dessen Potenzial als therapeutisches Ziel in der Keloidbehandlung [162]. Die Autoren vermuteten, dass durch IL-6 vermittelte Entzündungen einen wichtigen Kernpunkt und einen der kausalen Faktoren der Keloidentwicklung darstellen könnten. Sie betrachteten die Hemmung des IL-6-Signalweges als Möglichkeit für neue therapeutische oder präventive Behandlungsansätze. Angriffspunkte der Hemmung wären in diesem Fall die IL-6-Rezeptoren, nachfolgende Effektoren oder andere Moleküle, die diesen Signalweg beeinflussen. Ghazizadeh *et al.* [162] zeigten zudem die Hochregulation von IL-6 sowie seiner Rezeptoren IL-6-R α und gp130 zusammen mit einer Anzahl nachgeschalteter Rezeptoren, einschließlich JAK 1, RAF 1 und ELK 1, auf mRNA- und Proteinebene in Keloidfibroblasten im Vergleich zu normalen Fibroblasten. Ihre daraus folgende Therapieoption beinhaltete die Stabilisierung der IL-6-Aktivität durch Inhibierung von IL-6, seiner Rezeptoren oder der dem IL-6-Signalweg nachgeschalteten Angriffspunkte [162]. In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten Mamiko *et al.* [163] die Auswirkung einer Radiotherapie auf Keloidfibroblasten und insbesondere deren IL-6-Expression. Auch hier zeigte sich eine Coexpression von IL-6 und seinem spezifischen Rezeptor IL-6-R α . Zudem ergab sich eine erhöhte IL-6-Synthese durch Keloidfibroblasten im Vergleich zu normalen Fibroblasten in den unbestrahlten Kontrollen. Die pathomechanische Bedeutung der Erkenntnisse der oben aufgeführten Studien ist noch unklar. Besonders vage bleibt bis jetzt, welcher der zahlreichen Signalwege, einschließlich derer von JAK/STAT-3- und ERK/MAP-Kinasen, für eine erhöhte Kollagenproduktion nach IL-6-Rezeptoraktivierung verantwortlich ist [164]. Es ist aber durchaus möglich, dass die Induzierung dieser Signaltransduktionswege, welche in Keloidfibroblasten aber nicht in NHF festgestellt wurden, noch in einer anderen phänotypischen Manifestation resultieren außer der Veränderungen der Kollagensynthese. Als Beispiel wäre eine verstärkte Zellproliferation zu nennen. Tatsache ist, dass eine präzise Unterbrechung der Signalübertragung von IL-6 möglicherweise neue Erkenntnisse für die Regulation der Kollagen-Genexpression in dermalen Fibroblasten mit pharmakologischer Intention bieten könnte [164]. Die Daten der

vorliegenden Studie ließen jedoch keinen Rückschluss auf Zusammenhänge zwischen IL-6 und dem Verhalten der Keloidfibroblasten zu.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von IL-6 auf Proteinebene in den patientenspezifischen Keloidkulturen decken sich nur zum Teil mit denen der Genexpressionsanalyse. Es sollte untersucht werden, inwieweit die Proteinexpression in Keloidfibroblasten in Abhängigkeit zur mRNA-Expression steht. In zahlreichen Studien wurde bereits ein Zusammenhang zwischen erhöhten Expressionswerten für IL-6 auf Protein- und Genniveau festgestellt [156, 162, 163]. Sowohl Ghazizadeh [162] als auch Xue *et al.* [156] beschrieben eine erhöhte Expression von IL-6 auf Protein- und mRNA-Ebene in Keloidfibroblasten verglichen mit normalen dermalen Fibroblasten. Eine Studie von Tosa *et al.* [163] beschäftigte sich zudem mit dem Einfluss von Bestrahlung auf Keloidfibroblasten und deren IL-6-Synthese. Ihre Daten zeigten eine Herabregulierung von IL-6-Genen in den Keloidfibroblasten als Folge der Bestrahlung. Die Autoren untersuchten daraufhin die Proteinexpression der bestrahlten Keloidfibroblasten und erkannten auch hier eine signifikante Erniedrigung der IL-6-Synthese. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen nicht die These, dass die Expression von IL-6 auf Proteinniveau und auf mRNA-Ebene in Keloidfibroblasten gegenüber normalen dermalen Fibroblasten erhöht ist. Die Genexpressionsanalyse stimmt jedoch zum Teil mit den Ergebnissen der Proteinsynthese überein. Hier zeigten alle KF ähnlich stark verringerte Werte um 60-85% gegenüber NHF auf mRNA-Ebene. Auf Proteinebene waren nur KF D und KF E nicht signifikant erniedrigt. Diese Ergebnisse stimmen somit weitgehend mit anderen Studien dahingehend überein, dass Interleukin 6 in Keloiden auf Proteinebene und mRNA-Niveau ähnlich exprimiert ist bzw. die Werte der Genexpression auch mit den Ergebnissen auf Proteinebene korrelieren

5.2.1.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Neben der erhöhten Sekretion von Zytokinen wie IL-6 ist auch VEGF während der Narbenbildung und Proliferation von Keloiden entscheidend [156, 165]. Diesem Faktor wird eine wesentliche Rolle während normaler und pathologischer Wundheilungsprozessen zugesprochen [166]. Als angiogenetisches Peptid für vaskuläre Permeabilität besitzt er eine Vielzahl an Isoformen und fördert Neovaskularisation und Zellwachstum [167, 168]. Keloide zeigen allgemein eine erhöhte Dichte an Blutgefäßen im Vergleich zu gesunder Haut oder

normalen Narben [7, 169, 170]. Die verstärkte Häufung von Blutgefäßen in der Keloidperipherie könnte ein Indiz dafür sein, dass die Keloidfibroblasten an dieser Stelle Angiogenese durch Synthese von VEGF betreiben [171]. Daher wird ein Zusammenhang zwischen VEGF und der Keloidpathogenese vermutet. Mit diesem Thema beschäftigten sich bereits einige Studien [166, 168, 172, 173]. Gira *et al.* [172] stellten eine erhöhte VEGF-Synthese in der unter Keloiden befindlichen Dermis fest. Von Wu *et al.* wurde über eine verstärkte Expression von VEGF in Keloidgewebe und Keloidfibroblasten im Vergleich zu normaler Haut berichtet. Dies belegten die Autoren mittels Western Blot und Northern Blot [173]. Zusätzlich machten Le *et al.* die Entdeckung, dass die VEGF-Akkumulation in den Zellen der Kapillargefäßauskleidung und den Fibroblasten der Papillarschicht der Dermis in Keloiden erhöht ist gegenüber normaler Haut [166]. Eine Anzahl an *in vitro* Studien haben bereits gezeigt, dass VEGF in Keloidfibroblasten höher exprimiert wird als in Fibroblasten normaler Haut [172-174]. Diese Ergebnisse werden auch durch die Daten der vorliegenden Dissertation unterstützt. Bei allen untersuchten patientenspezifischen Keloidkulturen zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von VEGF auf Proteinebene. Die Werte waren 5,8-bis 18,5-mal höher als der Kontrollwert für die NHF. Diese Ergebnisse lassen auf eine durchaus entscheidende Rolle von VEGF in Keloiden schließen. Die Tatsache, dass die Werte innerhalb der verschiedenen Keloidkulturen dennoch sehr variieren, spricht für die große Variabilität, die zwischen einzelnen Keloiden herrscht.

VEGF stimuliert auch die Expression des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Proteins (PAI-1), welches in Keloidgewebe und kultivierten Keloidfibroblasten höher exprimiert ist als in normaler Haut, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene [171]. Diese Erkenntnis unterstützt die Hypothese, dass eine veränderte Balance aktivierender und hemmender Einflüsse im Plasminogensystem, v.a. eine Überexpression von PAI-1, teilweise zur Keloidbildung und Gewebsfibrose beitragen könnte [173]. Daher liegt nahe, dass VEGF vermutlich eine signifikante Rolle in der Keloidbildung durch Änderung der EZM einnimmt und eine Modulierung dieses Faktors ein potenzielles Ziel von Medikamenten in der Therapie zur Keloidreduktion darstellen könnte [171]. Eine Hemmung von VEGF würde so in die Neovaskularisation von Keloiden eingreifen. 2008 untersuchten diesbezüglich Zhang *et al.* [171] die Auswirkungen eines vektorbasierten Einbaus von VEGF-Synthese hemmender RNA-Sequenzen in Keloidfibroblasten. Das Resultat war eine signifikant erniedrigte Expression von VEGF auf Gen- und Proteinebene sowie eine verringerte Fibroblastenproliferation. Es scheint also in dieser Richtung potenzielle Therapieoptionen zu geben, die jedoch noch weitere Erforschung benötigen.

Die Genexpressionsanalyse von VEGF in den patientenspezifischen Keloidkulturen ergab nur teilweise eine signifikant erhöhte Expression gegenüber den NHF. Lediglich zwei Keloidkulturen zeigten verstärkte Genexpressionswerte, jedoch in wesentlich geringerem Maße als dies auf Proteinebene der Fall war. In Studien, die eine erhöhte VEGF-Expression auf Proteinebene feststellten, spiegelten sich diese Ergebnisse auch auf mRNA-Niveau mittels RT-PCR wider [175, 176]. In der vorliegenden Dissertation war also die Expression von VEGF wesentlich stärker auf Proteinebene ausgeprägt, als die Genexpression vermuten lassen würde. Dennoch unterstützen die Daten allgemein die Hypothese, dass VEGF eine wesentliche Rolle in Keloiden zu spielen scheint und in Keloidfibroblasten stärker als in NHF exprimiert wird. Allerdings scheinen noch andere Faktoren die Proteinexpression zu beeinflussen, die unabhängig von der genetischen Determination zur erhöhten VEGF-Synthese führen.

5.2.2 Expression von IL-6 und VEGF nach mechanischer Belastung

Es wird vermutet, dass die Mechanismen, die zur Bildung abnormer Narben führen, eine stark ausgeprägte und verlängerte Entzündungsphase einschließen [123], welche durch mechanische Krafteinwirkung auf die Haut ausgelöst wird [124, 125]. Die mechanischen Kräfte nehmen in diesem Zusammenhang wohl eine entscheidende Rolle ein [18]. Als wichtiger Marker für Entzündungsreaktionen greift Interleukin 6 modulierend in die Immunantwort ein und ist ausschlaggebend für ein zeitgerechtes Einsetzen der Wundheilung [177, 178]. Ogawa *et al.* vermuten, dass mechanische Kräfte mit die Hauptursachen abnormer Vernarbung sind und, dass zyklische Kraftapplikation eine kontinuierliche Entzündung der Haut und Mechanoaktivierung von Signalwegen verursacht [124, 125]. Daher zeigt sich ein interessanter Aspekt darin, inwieweit mechanische Krafteinwirkung, in diesem Fall in Form zyklischer Dehnung, die IL-6-Synthese in den Keloidfibroblasten beeinflusst. Schließlich zeigen Grundlagenforschungen der Mechanobiologie, dass reduzierte Hautspannung der Entwicklung abnormer Narbenbildungen und deren Rezidiven vorbeugen können [179]. Es ist also unter anderem von Interesse, welchen Einfluss die Dehnung auf die Expression von IL-6 hat. Denn Entzündungsreaktionen und die Einwirkung mechanischer Kräfte stellen beide Faktoren dar, die in der Pathophysiologie der Keloide eine Rolle spielen, wie bereits weiter oben erläutert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten keinen Einfluss der Dehnung auf die IL-6-Expression in allen untersuchten Keloidfibroblastenkulturen sowie in den NHF. Es lässt sich also in diesem Zusammenhang

keine direkte Stimulation der Keloidfibroblasten zur IL-6-Synthese vermuten. Die Daten unterstützen auch nicht die Aussage, dass eine zyklische Kraftapplikation zu einer kontinuierlichen Entzündung führt, zumindest soweit dies durch IL-6 beeinflusst ist. Als weiterer Gesichtspunkt wurde in einer Studie von Sawamura *et al.* gezeigt, dass die Überexpression von IL-6 zur gesteigerten Keratinozyten-Aktivität führt [180]. Dies könnte ein Faktor sein, der so die Proliferation von Fibroblasten und die Vernarbung begünstigt. Allerdings bestätigen unsere Daten nicht die Hypothese, dass mechanische Kräfte eine verstärkte IL-6-Expression induzieren und daraufhin eine verstärkte Fibroblastenproliferation bewirken. Wie bereits oben erwähnt bestehen jedoch verschiedene Limitationen hinsichtlich der eingesetzten Dehnapparatur.

Als einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren für die Angiogenese spielt des Weiteren VEGF eine wesentliche Rolle für normale und pathologische Wundheilungsprozesse [165]. *In vivo* und *in vitro* Studien haben gezeigt, dass VEGF darüber hinaus im Keloidgewebe überexprimiert ist und einen entscheidenden Faktor in deren Entstehung darstellen könnte [165, 181]. Jiang *et al.* [182] zeigten, dass das invasive Wachstum von Keloiden mit der Überexpression von Angiogenese-Faktoren einschließlich VEGF verbunden ist. In diesem Zusammenhang vermuteten sie, dass die Hemmung dieser biologischen Interaktionen einen Fortschritt in der klinischen Therapie darstellen könnte. Daher ist es auch von Interesse, inwieweit mechanische Reizung in Form zyklischer Dehnung auf die VEGF-Expression wirkt. Eine veränderte Synthese könnte so auf einen Zusammenhang der Keloidentstehung oder Rezidivbildung mit mechanischer Krafteinwirkung schließen lassen. Einige Studien zeigten bereits, dass die Modulation der VEGF-Synthese eine Therapiemöglichkeit mit großem Potenzial für die Keloidbehandlung darstellt [171, 183, 184]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten jedoch keinen Einfluss der zyklischen Dehnung auf die Synthese von VEGF bei allen untersuchten Keloidfibroblastenkulturen und den NHF feststellen. Eine *in vivo* Studie an Mäusen von Chin *et al.* [128] untersuchte die Folgen zyklischer und statischer Dehnung von normaler Haut. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von VEGF. Bei statischer Dehnung waren die Werte um das 4,7-fache, bei zyklischer sogar um das 9-fache erhöht. Die Autoren vermuteten, dass zyklische Kraftapplikation epidermale Proliferation, eine Vermehrung von Blutgefäßen und eine insgesamt erhöhte Perfusion bewirkt. Sie schlugen vor, dass wellenförmige mechanische Ladungen das Gewebewachstum durch Maximierung zellulärer Signale beschleunigen könnten. Diese Signale würden während wiederholter Zyklen temporärer Hypoxie und zusätzlich durch Mechanotransduktion produziert [128]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen jedoch keine eindeutige Aussage zu, inwieweit VEGF und mechanische

Stimulation in der Pathophysiologie der Keloidbildung zusammenhängen oder welche Einflüsse sich daraus auf die Therapie ergeben könnten.

5.2.3 Proteinexpression nach Inkubation mit Botulinumtoxin A

Eine zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war, ob Botulinumtoxin A sekretorische und zelluläre Funktionen beeinflussen kann. Schließlich unterliegt die Narbenbildung unter physiologischen Bedingungen einer komplexen Interaktion von einer Vielzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren unter Beteiligung verschiedenster Zellarten [21, 185]. In einer Studie von 2013 wurde von Baizabal-Carvallo *et al.* an insgesamt 218 Patienten das Risiko grippeähnlicher Symptome nach Injektionen von Botulinumtoxin A als Therapie von Bewegungsstörungen untersucht. Die Symptome wurden in Korrelation mit der entsprechenden Immunantwort durch Bestimmung der Zytokinexpression in den Patientenblutproben gebracht [186]. Gemessen wurden unter anderem die Expression von IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF- α und TNF- β . Bei zahlreichen Patienten war ein Anstieg der Entzündungszytokine nach Injektion von BT A messbar. Der genaue Zusammenhang zwischen Botulinumtoxin A und Entzündungsreaktionen ist noch nicht genau geklärt. In einer tierexperimentellen Studie an Ratten konnte von Lee *et al.* ein indirekter Effekt von Botulinumtoxin A auf immobilisierte Wunden dokumentiert werden [187]. Die Autoren stellen nach Injektion von 10.0 IU Botulinumtoxin A eine frühzeitige Reduktion der Infiltration von Entzündungszellen sowie eine verringerte Fibrose in den Tierwunden fest. Noch sind die genauen Mechanismen für eine mögliche Beeinflussung der Zytokinexpression durch BT A nicht genau erfasst. Ein entscheidender Faktor in der Steuerung der Zytokinsynthese ist der NF-kappaB-(NF- κ B)-Signalweg. Verschiedene physiologische Prozesse wie Entzündungsreaktionen und die Apoptose werden durch diesen Transkriptionsfaktor reguliert [188]. Ein unmittelbarer Effekt von Botulinumtoxin A darauf konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden [139].

5.2.3.1 Interleukin 6 (IL-6)

Interleukin 6 (IL-6) ist ein wichtiger Marker entzündlicher Gewebsreaktionen und spielt eine Schlüsselrolle im Wundheilungsprozess. Daher wurde in dieser Studie die Expression von

IL-6 in den Fibroblasten nach Inkubation mit BT A bestimmt. Da IL-6 modulierend auf die Antworten des Immunsystems eingreift und zudem essentiell ist für eine frühzeitige Wundheilung [177, 178], könnte eine Regulierung der IL-6-Expression einen nützlichen Aspekt für die Therapie von Keloiden darstellen. Wie schon erwähnt ließen Experimente an IL-6-defizienten Mäusen eine verzögerte Wundheilung erkennen [160, 161]. Andererseits führt eine Überexpression von IL-6 zu einer gesteigerten Aktivität von Keratinozyten und könnte somit ein Faktor sein, der die Fibroblasten-Proliferation und die Vernarbung begünstigt [180]. Die Ergebnisse dieser Studie weisen nicht auf einen Effekt des BT A auf die IL-6-Synthese in den untersuchten Fibroblasten hin. Weder die NHF noch die Keloidfibroblasten zeigten signifikant veränderte Expressionswerte für IL-6 nach Inkubation mit BT A. Es konnte somit kein konstanter und klinisch relevanter Effekt beobachtet werden. Wie schon weiter oben aufgeführt ist zudem auch noch unklar, auf welchem Weg Botulinumtoxin A Einfluss auf die IL-6-Synthese nehmen könnte. Ein genau definierter Mechanismus konnte noch nicht nachgewiesen werden.

5.2.3.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Eine wichtige Problematik während der Heilungsphase von Wunden sind Endothelschäden und eine beeinträchtigte Mikrovaskularisation. Keloide zeigen zudem oftmals erythemähnliche Läsionen, welche mit einer gesteigerten vaskulären Permeabilität assoziiert sind. Die Neovaskularisation wird während der Wundheilung zusätzlich durch die gesteigerten metabolischen Bedürfnisse gefördert [139]. Als wichtiges Signalmolekül für Vaskulogenese und Angiogenese spielt VEGF in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle. In Keloiden finden sich eine erhöhte Dichte an Blutgefäßen, hypoxische Verhältnisse und eine Hochregulation proangiogenetischer Wachstumsfaktoren wie VEGF [176]. Im Hinblick darauf wurde in der vorliegenden Studie die Expression von VEGF nach Inkubation mit Botulinumtoxin A untersucht, um mögliche Auswirkungen auf die Vaskularisierung des Keloidgewebes innerhalb einer Therapie mit BT A zu eruieren. Es konnte jedoch keine signifikante Veränderung der Synthese von VEGF durch die NHF oder die Keloidfibroblasten festgestellt werden. Haubner *et al.* beobachteten ebenfalls keine Effekte von BT A auf mikrovaskuläre Endothelzellen [142].

VEGF ist ein typischer proangiogenetischer Faktor, dessen Rolle in der Angiogenese während kutaner Wundheilung bereits vielfach untersucht wurde [189]. Eine kürzlich erfolgte

Studie stellte die Überlegung an, dass intradermale Injektionen von BT A durch erhöhte VEGF-Expression die Mikrozirkulation begünstigen könnte [190]. Der genaue Mechanismus dieser Beobachtung ist jedoch noch ungeklärt. Die Autoren formulierten die Hypothese, dass das BT A durch die Unterdrückung sympathischer Neurone das autonome sympathische Nervensystem der Haut beeinflusst. Als Folge wäre eine Vasodilatation möglich. Auch eine erhöhte Dichte an Blutgefäßen wurde beobachtet [190]. Im Allgemeinen ist die VEGF-Expression komplex und wird durch den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) 1 vermittelt. Dabei handelt es sich um einen entscheidenden Transkriptionsfaktor, der durch Umweltstress wie Hypoxie oder sauren pH-Wert aktiviert wird, aber auch durch einige Wachstumsfaktoren und Zytokine [191]. Inwiefern das Botulinumtoxin A mit diesem Mechanismus interagieren kann, ist bis jetzt ungeklärt. In der bereits erwähnten Studie zur Behandlung kutaner Lappen mit intradermalen Injektionen von BT A dokumentierten Kim *et al.* eine höhere Überlebensrate der Lappen durch die Injektion. Die Vermutung der Autoren hierzu war eine gesteigerte Expression von VEGF-mRNA als Ursache für diesen Effekt [190]. In Anlehnung an die Ergebnisse von Haubner *et al.* [142] und unter Einbeziehung der Daten der vorliegenden Studie mit Keloidfibroblasten, findet sich jedoch kein beständiger Effekt von Botulinumtoxin A auf die Synthese von VEGF.

5.2.3.3 *Transforming growth factor β_1 (TGF- β_1)*

Als essentieller Faktor der proliferativen Phase der Wundheilung stellt der *transforming growth factor* (TGF-) β_1 ein Protein dar, von welchem angenommen wird, dass es eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Keloide spielt [192]. Dieser Faktor wird von verschiedenen Zellgruppen exprimiert und übernimmt daraufhin die Funktion des führenden Kontrollsignals, welches eine Vielzahl an Fibroblastenfunktionen reguliert [8]. Die Entwicklung fibrosierender Reaktionen wird durch die Expression von TGF- β durch mikrovaskuläre Endothelzellen initiiert. Diese Zellen aktivieren benachbarte Fibroblasten, erhöhte Mengen an TGF- β zu synthetisieren [193]. Seine Schlüsselrolle als Zytokin in der Wundheilung scheint er durch Initiierung und Beendigung der Wundheilung einzunehmen. Bei anhaltender und überschießender Produktion dieses Faktors sind Fibrosen mögliche Folgen [29]. Als wirkungsstarke Familie von Zytokinen sind die Unterformen von TGF- β in entscheidende Prozesse wie Wachstum und Differenzierung von Zellen, Angiogenese, Adhäsion, Chemotaxis und Metabolismen der Extrazellulärmatrix involviert [62, 194]. Es wurden drei Isoformen beschrieben, die alle während der Wundheilung der Haut exprimiert

werden. Dabei handelt es sich um TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3 . Während TGF- β_1 und TGF- β_2 profibrotische Eigenschaften zugeschrieben werden, vermutet man bei TGF- β_3 eine eher antifibrotische Funktion [8, 17, 61]. Bekannt ist auch die Fähigkeit von TGF- β als Mitogen für Fibroblasten zu fungieren und die Bildung extrazellulärer Matrix zu stimulieren. Der Wachstumsfaktor verursacht eine Akkumulation von Matrixkomponenten durch Steigerung der Synthese von Fibronectin und Proteoglykanen. Gleichzeitig führt die gesteigerte Produktion von Kollagenase-Inhibitoren zu einer verringerten Synthese von Kollagenasen und somit zu einem reduzierten Abbau der Matrix [7, 195, 196]. Eine Überproduktion von extrazellulärer Matrix ist auch eine der Ursachen für exzessive Narbenbildung und ist charakteristisch für Fibrosen. Das Keloid könnte in diesem Zusammenhang als dermales Äquivalent zu fibroproliferativen Erkrankungen wie der Lungenfibrose, Leberzirrhose und der Glomerulonephritis gesehen werden [29, 197-200]. Daher wird vermutet, dass TGF- β eine Hauptrolle bei der exzessiven Gewebsbildung in Keloiden spielt [8]. Es ist auch bekannt, dass die Isoformen TGF- β_1 und TGF- β_2 in Keloidfibroblasten überexprimiert sind im Vergleich zu NHF oder Fibroblasten aus hypertrophen Narben [32, 192]. Shah *et al.* zeigten einen Rückgang des Narbengewebes nach externer Applikation eines TGF- β -neutralisierenden Antikörpers mit dem Vorschlag, die Manipulation dieses Zytokins könnte Vernarbung hemmen [201]. Demzufolge ist dieser Faktor von großer Relevanz bei der *in-vitro*-Erforschung pharmakologischer Effekte in Keloiden *in vitro*. Die vorliegende Studie konnte keinen Effekt der Inkubation mit Botulinumtoxin A auf die Expression von TGF- β_1 feststellen. Dies zeigte sich in allen Keloidkulturen bei Konzentrationen von 1.0 und 2.5 IU BT A. Studien hierzu mit Fibroblasten aus hypertrophen Narben dokumentierten gegenteilige Effekte. So berichteten Xiao *et al.* [141] eine Unterdrückung von TGF- β_1 durch BT A in den Narbenfibroblasten. Ein Versuchsmodell zu hypertrophen Narben an Hasen zeigte einen signifikanten Anstieg der Fibroblasten-Aktivität durch Botulinumtoxin A. Zudem stellten die Autoren eine unterdrückte Expression von Kollagen I und II fest [202]. Es gibt zum jetzigen Zeitpunkt keine tierexperimentellen Versuchsreihen zu Keloiden, daher ist die Diskussion der Daten der vorliegenden Studie auf Experimente mit hypertrophen Narben und klinische Beobachtungen nach Botulinumtoxin-A-Injektionen in Keloide beschränkt. Die Ergebnisse unterstützen die oben genannten Beobachtungen nicht, da kein Effekt von BT A auf TGF- β_1 gefunden werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine große Anzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Verdacht steht, eine potenzielle Rolle in der Keloid-Pathogenese zu spielen [139]. Keloidfibroblasten weisen eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und ihrer

Rezeptoren auf. Zudem sprechen sie auch stärker auf durch Wachstumsfaktoren induzierte Signale an [15]. Die gegenwärtige Studie mit patientenspezifischen Fibroblasten konnte jedoch keine klinisch relevanten Effekte von Botulinumtoxin A auf die oben erwähnten Zytokine feststellen.

5.3 Digitale Fotografien der Zellen

Es wird allgemein vermutet, dass Fibroblasten aus Keloidgeweben sich phänotypisch von solchen in normalen Narben unterscheiden [1]. Entgegen der Theorie einer intrinsisch bedingten Normabweichung dieser Fibroblasten entwickeln Patienten mit Prädisposition für Keloide jedoch nicht grundsätzlich abnorme Wunden. Keloide scheinen regional auf prädisponierte Körperstellen begrenzt zu sein [1]. Dies lässt die Existenz einer lokalen Population andersartiger Zellen oder lokaler Gewebefaktoren erwägen, welche die Keloidbildung fördern [203]. Prinzipiell gibt es einige Besonderheiten der Keloidfibroblasten gegenüber normalen dermalen Fibroblasten. Dazu zählt auch ihre Fähigkeit, sich über die Grenzen der ursprünglichen Wunde hinaus auszubreiten [1], sowie biochemische Charakteristika, welche die exzessive Narbenbildung fördern. Moon *et al.* stellten zudem 2008 die Hypothese auf, dass es sich bei den Fibroblasten in der Dermis von Keloiden um multipotente Stammzellen handeln könnte. Diese würden durch spezifische lokale Zytokine im Mikromilieu der Wunde in einem Zustand der Proliferation und Undifferenziertheit gehalten [204].

Dies sind Gründe, die den mikroskopischen Vergleich der Fibroblasten bezüglich Morphologie, Zellgröße und Siedlungsmuster nahelegen. Es dient der Feststellung, inwiefern sich die keloidspezifischen Charakteristika der Fibroblasten eventuell auch auf dieser Ebene manifestieren. Hier zeigte sich bei den patientenspezifischen Keloidkulturen sowohl im Vergleich untereinander als auch gegenüber den NHF ein prinzipiell uneinheitliches Bild. Die Zellen waren größtenteils plumper, weniger stark vernetzt und wiesen unterschiedliche Zellformen und Größen auf. Die beiden Keloidkulturen mit den geringsten Proliferationsraten (KF A und D) ließen in diesem Zusammenhang die stärksten Abweichungen bezüglich der Zellmorphologie erkennen. Dies könnte unter Umständen daran liegen, dass hier der Zellrasen aufgrund der geringeren Zellvermehrung nicht so dicht besiedelt war und den Fibroblasten so mehr Raum zur Verfügung stand. Auf der anderen Seite spricht das eher uneinheitliche Bild der patientenspezifischen Keloidfibroblasten auch für die bereits im

Vorfeld erörterte Variabilität innerhalb der Gruppe der Keloide. Einflussfaktor auf die Fibroblastengestalt könnte die genaue Entnahmestelle aus dem Keloidgewebe sein, da unterschiedliche Vermehrungsmuster für Keloidzellen in Randbezirken und Zentrumsbereichen festgestellt wurden [115]. Des Weiteren könnte der Reifegrad des Ursprungskeloids Einfluss nehmen, da *in vivo* Versuche ein wesentlich höheres Proliferationspotenzial für junge Keloide zeigten [106-108, 110, 137]. Dies könnte bedeuten, dass die Kulturen KF A und KF D aus reiferen Keloiden stammten, deren Proliferationsraten dementsprechend bereits verringert waren und dieser Zustand Einfluss auf die Zellformierung genommen hatte. Allerdings beruhen die Beobachtungen bezüglich der Zellmorphologie in dieser Studie auf einer einmaligen bildgebenden Darstellung der Keloidfibroblasten. Aufgrund der zahlreichen Schwankungen in den Versuchsergebnissen und der unzureichenden Definierung der Entnahmeregion sowie der Reifegrade der Keloide, lässt sich also aufgrund dieser Fotografien keine eindeutige Aussage bezüglich der Morphologie von Keloidfibroblasten treffen. Es ist jedoch festzuhalten, dass sich in der mikroskopische Kontrolle alle Keloidkulturen von den Kulturen normaler Fibroblasten unterscheiden.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der zellbiologischen Charakterisierung kutaner Keloide anhand patientenspezifischer Keloidfibroblasten. Dazu wurde deren Proliferationsverhalten unter Standardkultivierungsbedingungen und während definierter Beeinflussung des Wachstumsmilieus charakterisiert. In diesem Zusammenhang erfolgte auch die Analyse ihrer Proteinsynthese und Genexpression. Als Kontrollwerte für die Versuchsergebnisse wurden normale dermale Fibroblasten (NHF) unter gleichen Bedingungen ausgesät und behandelt.

Es konnte gezeigt werden, dass alle patientenspezifischen Keloidkulturen unter Standardbedingungen signifikant geringere Proliferationsraten als die normalen dermalen Fibroblasten aufwiesen. Zudem erwiesen sich die einzelnen Zellvermehrungsmuster der verschiedenen Patientenkulturen als sehr inhomogen im direkten Vergleich untereinander. Dies ließ vermuten, dass Keloide grundsätzlich von Patient zu Patient bzw. von Keloid zu Keloid in ihrem Proliferationsverhalten variieren. Ähnliches zeigte sich für Protein- und Genexpression. Insgesamt betrachtet war eine gegenüber den NHF verringerte Syntheseleistung für IL-6, aber eine um ein Vielfaches verstärkte Expression von VEGF feststellbar. Es bestätigte sich, dass VEGF ein durchaus bedeutender Faktor in der Pathogenese der Keloide und letztlich auch für die Keloidtherapie sein könnte. Die Rolle von IL-6 blieb in diesem Zusammenhang aufgrund der individuellen Unterschiede unklar.

Die Entwicklung der Apparatur zur zyklischen Zelldehnung nahm einen wesentlichen Bestandteil der Arbeit ein. Die Daten aus den Vorversuchen zeigten bisher keine Beeinflussung des Proliferationsverhaltens sowie der Proteinexpression unter Krafteinwirkung in den Keloidkulturen. Die zyklische Dehnung zur Stimulation des mechanischen Zelltraumas lieferte keine Ergebnisse, welche Rückschlüsse bezüglich eines Zusammenhangs zwischen mechanischer Krafteinwirkung von außen und Keloidentstehung zuließen. Eine Weiterentwicklung der Apparatur mit höherfrequenter Dehnung erscheint erforderlich.

Im dritten Abschnitt dieser Dissertation sollte das Potenzial von Botulinumtoxin-A-Injektionen als neuartige Option in der Keloidtherapie eruiert werden. Es konnten jedoch weder hinsichtlich des Proliferationsverhaltens noch der Proteinsynthese von IL-6, VEGF oder TGF- β_1 signifikante Veränderungen nach Inkubation mit Botulinumtoxin A festgestellt werden. Im Rahmen dieser Versuche konnte kein Aspekt identifiziert werden, der einen Therapieerfolg nach Botulinumtoxin-A-Injektion begründen oder untermauern würde.

7 Literaturverzeichnis

1. Slemp AE, K.R., *Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management*. Curr Opin Pediatr, 2006. **18**(4): p. 396-402.
2. Koller J, S.G., [*Therapy for pathologic scars (hypertrophic scars and keloids)*]. J Dtsch Dermatol Ges, 2004. **2**(4): p. 308-12.
3. Bran G, S.U., Meinzer F, Goessler UR, Hörmann K, Riedel F, Sadick H, *TGF- β 1-Antisense beeinflusst kollagenbindende Integrine im Keloid*. Hno, 2010. **58**(6): p. 605-12.
4. Naylor MC, B.A., *Current concepts in the etiology and treatment of keloids*. Facial Plast Surg, 2012. **28**(5): p. 504-12.
5. Chike-Obi CJ, C.P., Brissett AE, *Keloids: pathogenesis, clinical features, and management*. Semin Plast Surg, 2009. **23**(3): p. 178-84.
6. Bayat A, A.G., Ollier WE, Ferguson MW, McGrouther DA, *"Aggressive keloid": a severe variant of familial keloid scarring*. J R Soc Med, 2003. **96**(11): p. 554-5.
7. Tuan TL, N.L., *The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation*. Mol Med Today, 1998. **4**(1): p. 19-24.
8. Bran GM, G.U., Hormann K, Riedel F, Sadick H, *Keloids: Current concepts of pathogenesis (Review)*. Int J Mol Med, 2009. **24**(3): p. 283-93.
9. Bran GM, B.J., Hörmann K, Stuck BA, *Auricular Keloids: Combined Therapy With a New Pressure Device*. Archives of Facial Plastic Surgery, 2011. **14**(1): p. 20-6.
10. Karrer S, *Therapie von Keloiden*. Der Hautarzt, 2007. **58**(11): p. 979-990.
11. Murray JC, P.S., Pinnell SR, *Keloids: a review*. J Am Acad Dermatol, 1981. **4**(4): p. 461-70.
12. Berman B, B.H., *Keloids*. J Am Acad Dermatol, 1995. **33**(1): p. 117-23.
13. Rockwell WB, C.I., Ehrlich HP, *Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review*. Plast Reconstr Surg, 1989. **84**(5): p. 827-37.
14. Peacock EE, M.J., Trier WC, *Biologic basis for the treatment of keloids and hypertrophic scars*. South Med J, 1970. **63**(7): p. 755-60.
15. Atiyeh BS, C.M., Hayek SN, *Keloid or hypertrophic scar: the controversy: review of the literature*. Ann Plast Surg, 2005. **54**(6): p. 676-80.
16. Baisch A, R.F., [*Hyperplastic scars and keloids. Part I: basics and prevention*]. HNO, 2006. **54**(11): p. 893-904; quiz 905.
17. Butler PD, L.M., Yang GP, *Current progress in keloid research and treatment*. J Am Coll Surg, 2008. **206**(4): p. 731-41.
18. Ogawa R, A.S., Huang C, Dohi T, Aoki M, Omori Y, Koike S, Kobe K, Akimoto M, Hyakusoku H, *Clinical applications of basic research that shows reducing skin tension could prevent and treat abnormal scarring: the importance of fascial/subcutaneous tensile reduction sutures and flap surgery for keloid and hypertrophic scar reconstruction*. J Nippon Med Sch, 2011. **78**(2): p. 68-76.
19. Mustoe TA, C.R., Gold MH, Hobbs FD, Ramelet AA, Shakespeare PG, Stella M, Téot L, Wood FM, Ziegler UE; International Advisory Panel on Scar Management, *International clinical recommendations on scar management*. Plast Reconstr Surg, 2002. **110**(2): p. 560-71.
20. Diegelmann RF, E.M., *Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 283-9.
21. Scheithauer M, R.H., [*Review part I: basic mechanisms of cutaneous woundhealing*]. Laryngorhinootologie, 2003. **82**(1): p. 31-5.
22. Hoffmann-La-Roche-Aktiengesellschaft and D. Reiche, *Roche Lexikon Medizin*. 2003: Urban & Fischer. 2086.
23. Ferguson MW, O.K.S., *Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2004. **359**(1445): p. 839-50.
24. Ehrlich HP, C.O., Gabbiani G, *The expression of alpha 2 beta 1 integrin and alpha smooth muscle actin in fibroblasts grown on collagen*. Cell Biochem Funct, 1998. **16**(2): p. 129-37.
25. Hynes RO, *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
26. Eckes B, Z.P., Kessler D, Holtkötter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T, *Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis*. Matrix Biol, 2000. **19**(4): p. 325-32.
27. Noszczyk BH, K.E., Holtkoetter O, Krieg T, Majewski S, *Integrin expression in the dermis during scar formation in humans*. Exp Dermatol, 2002. **11**(4): p. 311-8.

28. Gardner HA, *Integrin signaling in fibrosis and scleroderma*. Curr Rheumatol Rep, 1999. **1**(1): p. 28-33.
29. Jagadeesan J, B.A., *Transforming growth factor beta (TGFbeta) and keloid disease*. Int J Surg, 2007. **5**(4): p. 278-85.
30. Birkedal-Hansen H, M.W., Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA, *Matrix metalloproteinases: a review*. Crit Rev Oral Biol Med, 1993. **4**(2): p. 197-250.
31. Stricklin GP, L.L., Jancic V, Wenczak BA, Nanney LB, *Localization of mRNAs representing collagenase and TIMP in sections of healing human burn wounds*. Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1657-66.
32. Bran GM, G.U., Schardt C, Hormann K, Riedel F, Sadick H, *Effect of the abrogation of TGF- β 1 by antisense oligonucleotides on the expression of TGF- β -isoforms and their receptors I and II in isolated fibroblasts from keloid scars*. Int J Mol Med, 2010. **25**(6): p. 915-21.
33. Bran G, S.U., Meinzer F, Goessler UR, Hörmann K, Riedel F, Sadick H, *[Impact of TGF-beta1 antisense on collagen-binding integrins in keloid]*. HNO., 2010. **58**(6): p. 605-8, 610-2.
34. Beausang E, F.H., Dunn KW, Orton CI, Ferguson MW, *A new quantitative scale for clinical scar assessment*. Plast Reconstr Surg, 1998. **102**(6): p. 1954-61.
35. Davey RB, S.R., Neild TO, *Computerised colour: a technique for the assessment of burn scar hypertrophy. A preliminary report*. Burns, 1999. **25**(3): p. 207-13.
36. Davies DM, *Plastic and reconstructive surgery. Scars, hypertrophic scars, and keloids*. Br Med J (Clin Res Ed), 1985. **290**(6474): p. 1056-8.
37. Yeong EK, M.R., Engrav LH, Goldberg M, Cain V, Costa B, Moore M, Nakamura D, Lee J, *Improved burn scar assessment with use of a new scar-rating scale*. J Burn Care Rehabil, 1997. **18**(4): p. 353-5; discussion 352.
38. Baryza MJ, B.G., *The Vancouver Scar Scale: an administration tool and its interrater reliability*. J Burn Care Rehabil, 1995. **16**(5): p. 535-8.
39. Nedelec B, S.H., Tredget EE, *Rating the resolving hypertrophic scar: comparison of the Vancouver Scar Scale and scar volume*. J Burn Care Rehabil, 2000. **21**(3): p. 205-12.
40. Murray JC, *Scars and keloids*. Dermatol Clin, 1993. **11**(4): p. 697-708.
41. Rudolph R, *Wide spread scars, hypertrophic scars, and keloids*. Clin Plast Surg, 1987. **14**(2): p. 253-60.
42. Ziegler UE, *[International clinical recommendations on scar management]*. Zentralbl Chir, 2004. **129**(4): p. 296-306.
43. Al-Attar A, M.S., Thomassen JM, Kauffman CL, Davison SP, *Keloid Pathogenesis and Treatment*. Plastic and Reconstructive Surgery, 2006. **117**(1): p. 286-300.
44. Murray JC, *Keloids and hypertrophic scars*. Clin Dermatol, 1994. **12**(1): p. 27-37.
45. Muir IF, *On the nature of keloid and hypertrophic scars*. Br J Plast Surg, 1990. **43**(1): p. 61-9.
46. Ogawa R, M.K., Hyakusoku H, Miyashita T, *Postoperative electron-beam irradiation therapy for keloids and hypertrophic scars: retrospective study of 147 cases followed for more than 18 months*. Plast Reconstr Surg, 2003. **111**(2): p. 547-53; discussion 554-5.
47. Kridel RW, L.E., *Techniques for creating inconspicuous face-lift scars: avoiding visible incisions and loss of temporal hair*. Arch Facial Plast Surg, 2003. **5**(4): p. 325-33.
48. Leach J, *Proper handling of soft tissue in the acute phase*. Facial Plast Surg, 2001. **17**(4): p. 227-38.
49. Lee KK, M.K., Swanson NA, *Surgical revision*. Dermatol Clin, 2005. **23**(1): p. 141-50, vii.
50. Roseborough IE, G.M., Lee RC, *Prevention and treatment of excessive dermal scarring*. J Natl Med Assoc, 2004. **96**(1): p. 108-16.
51. Dupuytren JF, *Traité théorique et pratique des blessures par armes de guerre, vol 1*. JB Bailliere, Paris. 1834.
52. Kocher I, *Chirurgische Operationslehre* Gustav Fischer, Jena, 1907.
53. Baisch, A. and F. Riedel, *Hyperplastische Narben und Keloide*. Hno, 2006. **54**(12): p. 981-994.
54. Strutz J, A.O., Mann W, *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie: 265 Tabellen*. 2010: Thieme. 1096.
55. Brown SA, C.M., Coberly DM, Chao JJ, Rohrich RJ, *Oral nutritional supplementation accelerates skin wound healing: a randomized, placebo-controlled, double-arm, crossover study*. Plast Reconstr Surg, 2004. **114**(1): p. 237-44.
56. Borges AF, A.J., *Relaxed skin tension lines, Z-plasties on scars, and fusiform excision of lesions*. Br J Plast Surg, 1962. **15**: p. 242-54.
57. Menaker GM, *Wound dressings for office-based surgery*. Facial Plast Surg, 2004. **20**(1): p. 91-105.

58. Gassner HG, S.D., Otley CC, *Treatment of facial wounds with botulinum toxin A improves cosmetic outcome in primates*. *Plast Reconstr Surg*, 2000. **105**(6): p. 1948-53; discussion 1954-5.
59. Sherris DA, G.H., *Botulinum toxin to minimize facial scarring*. *Facial Plast Surg*, 2002. **18**(1): p. 35-9.
60. Hackert I, A.R., Sebastian G, *[The treatment of keloids]*. *Hautarzt*, 2003. **54**(10): p. 1003-15; quiz 1016-7.
61. Bock O, Y.H., Zitron S, Bayat A, Ferguson MW, Mrowietz U, *Studies of transforming growth factors beta 1-3 and their receptors I and II in fibroblast of keloids and hypertrophic scars*. *Acta Derm Venereol*, 2005. **85**(3): p. 216-20.
62. Lee TY, C.G., Kim WJ, Chau D, Gittes GK, Longaker MT, *Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids*. *Ann Plast Surg*, 1999. **43**(2): p. 179-84.
63. Bettinger DA, Y.D., Diegelmann RF, Cohen IK, *The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis*. *Plast Reconstr Surg*, 1996. **98**(5): p. 827-33.
64. Younai S, N.L., Wellisz T, Reinisch J, Nimni ME, Tuan TL, *Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor-beta in keloid and hypertrophic scar fibroblasts*. *Ann Plast Surg*, 1994. **33**(2): p. 148-51.
65. Appleton I, B.N., Willoughby DA, *Apoptosis, necrosis, and proliferation: possible implications in the etiology of keloids*. *Am J Pathol*, 1996. **149**(5): p. 1441-7.
66. Luo S, B.M., Raffoul W, Panizzon RG, Egloff DV, *Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions*. *Plast Reconstr Surg*, 2001. **107**(1): p. 87-96.
67. Messadi DV, L.A., Berg S, Jewett A, Wen Z, Kelly P, Bertolami CN, *Expression of apoptosis-associated genes by human dermal scar fibroblasts*. *Wound Repair Regen*, 1999. **7**(6): p. 511-7.
68. Sayah DN, S.C., Shaw WW, Watson J, Messadi D, Longaker MT, Zhang X, Ting K, *Downregulation of apoptosis-related genes in keloid tissues*. *J Surg Res*, 1999. **87**(2): p. 209-16.
69. Curtis AS, S.G., *The control of cell division by tension or diffusion*. *Nature*, 1978. **274**(5666): p. 52-3.
70. Sussman MD, *Effect on increased tissue traction upon tensile strength of cutaneous incisions in rats*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1996. **123**(1): p. 38-41.
71. Crockett DJ, *Hypertrophic scars*. *Br J Plast Surg*, 1964. **17**: p. 245-253.
72. Fong EP, B.B., *Keloids - the sebum hypothesis revisited*. *Med Hypotheses*, 2002. **58**(4): p. 264-9.
73. Baisch A, R.F., *[Hyperplastic scars and keloids: part II: Surgical and non-surgical treatment modalities]*. *HNO*, 2006. **54**(12): p. 981-92; quiz 993-4.
74. Bock O, M.U., *[Keloids. A fibroproliferative disorder of unknown etiology]*. *Hautarzt*, 2002. **53**(8): p. 515-23.
75. Robles DT, M.E., Draznin M, Berg D, *Keloids: pathophysiology and management*. *Dermatol Online J*, 2007. **13**(3): p. 9.
76. Niessen FB, S.P., Schalkwijk J, Kon M, *On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review*. *Plast Reconstr Surg*, 1999. **104**(5): p. 1435-58.
77. Uyesugi B, L.B., Dave S, *Treatment of a Painful Keloid with Botulinum Toxin Type A*. *Am J Phys Med Rehabil*, 2010. **89**(2): p. 153-155.
78. Lawrence WT, *Treatment of earlobe keloids with surgery plus adjuvant intralesional verapamil and pressure earrings*. *Ann Plast Surg*, 1996. **37**(2): p. 167-9.
79. http://www.aemt-corp.de/fotos/content/z-plastik_578.jpg.
80. Kim DY, K.E., Eo SR, Kim KS, Lee SY, Cho BH, *A Surgical Approach for Earlobe Keloid: Keloid Fillet Flap*. *Plast Reconstr Surg*, 2004. **113**(6): p. 1668-74.
81. Rusciani L, R.G., Bono R, *Use of cryotherapy in the treatment of keloids*. *J Dermatol Surg Oncol*, 1993. **19**(6): p. 529-34.
82. Zouboulis CC, Z.E., Rosenberger A, Dalkowski A, *Current developments and uses of cryosurgery in the treatment of keloids and hypertrophic scars*. *Wound Repair Regen*, 2002. **10**(2): p. 98-102.
83. Alster TS, T.E., *Hypertrophic scars and keloids: etiology and management*. *Am J Clin Dermatol*, 2003. **4**(4): p. 235-43.
84. Alster TS, W.T., *Treatment of scars: a review*. *Ann Plast Surg*, 1997. **39**(4): p. 418-32.
85. Katz BE, *Silicone gel sheeting in scar therapy*. *Cutis*, 1995. **56**(1): p. 65-7.

86. Wagner W, A.M., Micke O, Schäfer U, Schüller P, Willich N, *Results of prophylactic irradiation in patients with resected keloids--a retrospective analysis*. Acta Oncol, 2000. **39**(2): p. 217-20.
87. Durosinmi-Etti FA, O.T., Solarin EO, *A short course postoperative radiotherapy regime for keloid scars in Nigeria*. West Afr J Med, 1994. **13**(1): p. 17-9.
88. Hoffman S, *Radiotherapy for keloids*. Ann Plast Surg, 1982. **9**(3): p. 265.
89. Bouzari N, D.S., Nouri K, *Laser treatment of keloids and hypertrophic scars*. Int J Dermatol, 2007. **46**(1): p. 80-8.
90. Zhibo X, M.Z., *Intralesional botulinum toxin type A injection as a new treatment measure for keloids*. Plast Reconstr Surg, 2009. **124**(5): p. 275e-7e.
91. Gauglitz GG, B.D., Dombrowski Y, Pavicic T, Ruzicka T, Schaubert J, *Botulinum Toxin A for the Treatment of Keloids*. Skin Pharmacol Physiol, 2012. **25**(6): p. 313-318.
92. Gupta S, K.A., *Efficacy and safety of intralesional 5-fluorouracil in the treatment of keloids*. Dermatology, 2002. **204**(2): p. 130-2.
93. Espinassouze F, H.E., Grosshans E, *[Treatment of keloid by intralesional injections of interferon alfa-2B]*. Ann Dermatol Venereol, 1993. **120**(9): p. 629-30.
94. Berman B, F.F., *Recurrence rates of excised keloids treated with postoperative triamcinolone acetone injections or interferon alfa-2b injections*. J Am Acad Dermatol, 1997. **37**(5 Pt 1): p. 755-7.
95. Granstein RD, R.A., Flotte TJ, Haas A, Gallo RL, Jaffe HS, Amento EP, *A controlled trial of intralesional recombinant interferon-gamma in the treatment of keloidal scarring. Clinical and histologic findings*. Arch Dermatol, 1990. **126**(10): p. 1295-302.
96. España A, S.T., Quintanilla E, *Bleomycin in the treatment of keloids and hypertrophic scars by multiple needle punctures*. Dermatol Surg, 2001. **27**(1): p. 23-7.
97. Copcu E, S.N., Oztan Y, *Combination of surgery and intralesional verapamil injection in the treatment of the keloid*. J Burn Care Rehabil, 2004. **25**(1): p. 1-7.
98. D'Andrea F, B.S., Ferraro G, Baroni A, *Prevention and treatment of keloids with intralesional verapamil*. Dermatology, 2002. **204**(1): p. 60-2.
99. Bairy KL, R.C., Ramesh KV, Kulkarni DR, *Effect of histamine on wound healing*. Indian J Physiol Pharmacol, 1991. **35**(3): p. 180-2.
100. Cohen IK, B.M., Horáková Z, Keiser HR, *Histamine and collagen synthesis in keloid and hypertrophic scar*. Surg Forum, 1972. **23**(0): p. 509-10.
101. Sandberg N, *Accelerated collagen formation and histamine*. Nature, 1962. **194**: p. 183.
102. Topol BM, L.V., Benveniste K, *The use of antihistamine to retard the growth of fibroblasts derived from human skin, scar, and keloid*. Plast Reconstr Surg, 1981. **68**(2): p. 227-32.
103. Peacock EE, *Pharmacologic control of surface scarring in human beings*. Ann Surg, 1981. **193**(5): p. 592-7.
104. Mancini RE, Q.J., *Histogenesis of experimentally produced keloids*. J Invest Dermatol, 1962. **38**: p. 143-81.
105. Matsuoka LY, U.J., Wortsman J, Abergel RP, Dietrich J, *Ultrastructural characteristics of keloid fibroblasts*. Am J Dermatopathol, 1988. **10**(6): p. 505-8.
106. Kischer CW, B.G., *Structure of the collagen nodule from hypertrophic scars and keloids*. Scan Electron Microsc, 1981. (Pt 3): p. 371-6.
107. Kischer CW, *Comparative ultrastructure of hypertrophic scars and keloids*. Scan Electron Microsc, 1984. (Pt 1): p. 423-31.
108. Kischer CW, *The microvessels in hypertrophic scars, keloids and related lesions: a review*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 1992. **24**(2): p. 281-96.
109. Blackburn WR, C.B., *Histologic basis of keloid and hypertrophic scar differentiation*. Arch Pathol, 1966. **82**(1): p. 65-71.
110. Calderon M, L.W., Baner AJ, *Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro*. J Surg Res, 1996. **61**(2): p. 343-7.
111. Russell JD, W.W., *Cell size and growth characteristics of cultured fibroblasts isolated from normal and keloid tissue*. Plast Reconstr Surg, 1976. **57**(2): p. 207-12.
112. Diegelmann RF, C.I., McCoy BJ, *Growth kinetics and collagen synthesis of normal skin, normal scar, and keloid fibroblasts in vitro*. J Cell Physiol, 1979. **98**(2): p. 341-6.
113. McCoy BJ, G.J., Cohen IK, *Effects of density and cellular aging on collagen synthesis and growth kinetics in keloid and normal skin fibroblasts*. In Vitro, 1982. **18**(1): p. 79-86.
114. Oku T, T.M., Yamada M, *Cell proliferation kinetics of cultured human keratinocytes and fibroblasts measured using a monoclonal antibody*. Br J Dermatol, 1987. **116**(5): p. 673-9.

115. Varmeh S, E.A., McGrouther D, Tahan SR, Bayat A, Pandolfi PP, *Cellular Senescence as a Possible Mechanism for Halting Progression of Keloid Lesions*. *Genes Cancer*, 2011. **2**(11): p. 1061-6.
116. Schafer M, W.S., *Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008. **9**(8): p. 628-38.
117. Naylor MC, L.D., Zamora IJ, Mushin OP, Yu L, Brissett AE, Olutoye OO, *Increased in vitro differentiation of fibrocytes from keloid patients is inhibited by serum amyloid P*. *Wound Repair Regen*, 2012. **20**(3): p. 277-83.
118. Wang JF1, J.H., Stewart TL, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE, *Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts*. *Wound Repair Regen*, 2007. **15**(1): p. 113-21.
119. Ogawa R, O.K., Tokumura F, Mori K, Ohmori Y, Huang C, Hyakusoku H, Akaishi S, *The relationship between skin stretching/contraction and pathologic scarring: the important role of mechanical forces in keloid generation*. *Wound Repair Regen*, 2012. **20**(2): p. 149-57.
120. Akaishi S, O.R., Ohmori Y, Hyakusoku H, *Novel Suture Technique after Keloid Excision—Fascial Suture Technique*. *Scar Management*, 2010. **4**: p. 95-9.
121. Aoki M, A.S., Ono S, Aoki M, Akaishi S, Ono S, et al.: *Usefulness and problems of flap surgery for keloids*. *Scar Management* 2010. **4**: p. 108-111.
122. Dohi T, A.S., Ohmori Y, Ogawa R, Hyakusoku H, *Core excision methods for keloids*. *Scar Management*, 2010. **4**: p. 75-8.
123. Akaishi S, O.R., Hyakusoku H, *Visual and Pathologic Analyses of Keloid Growth Patterns*. *Annals of Plastic Surgery*, 2010. **64**(1): p. 80-82.
124. Akaishi S, O.R., Hyakusoku H, *Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses*. *Med Hypotheses*, 2008. **71**(1): p. 32-8.
125. Ogawa R, *Keloid and hypertrophic scarring may result from a mechanoreceptor or mechanosensitive nociceptor disorder*. *Med Hypotheses*, 2008. **71**(4): p. 493-500.
126. Akaishi S, A.M., Ogawa R, Hyakusoku H, *The Relationship Between Keloid Growth Pattern and Stretching Tension*. *Annals of Plastic Surgery*, 2008. **60**(4): p. 445-451.
127. Ohmori Y, A.S., Ogawa R, Hyakusoku H, *Analysis of regions where keloids tend to occur*. *Scar Management*, 2010. **4**: p. 112-15.
128. Chin MS, O.R., Lancerotto L, Pietramaggiore G, Schomacker KT, Mathews JC, Scherer SS, Van Duyn P, Prsa MJ, Ottensmeyer MP, Vevs A, Orgill DP, *In vivo acceleration of skin growth using a servo-controlled stretching device*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010. **16**(3): p. 397-405.
129. Chin MS, L.L., Helm DL, Dastouri P, Prsa MJ, Ottensmeyer M, Akaishi S, Orgill DP, Ogawa R, *Analysis of neuropeptides in stretched skin*. *Plast Reconstr Surg*, 2009. **124**(1): p. 102-13.
130. Ogawa R, *Mechanobiology of scarring*. *Wound Repair Regen*, 2011. **19** (Suppl. 1): p. 2-9.
131. Cohen IK, K.H., Sjoerdsma A, *Collagen synthesis in human keloid and hypertrophic scar* *Surg Forum*, 1971. **22**: p. 488-9.
132. Craig RDP, S.J., Jackson SS, *Collagen biosynthesis in normal human skin, normal and hypertrophic scar and keloid*. *Eur J Clin Invest*, 1975. **5**(1): p. 69-74.
133. Cohen IK, D.R., Keiser HR, *Collagen metabolism in keloid and hypertrophic scar*. In J. J. Longacre (Ed.), *The Ultrastructure of Collagen*. Springfield: Charles C. Thomas. 1976: p. 199-212.
134. McCoy BJ, C.I., *Effects of various sera on growth kinetics and collagen synthesis by keloid and normal dermal fibroblasts*. *Plast Reconstr Surg*, 1981. **67**(4): p. 505-10.
135. Abergel RP, P.D., Meeker CA, Lask G, Matsuoka LY, Minor RR, Chu ML, Uitto J, *Biochemical composition of the connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloid fibroblast cultures*. *J Invest Dermatol*, 1985. **84**(5): p. 384-90.
136. Uitto J, P.A., Abergel RP, Chu ML, Ramirez F, *Altered steady-state ratio of type I/III procollagen mRNAs correlates with selectively increased type I procollagen biosynthesis in cultured keloid fibroblasts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(17): p. 5935-9.
137. Kischer CW, W.H.J., Pindur J, Holubec H, Jones M, Ulreich JB, Schuderi P, *Increased fibronectin production by cell lines from hypertrophic scar and keloid*. *Connect Tissue Res*, 1989. **23**(4): p. 279-88.
138. Babu M, D.R., Oliver N, *Fibronectin is overproduced by keloid fibroblasts during abnormal wound healing*. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(4): p. 1642-50.
139. Haubner F, L.M., Ohmann E, Sadick H, Gassner HG, *Effects of botulinum toxin A on patient specific keloid fibroblasts in vitro*. *Laryngoscope*, 2013(doi: 10.1002/lary.24456).

140. Zhibo X, M.Z., *Potential therapeutical effects of botulinum toxin type A in keloid management*. Med Hypotheses, 2008. **71**(4): p. 623.
141. Xiao Z, Z.F., Lin W, Zhang M, Liu Y, *Effect of botulinum toxin type A on transforming growth factor beta1 in fibroblasts derived from hypertrophic scar: a preliminary report*. Aesthetic Plast Surg, 2010. **34**(4): p. 424-7.
142. Haubner F, O.E., Müller-Vogt U, Kummer P, Strutz J, Gassner HG, Gassner H, *Effects of botulinum toxin a on cytokine synthesis in a cell culture model of cutaneous scarring*. Arch Facial Plast Surg, 2012. **14**(2): p. 122-6.
143. McGrouther DA, *Hypertrophic or keloid scars?* Eye (Lond), 1994. **8**(Pt 2): p. 200-3.
144. Gassner HG, B.A., Otley CC, Boahene DK, Boggust AJ, Weaver AL, Sherris DA, *Botulinum toxin to improve facial wound healing: A prospective, blinded, placebo-controlled study*. Mayo Clin Proc, 2006. **81**(8): p. 1023-8.
145. Gassner HG, S.D., Friedman O, *Botulinum toxin-induced immobilization of lower facial wounds*. Arch Facial Plast Surg, 2009. **11**(2): p. 140-2.
146. Wilson AM, *Use of botulinum toxin type A to prevent widening of facial scars*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(6): p. 1758-66; discussion 1767-8.
147. Venus MR, *Use of botulinum toxin type A to prevent widening of facial scars*. Plast Reconstr Surg, 2007. **119**(1): p. 423-4; author reply 424.
148. Montecucco C, S.G., *Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins*. Mol Microbiol, 1994. **13**(1): p. 1-8.
149. Fong EP, B.B., *The sebum hypothesis revisited*. Med Hypotheses, 2002. **58**(4): p. 264-9.
150. Yagi KI, D.A., Osman AA, *Does an immune reaction to sebum in wounds cause keloid scars? Beneficial effect of desensitization*. Br J Plast Surg, 1979. **32**(3): p. 223-5.
151. Ghazizadeh M, *Essential Role of IL-6 Signaling Pathway in Keloid Pathogenesis*. J Nippon Med Sch, 2007. **74**(1): p. 11-22.
152. Tan PL, F.S., Yeoman S, Watson JD, *Expression of the interleukin 6 gene in rheumatoid synovial fibroblasts*. J Rheumatol, 1990. **17**(12): p. 1608-12.
153. Shahar I, F.E., Topilsky M, Grief J, Kivity S, Spierer Z, Ben Efraim S, *Effect of IL-6 on alveolar fibroblast proliferation in intestinal lung disease*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **79**(3): p. 244-51.
154. Gurram M, P.S., Frieri M, *Augmented interleukin-6 secretion in collagen-stimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis*. Ann Allergy, 1994. **73**(6): p. 493-6.
155. Feghali CA, B.K., Boulware DW, Levy LS, *Control of IL-6 expression and response in fibroblasts from patients with systemic sclerosis*. Autoimmunity, 1994. **17**(4): p. 309-18.
156. Xue H, M.R., Zhang W, *Elevated Interleukin-6 Expression in Keloid Fibroblasts*. J Surg Res, 2000. **89**(1): p. 74-7.
157. Mihara M, M.Y., Kishimoto T, Ohsugi Y, *Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor*. Br J Rheumatol. , 1995. **34**(4): p. 321-5.
158. Duncan MR, B.B., *Stimulation of collagen and glycoaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(4): p. 686-92.
159. Liechty KW, A.N., Crombleholme TM, *Diminished interleukin 6 (IL-6) production during scarless human fetal wound repair*. Cytokine, 2000. **12**(6): p. 671-6.
160. Gallucci RM, S.P., Matheson JM, Kommineni C, Gurjel JL, Sugawara T, Luster MI, *Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice*. FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2525-31.
161. Lin ZQ, K.T., Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N, *Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(6): p. 713-21.
162. Ghazizadeh M, T.M., Shimizu H, Hyakusoku H, Kawanami O, *Functional implications of the IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(1): p. 98-105.
163. Tosa M, G.M., Shimizu H, Hirai T, Hyakusoku H, Kawanami O, *Global Gene Expression Analysis of Keloid Fibroblasts in Response to Electron Beam Irradiation Reveals the Involvement of Interleukin-6 Pathway*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(4): p. 704-13.
164. Uitto J, *IL-6 Signaling Pathway in Keloids: A Target for Pharmacologic Intervention?* . J Invest Dermatol, 2007. **127**(1): p. 6-8.

165. Wu WS, W.F., Yang KD, Huang CC, Kuo YR, *Dexamethasone induction of keloid regression through effective suppression of VEGF expression and keloid fibroblast proliferation*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(6): p. 1264-71.
166. Le AD, Z.Q., Wu Y, Messadi DV, Akhondzadeh A, Nguyen AL, Aghaloo TL, Kelly AP, Bertolami CN, *Elevated Vascular Endothelial Growth Factor in Keloids: Relevance to Tissue Fibrosis*. Cells Tissues Organs, 2004. **176**(1-3): p. 87-94.
167. Carmeliet P, J.R., *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
168. Rahban SR, G.W., *Fibroproliferative scars*. Clin Plast Surg, 2003. **30**(1): p. 77-89.
169. Ehrlich HP, D.A., Diegelmann RF, Cohen IK, Compton CC, Garner WL, Kapanci Y, Gabbiani G, *Morphological and immunohistochemical differences between keloid and hypertrophic scar*. Am J Pathol, 1994. **145**(1): p. 105-13.
170. Pepper MS, F.N., Orci L, Montesano R, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **181**(2): p. 902-6.
171. Zhang GY, Y.C., Li X, Zheng Y, Niu ZG, Xia W, Meng Z, Meng CY, Guo SZ, *Inhibition of vascular endothelial growth factor expression in keloid fibroblasts by vector-mediated vascular endothelial growth factor shRNA: a therapeutic potential strategy for keloid*. Arch Dermatol Res, 2008. **300**(4): p. 177-84.
172. Gira AK, B.L., Washington CV, Cohen C, Arbiser JL, *Keloids demonstrate high-level epidermal expression of vascular endothelial growth factor*. J Am Acad Dermatol, 2004. **50**(6): p. 850-3.
173. Tiscornia G, S.O., Ikawa M, Verma IM *A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1844-8.
174. Steinbrech DS, M.B., Chau D, Rowe NM, Chin G, Lee T, Saadeh PB, Gittes GK, Longaker MT *Hypoxia upregulates VEGF production in keloid fibroblasts*. Ann Plast Surg, 1999. **42**(5): p. 514-9.
175. Wu Y, Z.Q., Ann DK, Akhondzadeh A, Duong HS, Messadi DV, Le AD, *Increased vascular endothelial growth factor may account for elevated level of plasminogen activator inhibitor-1 via activating ERK1/2 in keloid fibroblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(4): p. C905-12.
176. Mogili NS, K.V., Jayaraman M, Rajaram R, Venkatraman A, Korrapati PS, *Altered angiogenic balance in keloids: a key to therapeutic intervention*. Transl Res, 2012. **159**(3): p. 182-9.
177. Van Snick J, *Interleukin-6: an overview*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 253-78.
178. McFarland-Mancini MM, F.H., Paluch AM, Zhou M, Giridhar PV, Mercer CA, Kozma SC, Drew AF, *Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 7219-28.
179. Ogawa R, O.D., *Mechanobiology of Cutaneous Wound Healing and Scarring*. In "Bioengineering Research of Chronic Wounds" (Amit G, ed), Springer, Berlin Heidelberg. 2010: p. 32-42.
180. Sawamura D, M.X., Ina S, Sato M, Tamai K, Hanada K, Hashimoto I, *Induction of keratinocyte proliferation and lymphocytic infiltration by in vivo introduction of the IL-6 gene into keratinocytes and possibility of keratinocyte gene therapy for inflammatory skin diseases using IL-6 mutant genes*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5633-9.
181. Tanaka A, H.M., Tada H, Iioka H, Niitsuma K, Miyagawa S *Expression of p53 family in scars*. J Dermatol Sci, 2004. **34**(1): p. 17-24.
182. Jiang DY, F.X., Chen W, Sun TZ *Relationship of overexpression of angiogenesis factors and their receptors with invasive growth of keloid*. Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi, 2004. **20**(2): p. 128-31.
183. Giugliano G, P.D., Notaro A, Brongo S, Nicoletti G, D'Andrea F, Bellastella A, Sinisi AA *Verapamil inhibits interleukin-6 and vascular endothelial growth factor production in primary cultures of keloid fibroblasts*. Br J Plast Surg, 2003. **56**(8): p. 804-9.
184. Ong CT, K.Y., Tan EK, Mukhopadhyay A, Do DV, Han HC, Lim IJ, Phan TT, *Epithelial-mesenchymal interactions in keloid pathogenesis modulate vascular endothelial growth factor expression and secretion*. J Pathol, 2007. **211**(1): p. 95-108.
185. Scheithauer M, R.H., *Review part II: disorders in cutaneous woundhealing*. Laryngorhinootologie, 2003. **82**(1): p. 36-9.

186. Baizabal-Carvalho J F, J.J., Feld J, *Flu-like symptoms and associated immunological response following therapy with botulinum toxins*. Neurotox Res, 2013. **24**(2): p. 298-306.
187. Lee BJ, J.J., Wang SG, Lee JC, Goh EK, Kim HW, *Effect of botulinum toxin type a on a rat surgical wound model*. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2009. **2**(1): p. 20-7.
188. Eo SH, C.H., Kim SJ, *Resveratrol Inhibits Nitric Oxide-Induced Apoptosis via the NF-Kappa B Pathway in Rabbit Articular Chondrocytes*. Biomol Ther (Seoul), 2013. **21**(5): p. 364-70.
189. Schreml S, S.R., Prantl L, Landthaler M, Babilas P, *Wound healing in the 21st century*. J Am Acad Dermatol, 2010. **63**(5): p. 866-81.
190. Kim TK, O.E., Chung JY, Park JW, Cho BC, Chung HY, *The effects of botulinum toxin A on the survival of a random cutaneous flap*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2009. **62**(7): p. 906-13.
191. Pagès G, P.J., *Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(3): p. 564-73.
192. Bran GM, G.U., Baftiri A, Hormann K, Riedel F, Sadick H, *Effect of transforming growth factor- β 1 antisense oligonucleotides on matrix metalloproteinases and their inhibitors in keloid fibroblasts*. Otolaryngology - Head and Neck Surgery, 2010. **143**(1): p. 66-71.
193. Peltonen J, H.L., Jaakkola S, Sollberg S, Aumailley M, Timpl R, Chu ML, Uitto J, *Activation of collagen gene expression in keloids: co-localization of type I and VI collagen and transforming growth factor-beta 1 mRNA*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(2): p. 240-8.
194. Sadick H, H.A., Riedel K, Bran G, Goessler U, Hoermann K, Riedel F, *TGF-beta1 antisense therapy modulates expression of matrix metalloproteinases in keloid-derived fibroblasts*. Int J Mol Med, 2008. **22**(1): p. 55-60.
195. Ignatz RA, M.J., *Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix*. J Biol Chem, 1986. **261**(9): p. 4337-45.
196. Overall C M, W.J.L., Sodek J, *Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta*. J Biol Chem, 1989. **264**(3): p. 1860-9.
197. Border WA, O.S., Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E, *Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1*. Nature, 1990. **346**(6282): p. 371-4.
198. Castilla A, P.J., Fausto N, *Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy*. N Engl J Med, 1991. **324**(14): p. 933-40.
199. Broekelmann TJ, L.A., Colby TV, McDonald JA, *Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(15): p. 6642-6.
200. Tredget EE, *The molecular biology of fibroproliferative disorders of the skin: potential cytokine therapeutics*. Ann Plast Surg, 1994. **33**(2): p. 152-4.
201. Shah M, F.D., Ferguson MW, *Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring*. J Cell Sci, 1995. **108**(Pt 3): p. 985-1002.
202. Wang L, T.N., Fan ZH, *[Effect of botulinum toxin type A injection on hypertrophic scar in rabbit ear model]*. Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi, 2009. **25**(4): p. 284-7.
203. Calnan JS, C.H., *Autotransplantation of keloid in man*. Br J Surg, 1967. **54**(5): p. 330-5.
204. Moon JH, K.S., Park G, Jung HY, Yoon BS, Park J, Ryu KS, Choi SC, Maeng I, Kim B, Jun EK, Kim S, Kim A, Oh S, Kim H, Kim KD, You S, *Isolation and characterization of multipotent human keloid-derived mesenchymal-like stem cells*. Stem Cells Dev, 2008. **17**(4): p. 713-24.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Einteilung der Narbenformen nach der <i>Vacouver Scar Scale</i>	S. 13
Tabelle 2:	Mögliche Risikofaktoren für Keloide.....	S. 18
Tabelle 3:	Verwendete Zellkulturen.....	S. 25
Tabelle 4:	Verwendete Medien.....	S. 25
Tabelle 5:	Verwendete Assays.....	S. 25
Tabelle 6:	Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	S. 26
Tabelle 7:	Verwendete Materialien.....	S. 27
Tabelle 8:	Verwendete Geräte.....	S. 28
Tabelle 9:	Beispiel für das Mischungsverhältnis der Ansätze für ein Resazurin-Proliferationsassay mit einem Gesamtvolumen von 6 ml pro Ansatz.....	S. 36
Tabelle 10:	Beispiel für das Mischungsverhältnis der Ansätze für ein Proliferationsassay mit 6-Well-Platten und einem Gesamtvolumen von 25 ml pro Ansatz.....	S. 36
Tabelle 11:	Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze der <i>Puffer work solution</i> als Lysispuffer.....	S. 38
Tabelle 12:	Zusammensetzung des MasterMix-Ansatzes für 10 µl RNA.....	S. 39
Tabelle 13:	Demografie der Keloidpatienten und Entnahmestelle der Gewebeproben.....	S. 41

8.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Beispiel für das klinische Erscheinungsbild eines Keloids: Aknekeloid an der Schulter.....	S. 7
Abbildung 2:	Phasen der Wundheilung am Beispiel einer Hautwunde.....	S. 9
Abbildung 3:	Auswirkungen einer Störung zwischen Synthese und Abbau der Extrazellulärmatrix.....	S. 12
Abbildung 4:	a) Ästhetische Einheiten („ <i>aesthetic subunits</i> “) b) Verlauf der RST-Linien („ <i>relaxed skin tension lines</i> “).....	S. 15
Abbildung 5:	Durchführung der Z-Plastik in 3 Schritten.....	S. 20
Abbildung 6:	Internationales Stufenschema.....	S. 20
Abbildung 7:	Keloid am Ohrläppchen vor (links) und nach Therapie durch <i>Fillet</i> -Lappentechnik (rechts).....	S. 23
Abbildung 8:	Aufbau der im Labor entwickelten Dehnkammer zur zyklischen Zelldehnung a) im unbesetzten Zustand, b) voll belegt mit vier 6-Well-Platten, c) in geschlossenem Zustand, bereit zur Dehnung.....	S. 34
Abbildung 9:	Zellviabilität im Resazurin-Assay: Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu NHF.....	S. 42
Abbildung 10:	Zellviabilität im Resazurin-Assay: Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich untereinander.....	S. 42
Abbildung 11:	Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu <i>normal human fibroblasts</i> (NHF) nach Inkubation für 96 h in NHF-Medium.....	S. 43
Abbildung 12:	Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) A-E und normaler dermalen Fibroblasten (NHF) nach zyklischer Dehnung.....	S. 44

Abbildung 13:	Zellviabilität von normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und der Keloidfibroblasten (KF) A-H insgesamt im Resazurin-Assay mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A (1.0 IU, 2.5 IU, 5.0 IU und 10.0 IU pro 100 µl NHF-Nährmedium) für 72 h.....	S. 45
Abbildung 14:	Zellviabilität aller Keloidfibroblasten (KF) A-H im Resazurin-Assay.....	S. 46
Abbildung 15:	Zellviabilität von normalen dermalen Fibroblasten (NHF) im Resazurin-Assay.....	S. 46
Abbildung 16:	Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) A im Resazurin-Assay...	S. 47
Abbildung 17:	Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) B im Resazurin-Assay...	S. 47
Abbildung 18:	Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) C im Resazurin-Assay...	S. 47
Abbildung 19:	Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) D im Resazurin-Assay...	S. 48
Abbildung 20:	Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) E im Resazurin-Assay...	S. 48
Abbildung 21:	Zellviabilität der Keloidfibroblasten (KF) H im Resazurin-Assay...	S. 48
Abbildung 22:	Zellproliferation von normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und aller Keloidfibroblasten (KF) A-H mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A.....	S. 49
Abbildung 23:	Zellproliferation aller Keloidfibroblasten (KF) A-H.....	S. 50
Abbildung 24:	Zellproliferation von normalen dermalen Fibroblasten (NHF).....	S. 50
Abbildung 25:	Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) A.....	S. 50
Abbildung 26:	Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) B.....	S. 51
Abbildung 27:	Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) C.....	S. 51
Abbildung 28:	Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) D.....	S. 51
Abbildung 29:	Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) E.....	S. 52
Abbildung 30:	Zellproliferation der Keloidfibroblasten (KF) H.....	S. 52
Abbildung 31:	Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach Inkubation für 96 h in NHF-Medium.....	S. 53
Abbildung 32:	Proteinexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach Inkubation für 96 h in NHF-Medium.....	S. 54
Abbildung 33:	Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) A-E und normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach zyklischer Dehnung.....	S. 55
Abbildung 34:	Proteinexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) A-E und normalen dermalen Fibroblasten (NHF) nach zyklischer Dehnung.....	S. 55
Abbildung 35:	Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in den Keloidfibroblasten (KF) A-E und normalen dermalen Fibroblasten (NHF)	S. 56
Abbildung 36:	Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in allen verwendeten Keloidfibroblasten (KF) A-E insgesamt und in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).....	S. 57
Abbildung 37:	Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in allen verwendeten Keloidfibroblasten (KF) A-E zusammen.....	S. 57
Abbildung 38:	Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).....	S. 57
Abbildung 39:	Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) A.....	S. 58
Abbildung 40:	Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) B.....	S. 58
Abbildung 41:	Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) C.....	S. 58
Abbildung 42:	Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) D.....	S. 59

Abbildung 43:	Proteinexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) E.....	S. 59
Abbildung 44:	Proteinexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) A-E und normalen dermalen Fibroblasten (NHF) mit und ohne Inkubation mit BT A.....	S. 60
Abbildung 45:	Proteinexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in allen verwendeten Keloidfibroblasten (KF) A-E insgesamt und in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).....	S. 60
Abbildung 46:	Proteinexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in allen verwendeten Keloidfibroblasten (KF) A-E insgesamt.....	S. 60
Abbildung 47:	Proteinexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).....	S. 61
Abbildung 48:	Proteinexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) A.....	S. 61
Abbildung 49:	Proteinexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) B.....	S. 61
Abbildung 50:	Proteinexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) C.....	S. 62
Abbildung 51:	Proteinexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) D.....	S. 62
Abbildung 52:	Proteinexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) E.....	S. 62
Abbildung 53:	Proteinexpression des <i>transforming growth factor</i> β_1 (TGF- β_1) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF) und den einzelnen Keloidfibroblasten (KF) A-E mit und ohne Inkubation mit Botulinumtoxin A.....	S. 63
Abbildung 54:	Proteinexpression des <i>transforming growth factor</i> β_1 (TGF- β_1) in allen verwendeten Keloidfibroblasten (KF) A-E insgesamt und in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).....	S. 64
Abbildung 55:	Proteinexpression des <i>transforming growth factor</i> β_1 (TGF- β_1) in allen verwendeten Keloidfibroblasten (KF) A-E insgesamt.....	S. 64
Abbildung 56:	Proteinexpression des <i>transforming growth factor</i> β_1 (TGF- β_1) in normalen dermalen Fibroblasten (NHF).....	S. 64
Abbildung 57:	Proteinexpression des <i>transforming growth factor</i> β_1 (TGF- β_1) in Keloidfibroblasten (KF) A.....	S. 65
Abbildung 58:	Proteinexpression des <i>transforming growth factor</i> β_1 (TGF- β_1) in Keloidfibroblasten (KF) B.....	S. 65
Abbildung 59:	Proteinexpression des <i>transforming growth factor</i> β_1 (TGF- β_1) in Keloidfibroblasten (KF) C.....	S. 65
Abbildung 60:	Proteinexpression des <i>transforming growth factor</i> β_1 (TGF- β_1) in Keloidfibroblasten (KF) D.....	S. 66
Abbildung 61:	Proteinexpression des <i>transforming growth factor</i> β_1 (TGF- β_1) in Keloidfibroblasten (KF) E.....	S. 66
Abbildung 62:	Relative Genexpression von Interleukin 6 (IL-6) in Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten (NHF).....	S. 67
Abbildung 63:	Relative Genexpression des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) in Keloidfibroblasten (KF) A-E im Vergleich zu normalen dermalen Fibroblasten (NHF).....	S. 68
Abbildung 64:	NHF, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.....	S. 68
Abbildung 65:	KF A, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.....	S. 69
Abbildung 66:	KF B, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.....	S. 69
Abbildung 67:	KF C, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.....	S. 70
Abbildung 68:	KF D, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.....	S. 70
Abbildung 69:	KF E, 5-fache (links) und 10-fache (rechts) Vergrößerung.....	S. 70

8.3 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintri-phosphat
BT, BT A	Botulinumtoxin A
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DMA	Essigsäuredimethylamid
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxytriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	und andere
FDPL	<i>flashlamp pumped pulsed dye laser</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
ged.	gedehnt
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H	Stunde
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
I-CAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN-γ	Interferon gamma
IL-x	Interleukine
IL-6	Interleukin-6
IU	<i>international unit</i>
KCl	Kaliumchlorid
KF	Keloidfibroblasten
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
M	molare Masse
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	mmol/Liter
mm ²	Quadratmillimeter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	<i>molecular weight</i>
n	Anzahl unabhängiger Versuche
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat

ng	Nanogramm
NHF	<i>normal human fibroblasts</i>
NHDF	normale humane dermale Fibroblasten
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
NTC	<i>no-template-control</i>
PBMC	<i>peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
pg	Pikogramm
P/S	Penicillin/ Streptomycin
p-Wert	<i>p-value</i> , Signifikanzwert
qPCR	quantitative <i>polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time-PCR</i>
RD	<i>Reagent Diluent</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RPE	Ribulosephosphat-3-Epimerase
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RSTL	<i>Relaxed Skin Tension Lines</i>
S.	Seite
sec	Sekunde
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TBABH	Tetrabutylammoniumborohydrid
T/E	Trypsin EDTA
TGF- α	<i>transforming growth factor-alpha</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-beta</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-alpha</i>
TNS	<i>trypsin neutralizing solution</i>
U	Umdrehung
u.a.	unter anderem
unged.	ungedehnt
V-CAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
v.Chr.	vor Christus
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad celsius
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
%	Prozent

8.4 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gassner für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation am Lehrstuhl für Hals-Nasen-und Ohrenheilkunde anfertigen zu dürfen. Vielen Dank für die interessante Themenstellung, das tolle Laborteam und ihre konstruktiven Ratschläge während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang gilt auch Frank großer Dank, der uns immer als Ansprechpartner zur Verfügung stand und dessen Anregungen und Hilfe eine große Unterstützung waren.

Vielen Dank an Michi, Petra und ganz besonders Elli für die große Hilfe bei den Laborarbeiten, das Heranführen an die Arbeit und nicht zuletzt das große Maß an Geduld!

Danke auch an meine Familie und Freunde, die mich während der ganzen Zeit unterstützt haben, danke Lulu, danke Janet!

Und zu guter Letzt: Danke liebe Vera! Wir kennen uns von Anfang bis Ende des Studiums, vom ersten Einführungstag bis zur letzten Examensprüfung, bei allen entscheidenden Hürden warst du an meiner Seite, auch während der Arbeit an dieser Dissertation. Ich konnte immer auf dich zählen, du bist ein wunderbarer Mensch und ich hoffe, unsere Wege werden sich auch fernab des Studiums noch oft kreuzen!

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname, Name:	Isabella Katharina Förstl
Geburtsdatum, -ort:	20.05.1988, Ingolstadt (Bayern)
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Werdegang

Schulausbildung:

1994-1998	Grundschule Donaufeld
1998-2007	Reuchlin-Gymnasium in Ingolstadt
Schulabschluss:	Abitur

Hochschulausbildung:

April 2008	Beginn des Zahnmedizin-Studiums an der Universität Regensburg
April 2009	Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Vorphysikum)
Oktober 2010	Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum)
Juli 2013	Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen)

Berufstätigkeit:

seit März 2014	Vorbereitungsassistentin in der Gemeinschaftspraxis Dres. Hradetzky in Dietfurt
----------------	---