

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenkrankheiten,

Kopf- und Halschirurgie

Direktorin Univ.-Prof. Dr. med. Chia-Jung Busch

der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Beeinflussung der Wundheilung von respiratorischen
Epithelzellen in vitro durch Roxithromycin**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2023

vorgelegt von

Katrin Scholten

geb. am 17.05.1985

in Greifswald

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: PD Dr. med. Achim Beule

2. Gutachter: apl. Prof. Dr. med. Michael Herzog

Raum: Greifswald, Seminarraum der Forschungslabore im DZ, Etage 5

Tag der Disputation: 11.12.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. EINLEITUNG	6
1.1. Roxithromycin	6
1.1.1. Herkunft und Struktur	6
1.1.2. Wirkmechanismus und Wirkspektrum	7
1.1.3. Pharmakodynamik	8
1.2. Ablauf der Wundheilung	11
1.3. Chronische Rhinosinusitis und Therapieoptionen mit besonderem Fokus auf einer Therapie mit Makroliden	12
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Materialien	16
2.1.1. Charakterisierung der Zelllinie S9	16
2.1.2. Arbeiten mit der Zellkultur	17
2.1.3. Das Wundmodell und die Inkubation mit Roxithromycin	18
2.1.4. Die Zellernte	19
2.1.5. Software-gestützte Auswertung des Wundmodells	20
2.2. Proteinbiochemische Methoden	21
2.2.1. Proteinextraktion mittels „freeze and thaw“	21
2.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	21
2.2.3. Zweidimensionale Polyacrylamid- Gelelektrophorese	22
2.2.4. 2D-Fluorescence Difference Gel Elektrophoresis	29
2.3. Software- gestützte Auswertung der Gele	34
2.4. Herstellung präparativer Gele für die 2D Gelelektrophorese und Probenpräparation mittels In-Gel Trypsin Verdau	35
2.5. Prinzip der Matrix- unterstützten Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) und der Liquidchromatographie- Massenspektrometrie (LC-MS)	37
2.6. Western Blots	39
2.7. Statistische Auswertung der Wundflächen	40
3. ERGEBNISSE	41
3.1. Alamar- Blue Vitalitätstest nach Inkubation mit Roxithromycin	41

3.2.	Auswertung der Zellkultur.....	42
3.3.	Qualitative Auswertung von 2D-Gelen mittels Silberfärbung	46
3.4.	Qualitative Analyse von Roxithromycineffekten mittels 2D-DIGE	47
3.5.	Effekt von Roxithromycin auf die Proteinsynthese von S9-Zellen	48
3.6.	Netzwerkanalysen (IPA)	53
3.7.	Effekt der Wunde auf die Proteinsynthese von S9-Zellen	56
3.8.	LC-MS- Analyse über einen kurzen Gradienten zur weiteren Differenzierung eines konzentrationsabhängigen Roxithromycineffektes	57
3.9.	LC-MS- Analyse über einen langen Gradienten nach Behandlung von S9-Zellen mit Roxithromyckonzentrationen von 20 µg/ml und 40 µg/ml.....	62
3.10.	Western Blots Anti- Spermidin- Synthase und EIF 5a.....	67
3.11.	Testung des Wundmodells auf Reliabilität (Experimentator-und Observervarianz)	70
4.	DISKUSSION	77
4.1.	Der Einfluss des Experimentierenden auf den Wundverschluss.....	78
4.2.	Proteomanalyse der medikamentös unbeeinflussten Wundheilung von S9-Epithelzellen.....	80
4.3.	Konzentrationsabhängige, antiproliferative Wirkung von Roxithromycin im Wundversuch	80
4.4.	Apoptoseinduktion durch höhere Konzentrationen von Roxithromycin (20 und 40 µg/ml).....	82
4.5.	Roxithromycin beeinflusst den ERK1/2-Pathway	85
4.6.	Roxithromycin und oxidativer Streß.....	88
4.7.	Beeinflussung von Zelladhäsion, Migration, Angiogenese und Zell- Matrix- Kontakten.....	93
4.8.	Proteinmodifikation und Induktion von Spermidin- Synthase durch niedrig- dosierte Roxithromycinbehandlung	98
5.	ZUSAMMENFASSUNG	101
6.	LITERATURVERZEICHNIS	104
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	125
	ANHANG	127

Materialien	127
a.) Chemikalien und Reagenzien.....	127
b.) Kits	128
c.) Roxithromycin	128
d.) Geräte.....	128
e.) Verbrauchsmaterial	130
f.) Software und Datenbanken.....	131
 Proteinbestimmung	 132
 Eidesstattliche Erklärung	 151
 Danksagung	 152

1. Einleitung

1.1. Roxithromycin

Mit der Isolierung von Erythromycin aus Stoffwechselprodukten von *Streptomyces erythreus* durch Mc Guire et al¹ im Jahr 1952 begann die Etablierung der Klasse der Makrolidantibiotika. Makrolide werden vornehmlich oral appliziert, sie zeichnen sich durch ein breites Wirkspektrum und eine hohe therapeutische Sicherheit aus. Bei vorliegender Penicillinallergie und entsprechendem Keimpektrum sind sie das Alternativ-Antibiotikum der Wahl.

1.1.1. Herkunft und Struktur

Erythromycin besteht aus einem 14-gliedrigen Lactonring mit einer Ketogruppe am C₉ und Hydroxylgruppen am C₆, C₁₁ und C₁₂, sowie zwei glykosidisch gebundenen Zuckern (Aminozucker Desosamin, Neutralzucker Cladinose)². Dieser Komplex ist im sauren Milieu (Magensäure) instabil und bedingt große interindividuelle Schwankungen in der resorbierten Menge des Medikamentes³. In den neueren, synthetisch aus Erythromycin hergestellten Makroliden wurden diese Gruppen daher chemisch modifiziert, um die Säurefestigkeit und somit die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe zu erhöhen⁴. Durch die Umwandlung der 9-Ketogruppe am Erythromycin in eine Ether-Oxim-Gruppe konnte Roxithromycin synthetisiert werden⁵ (siehe Abb. 1).

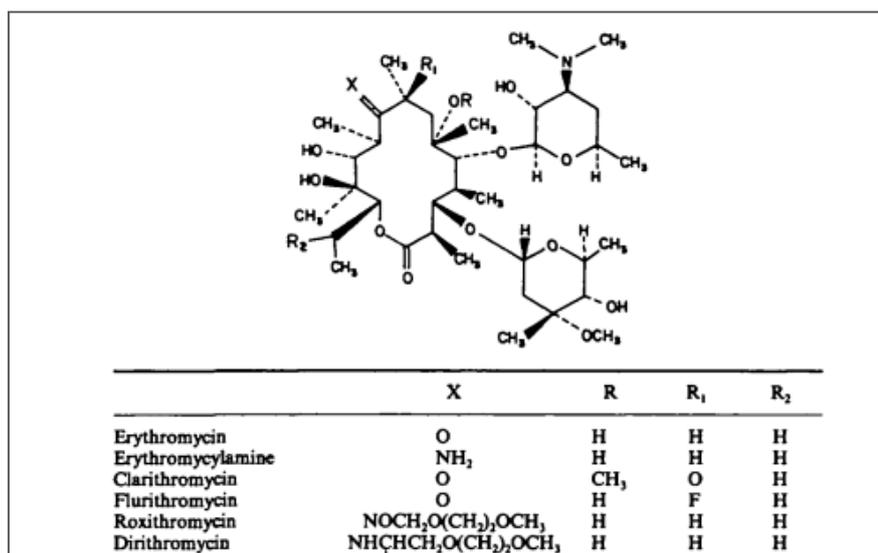


Abbildung 1: Chemische Struktur der 14-gliedrigen Makrolide (nach Harris et al²).

1.1.2. Wirkmechanismus und Wirkspektrum

Makrolidantibiotika entfalten ihre bakteriostatische Wirkung durch reversible Bindung an die 50S-Untereinheit bakterieller Ribosomen im Rahmen der Translation; die 30S-Untereinheit wird in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt ⁶.

Während der Translation wird die in Form von Nukleotiden kodierte Information der entsprechenden mRNA in die Aminosäurefolge eines Proteins übersetzt. Nachdem sich die zu translatierende mRNA, Initiationsproteine und die tRNA an die 30S-Untereinheit angelagert haben, bindet auch die 50S-Untereinheit und es entsteht der 70S-Initiationskomplex. Dieser besitzt zwei Bindungsstellen: die P-Stelle, an der die Peptidyl-tRNA mit der zu verlängernden Peptidkette bindet, und die A-Stelle für die Anlagerung der Aminoacyl-tRNA mit der anzuknüpfenden Aminosäure ⁷. Bindet die Aminoacyl-tRNA an ein Basentriplett der mRNA, wird die an ihr sitzende Aminosäure mittels einer Peptidyltransferase mit der Peptidkette der Peptidyl-tRNA verbunden ⁷. Die freie Peptidyl-tRNA verlässt anschließend die P-Stelle und der neu geknüpfte Peptidkette-Aminosäure-tRNA-Komplex kann in die P-Stelle rücken, indem sich das Ribosom relativ zur mRNA verschiebt ⁸. Die A-Stelle ist damit für den nächsten Syntheseschritt frei und der Zyklus beginnt von vorne (siehe Abb. 2).

Die 50S-Untereinheit fungiert in diesem Syntheseschritt als Donorstelle für die Bindung der Peptidyl-tRNA ⁹ und ist beteiligt an der Ausbildung der Peptidbindung ¹⁰.

Cundliffe und Mc Quillen publizierten bereits 1967, dass Makrolide die Translation während der Elongationsphase inhibieren. Sie wiesen nach, dass die Peptidyl-tRNA in Gegenwart von Erythromycin an der Akzeptorstelle gebunden bleibt, nachdem sie um einen Aminoacylrest verlängert wurde ¹¹.

Darauf aufbauende Studien zeigten, dass Roxithromycin nicht direkt die Aktivität der Peptidyltransferase beeinflusst, sondern die Verlängerung der neu gebildeten Peptidkette ^{7, 12, 13}.

Die Palette der therapeutischen Anwendung von Roxithromycin umfasst grampositive und gramnegative Kokken, grampositive und einige gramnegative Bacilli. Roxithromycin akkumuliert in den Zellen und ist gegen intrazelluläre Pathogene, zum Beispiel Legionellen, Chlamydien und Rickettsien wirksam. Es zeigt auch gute Wirksamkeit gegen atypische Erreger wie *Mycobacterium avium*, *Helicobacter pylori* und *Borrelia spp.* ⁴.

Die Empfehlungen zum Einsatz begründen sich neben der bakteriostatischen Wirkung auch in immunmodulatorischen Effekten und verbesserter Klinik ¹⁴. Die intravenöse Anwendung hat sich dabei nicht durchgesetzt ^{15, 16}. Abzuwägen bleiben die Risiken für kardiale Ereignisse (Arrhythmien, Long-QT-Syndrom), Leberschäden, Ototoxizität sowie Resistenzbildungen ^{17,18}.

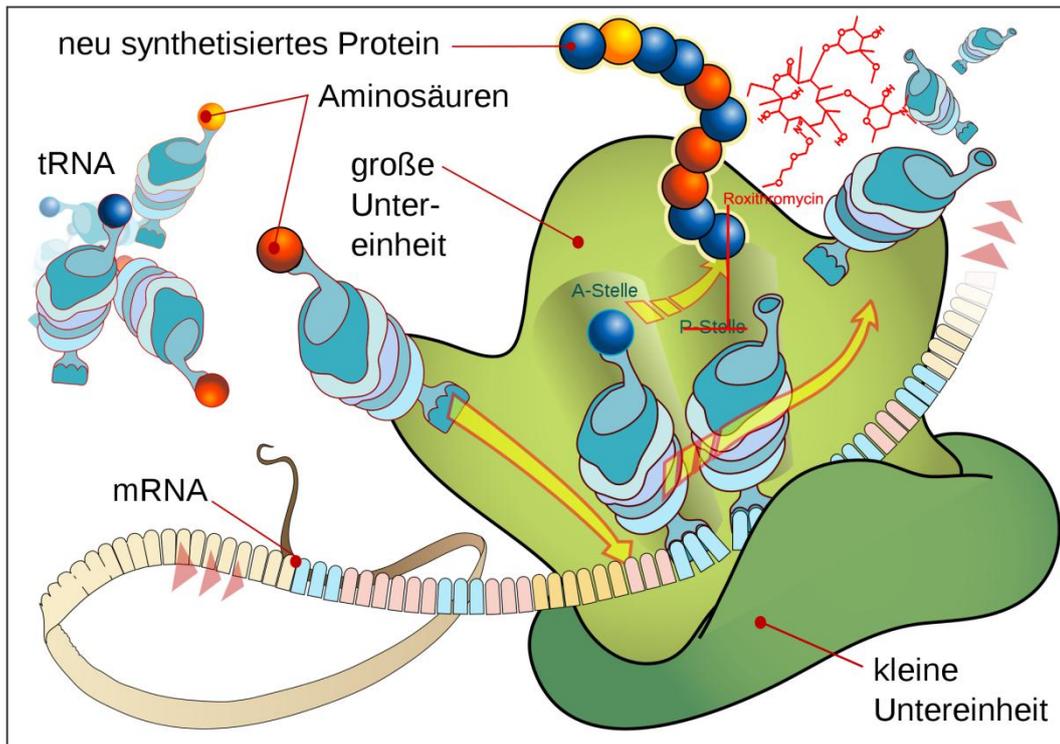


Abbildung 2: Ablauf der Translation und Angriffspunkt von Roxithromycin: Schematischer Aufbau eines Ribosoms mit naszierender Peptidkette. Übersetzung der Information der mRNA in die Aminosäurefolge eines Proteins. Darstellung des Angriffspunktes von Roxithromycin an der P-Stelle. [modifiziert aus wikipedia, [https://de.wikipedia.org/wiki/Translation_\(Biologie\)](https://de.wikipedia.org/wiki/Translation_(Biologie))]

1.1.3. Pharmakodynamik

Nach oraler Applikation von Roxithromycin kommt es zur raschen Aufnahme des Wirkstoffes bei einer Bioverfügbarkeit von etwa 60 %. Roxithromycin ist 15 Minuten nach Verabreichung im Serum nachweisbar und erreicht seinen Maximalspiegel im Blut nach 2 Stunden ¹⁹. Die Serumhalbwertszeit bei Gesunden liegt bei 8 bis 10 Stunden ²⁰. Die empfohlene Tagesdosis von 300 mg kann in 1-2 Einzelgaben eingenommen werden ²¹. Puri und Lassman konnten 1987 für beide Dosierschemata zeigen, dass sich unter wiederhol-

ter Gabe (11 Tage) innerhalb von 96 Stunden ein Fließgleichgewicht (steady-state) einstellt²⁰. Durch die in der Klinik mit der Zielstellung einer antibiotischen Wirkung üblichen Verabreichung von 150 mg des Makrolids im Abstand von 12 Stunden werden für 24 Stunden wirksame Plasmakonzentrationen gegenüber empfindlichen Erregern erreicht. Im steady-state liegen die maximalen Plasmakonzentrationen des Wirkstoffes bei $9,3 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$. Nach Gabe von 300 mg Roxithromycin im Abstand von 24 Stunden beträgt die maximale Plasmakonzentration $10,9 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$. Im steady-state liegt die Restkonzentration nach 24 Stunden bei $2,2 \pm 0,64 \mu\text{g/ml}$. Die Dosiskinetik von Roxithromycin ist nicht linear²⁰ (siehe Abb.3). Die Serumproteinbindung erfolgt konzentrationsabhängig im Wesentlichen an saures α -1-Glykoprotein²², wobei sich die Serumkonzentration von Roxithromycin umgekehrt proportional zur Serumproteinbindung verhält (im Konzentrationsbereich bis $5 \mu\text{g/ml}$ liegt die Serumproteinbindung bei 87 %, bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ bei 75 %)²³.

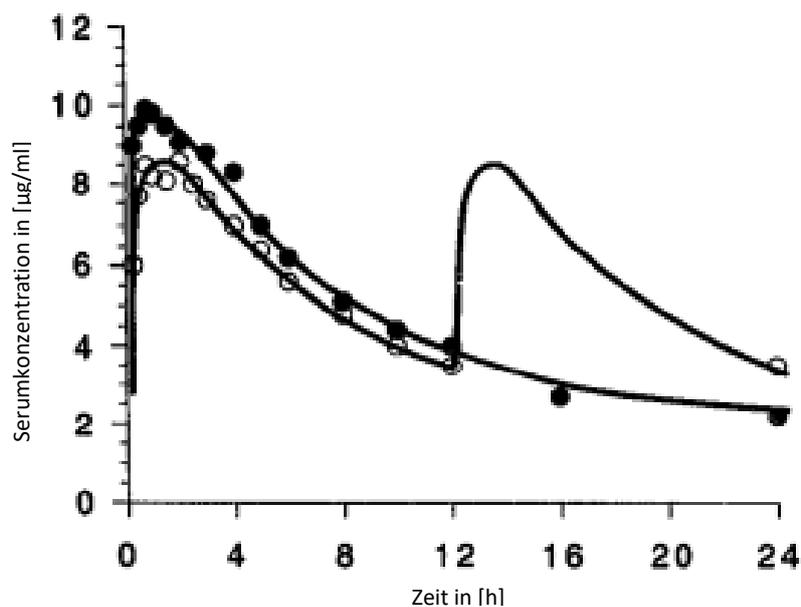


Abbildung 3: Serumkonzentrationen von Roxithromycin an gesunden Probanden gemessen im steady state nach 11 Tagen bei Gabe von 300 mg 1 mal täglich (•) oder Gabe von 150 mg 2 mal täglich (o). (nach Puri und Lassman).

Die Gewebegängigkeit ist gut. Das Verteilungsvolumen von Roxithromycin beträgt $0,4 \text{ l/kg}$ ²⁴. Nach oraler Zufuhr werden hohe Konzentrationen von Roxithromycin in der Prostata, den Nebenhoden und der Haut erreicht^{24,25}. Roxithromycin ist bei entzündungsfreien Meningen nicht im Liquor cerebrospinalis nachweisbar und wird in menschl-

chen Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten angereichert²⁴. Es wird zu etwa 35 % in der Leber metabolisiert und überwiegend biliär ausgeschieden. Makrolide gelangen in geringen Konzentrationen in die Muttermilch¹⁹. Die Anwendung in der Schwangerschaft und der Stillzeit sollte daher nur nach strenger Indikationsstellung erfolgen.

In Studien konnte die hervorragende Penetration von Roxithromycin sowohl in die oberen als auch in die unteren Atemwege bestätigt werden, wodurch die Empfehlung des Makrolids zur Therapie von Infektionen im HNO-Bereich gerechtfertigt ist. Bei Patienten mit chronischer Sinusitis zeigten sich in der Mukosa nach einmaliger Einnahme von 300 mg Roxithromycin zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor Probeentnahme nur geringfügige Unterschiede zwischen Serum- und Mukosakonzentrationen (Serum 3,61 mg/l, Mukosa 3,16 mg/l bei 3h; Serum 2,15 mg/l, Mukosa 2,1 mg/l nach 12h)²⁶. Bei Einnahme von 150 mg alle 12 Stunden für drei Tage erreichte Roxithromycin 6 Stunden nach Verabreichung einen maximalen Gewebespiegel von $1,78 \pm 0,73$ mg/kg in der Nasenschleimhaut bei einer Serumkonzentration von $4,0 \pm 0,55$ mg/l. Die maximale Serumkonzentration wurde durchgehend bereits nach 2 Stunden erreicht und betrug $7,28 \pm 1,85$ mg/l. In den Tonsillen lag die maximale Gewebekonzentration nach 4 Stunden bei $2,2 \pm 1,21$ mg/kg und einer Serumkonzentration von $4,92 \pm 0,97$ mg/l. Roxithromycin erreicht in der Lunge einen maximalen Gewebespiegel von $2,14 \pm 0,87$ mg/kg nach 6 Stunden bei einer Serumkonzentration von $4,16 \pm 0,29$ mg/l. In dieser Studie ist Roxithromycin durch hohe Serumkonzentrationen bei niedrigen Konzentrationen im Gewebe charakterisiert. Dies wurde durch die Bindung an saures α -1 Glykoprotein erklärt. Dennoch bleiben die erreichten Gewebekonzentrationen ausreichend hoch und lange genug nachweisbar, um einen antibakteriellen Effekt hervorzurufen²⁷.

Die günstige Gewebepenetration von Roxithromycin konnte auch für Zahnfleischproben unter fünf-tägiger Therapie mit 150 mg Roxithromycin bei zweimaliger Gabe pro Tag nachgewiesen werden. Die maximale Serumkonzentration war 4 Stunden nach der letzten Medikamentendosis vergleichbar mit den Angaben für die Nasennebenhöhlenschleimhaut mit $6,6 \pm 1,15$ µg/ml. Der höchste Spiegel im Gewebe wurde mit einem Wert von $4,63 \pm 1,84$ µg/g nach 8 Stunden erreicht. Die mittlere Serumkonzentration lag während eines Dosisintervalls stets über 2 µg/ml, die Gewebekonzentration bis 10 Stunden nach

der letzten Dosis. Dieser Wert übertrifft die minimale Hemmkonzentration der meisten für bakterielle Infektionen im HNO- Bereich verantwortlichen Erreger²⁸.

Zusammenfassend zeigt Roxithromycin eine gute Penetration in das Gewebe im HNO-Bereich. Anhand der nachgewiesenen Wirkspiegel kann mit einer ausreichenden antibiotischen Wirkung bei Entzündungen von Nase und Nasennebenhöhlen, Zahnfleisch und Lunge ausgegangen werden. Damit scheint Roxithromycin eine gute Option für die Behandlung von Entzündungen des respiratorischen Epithels unabhängig von seiner Lokalisation zu sein.

1.2. Ablauf der Wundheilung

Wundheilung bezeichnet einen hoch organisierten, dynamischen Prozess, der durch Blutgerinnung, Inflammation, Proliferation und Gewebeumbildung gekennzeichnet ist und durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren reguliert wird²⁹.

Initial kommt es durch die Gewebeerletzung zum Austritt von Blut und zur Aktivierung der Gerinnungskaskade durch Plättchenfaktoren. Es entsteht ein Thrombus, der abtrocknet und eine Kruste bildet. Die sich anschließende resorptive Phase ist durch die Einwanderung von Granulozyten charakterisiert. Die von ihnen freigesetzten proinflammatorischen Zytokine bedingen eine Vasodilatation und locken Makrophagen und Lymphozyten chemotaktisch an³⁰. Es folgt die Phagozytose von Exsudat und nekrotischem Zellmaterial. Eingewanderte Makrophagen steuern den Übergang zur Proliferationsphase durch Produktion von Wachstumsfaktoren wie z.B. Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α ³¹. Die Bildung von Granulationsgewebe durch einspritzende Kapillaren und Fibroblasten leitet die Reparation ein. Bereits ab dem dritten Tag ist eine ausgeprägte Kollagensynthese durch Fibroblasten nachweisbar, was zur Stabilität der Narbe beiträgt³². Bei der Wundheilung wird zunächst Typ-III-Kollagen gebildet, das mit zunehmender Reifung der Narbe abgebaut und durch Typ-I-Kollagen ersetzt wird³³. Dieses Narbengewebe bzw. die Fibrose kann sich in parenchymatösen Organen (z.B. Lunge) als Diffusionshindernis bemerkbar machen und zu einer Funktionsminderung des Organs beitragen. Parallel zur Ausbildung des Granulationsgewebes migrieren Zellen vom Wundrand ausgehend konzentrisch Richtung Defekt und tragen somit zum Wundverschluß bei³⁴. Zusätz-

lich kommt es zu Osteoneogenese und einer Reinnervierung der Schleimhautdrüsen^{35, 36}. Die Wundheilungszeit im Sinne eines optimalen, funktionellen Endergebnisses kann bis zu zwei Jahren betragen; die iatrogen geschaffene Operationswunde konkurriert dabei mit der vorbestehenden chronischen Schleimhauterkrankung³⁷.

1.3. Chronische Rhinosinusitis und Therapieoptionen mit besonderem Fokus auf einer Therapie mit Makroliden

Die chronische Rhinosinusitis (CRS) ist eine häufige Erkrankung der Nasenschleimhaut und durch persistierende Inflammation über mehr als 12 Wochen gekennzeichnet³⁸. Traditionell abgegrenzt werden eine Form mit (CRSwNP) und ohne Polyposis Nasi (CRSsNP) sowie die allergische Pilzsinusitis³⁹. Histologisch zeichnet sich CRSsNP durch Fibrose der Mukosa und Basalmembran aus, während bei Vorherrschen von Nasenpolypen eine Ödemkomponente und die Entwicklung von Pseudozysten zu beobachten ist⁴⁰.

Immunologisch ist CRSsNP durch eine TH1- oder TH17-Dominanz charakterisiert, welche mit Neutrophilie, TGF-Beta-Produktion, Typ I-Interferonen und IL-6, IL-8, sowie IL-17-Synthese einhergeht. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei CRSwNP ein TH2-geprägter Phänotyp mit erhöhter Expression von beispielsweise Thymic stromal lymphoprotein (TSLP) und vermehrter Freisetzung von IL-4, IL-5, IL-13, IL-25 und IL-33⁴¹.

TGF-Beta ist ein wichtiger Regulator der Gewebearchitektur und scheint bei der CRS für die Ausbildung der unterschiedlichen Phänotypen mit verantwortlich⁴².

Gezeigt werden konnte, dass bei Patienten mit CRSwNP im Vergleich zur Kontrollgruppe die TGF-Beta-Proteinkonzentration, der Rezeptor und mRNA signifikant geringer waren, während bei an CRSsNP Erkrankten signifikant erhöhte Werte vorlagen⁴³. Erniedrigte Spiegel waren bei der CRSwNP mit Ödembildung und reduzierter Kollagensynthese assoziiert während erhöhte TGF-Beta-Konzentrationen bei CRSsNP zu vermehrter Kollagenablagerung und Fibrose führte⁴⁴.

Zusätzlich besteht bei an CRSwNP-Erkrankten eine gestörte Epithelbarrierefunktion mit erhöhter Permeabilität und erniedrigter Widerstandsfähigkeit⁴⁵.

Nach Scheitern einer topischen Kortikoidtherapie (z.B. als Nasenspray), Nasendusche mit physiologischer Kochsalzlösung und ggf. Exazerbationsbehandlung mit Antibiotika folgt in

der Regel die chirurgische Therapie mittels funktioneller endoskopischer Nasennebenhöhlenchirurgie (FESS) ^{46, 47, 48}. Ziel ist die Erleichterung der Nasenatmung, Debridement von inflammatorischen Gewebe und Vergrößerung der topisch zu erreichenden Schleimhautfläche ⁴⁹.

In der Praxis wird postoperativ häufig mit kortikoidhaltigen Nasenspülungen gearbeitet, da nun eine Anatomie vorliegt, die eine ausreichende Medikamentenverteilung ermöglicht ⁵⁰. Kortikoide beschleunigen die Reepithelialisierung und verringern die Ausbildung von Granulationsgewebe und Osteoneogenese ⁵¹. Dies äußert sich in einer geringeren Restenosierung der erweiterten Ostien ³⁴.

Die Verwendung einer Nasentamponade in der postoperativen Situation wird unterschiedlich bewertet; bewiesen ist jedoch eine Reduktion von postoperativen Blutungen und Synechienbildung ^{52, 53, 54}. Nachteilig sind ein erhöhtes Infektionsrisiko, die Behinderung der Nasenatmung und der Patientendiskomfort.

Die Empfehlung zum Einsatz von systemischen Antibiotika in der präoperativen Situation hat einer Cochrane Analyse nicht stand gehalten, für die topische Applikation gab es keine belastbaren Publikationen ¹⁶. Dennoch soll an dieser Stelle auf eine doppel-blinde, randomisierte, placebokontrollierte Studie hingewiesen werden, die zeigen konnte, dass die 3-monatige niedrigdosierte Roxithromycingabe (150 mg per os/d) unter anderem zu einer Verbesserung des endoskopischen Befundes und IL-8-Spiegeln bei an chronischer Rhinosinusitis Erkrankten führte ⁵⁵.

In den aktuellen Empfehlungen der Fachgesellschaften (European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020, International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis 2021) zeichnet sich ein weiterentwickelter Evidenz-basierter Therapiealgorithmus zur Behandlung der CRSwNP ab ⁵⁶. Dieser war notwendig aufgrund der nach wie vor hohen Rückfallrate, insbesondere bei CRSwNP, sowie Notwendigkeit von Folgeoperationen ^{57,58}.

So wurden in den letzten zwei Jahren Biologika (monoklonale Antikörper gegen IgE, IL-5 und IL-4/13) für die schwere chronische Rhinosinusitis mit Polyposis Nasi zugelassen ⁵⁹⁻⁶¹. Die genaue Indikation ist derzeit noch in der klinischen Entwicklung aber aufgrund der Wirksamkeit bei 60 - 90 % der PatientInnen und der Begrenzung auf schwer Erkrankte, besteht weiterhin die Indikation zur Nasennebenhöhlenchirurgie.

Der mögliche Benefit einer Makrolidtherapie wurde daher auch in der postoperativen Situation evaluiert. Nach erfolgter endoskopischer Nasennebenhöhlenchirurgie wurde der Effekt von Erythromycin im Vergleich zur topischen Kortikoidtherapie bei postoperativ persistierender Sinusitis über 12 Wochen untersucht. In beiden Gruppen konnte anschließend ein gebesserter endoskopischer Befund dokumentiert werden⁶². In einer weiteren Publikation zeigte sich unter 24-wöchiger postoperativer niedrig dosierter Clarithromycineinnahme ein verbesserter endoskopischer Befund und geringere Rückfallrate bei CRSwNP-PatientInnen im Vergleich zur Kontrollgruppe während des Untersuchungszeitraumes⁶³.

In vitro-Studien konnten nachweisen, dass Roxithromycin einen hemmenden Einfluss auf die Produktion von VEGF (Vascular endothelial growth factor) in Fibroblasten ausübt^{64,65}. VEGF spielt eine wesentliche Rolle bei der Inflammation und Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen und wird unter anderem durch hypoxische Zustände und TNF- α induziert⁶⁶; diese Umstände finden sich oft bei der chronischen Sinusitis und werden als Risikofaktor für eine schlechte Wundheilung angesehen. Zudem ist gut untersucht, dass Makrolide die Produktion von Interleukin-8 und Interleukin-1 β hemmen, die für das Rekrutement von neutrophilen Granulozyten mit verantwortlich sind^{67,68} und die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Alveolarmakrophagen fördern^{69,70}.

In gingivaler Saumflüssigkeit von PatientInnen mit Ciclosporin-A induzierter Peridontitis konnte nach systemischer Roxithromycinbehandlung eine Reduktion von VEGF, TGF-Beta und IL-1 β gezeigt werden⁷¹. Einen Überblick über den status quo der immunmodulatorischen Effekte von Makrolidantibiotika gibt folgende Abbildung 4⁷².

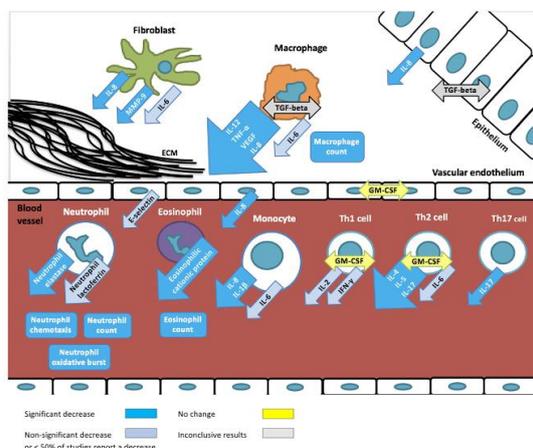


Abbildung 4: Überblick über immunmodulatorische Effekte der Makrolidantibiotika (Zimmermann et al⁷², 2018)

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation soll der Einfluss von Roxithromycin, ein in der Klinik etabliertes Makrolidantibiotikum, auf zelluläre Mechanismen der Wundheilung im Zellkulturmodell untersucht werden. Dazu werden S9-Epithelzellen, die ein Modell für differenziertes, respiratorisches Epithel darstellen, einer standardisierten Wundsetzung unterzogen und mit Roxithromycin in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Parallel dazu wurde eine medikamentös unbeeinflusste Kontrollgruppe analysiert.

Die Vermutung bestand, dass Roxithromycin neben der bakteriostatischen Wirkkomponente auch molekulare Effekte im Epithelgewebe bewirkt, die sich positiv auf die postoperative Wundheilung auswirken.

Mittels Proteomanalyse sollten die durch Roxithromycin regulierten Proteine identifiziert werden, um die intrazelluläre Wirkweise des Medikaments zu verstehen und mit der gemessenen Auswirkung auf die Wundheilungsgeschwindigkeit von Roxithromycin in verschiedenen Dosierungen zu korrelieren.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Charakterisierung der Zelllinie S9

Für die Experimente wurde die Zelllinie S9 verwendet, die von der *American Type Culture Collection* (ATCC Nummer CRL-2778) bezogen wurde.

Ursprünglich stammen die Zellen aus dem Bronchus eines Patienten mit Zystischer Fibrose und wurden 1992 isoliert. Durch die Behandlung der humanen Epithelzellen mit dem Hybrid-Virus *adeno-12-SV40* wurde die Mutterzelllinie IB3-1 etabliert⁷³. Diese wies jedoch einen für Zystische Fibrose charakteristischen Defekt in der cAMP-vermittelten Aktivierung von Protein Kinase A auf⁷⁴. Durch Transfection mit dem Wildtyp *Adenovirus-assoziierten viralencystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (AAVCFTR) wurden die Mutationen der IB3-1 Zelllinie phänotypisch korrigiert und sogleich die Zelllinien S9 und C38 etabliert. Die S9-Zelllinie kann als Modell für differenziertes, respiratorisches Epithel angesehen werden.

ATCC Number: **CRL-2778**
Designation: **S9**

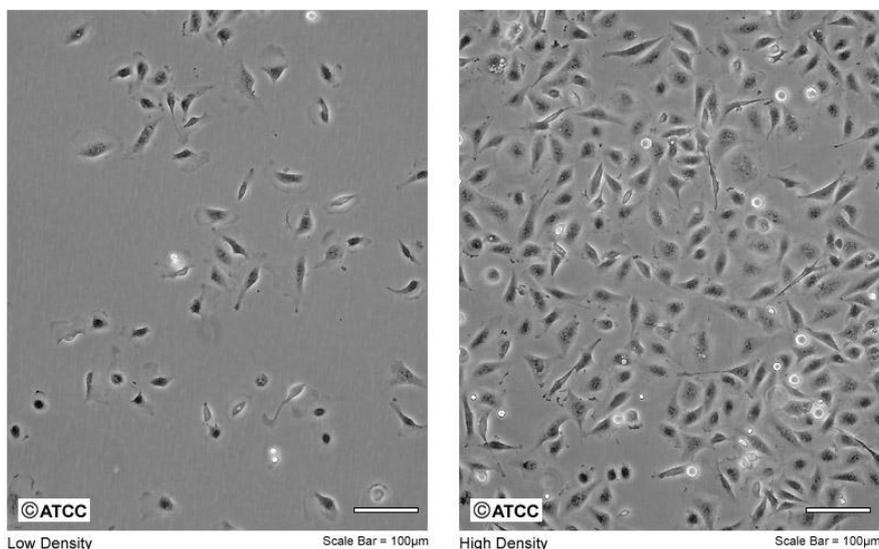


Abbildung 5: Morphologie von S9-Zellen bei geringer Zelldichte (links) und hoher Zelldichte (rechts). (nach ATCC)

2.1.2. Arbeiten mit der Zellkultur

Tabelle 1: Zellkulturmedium pH 7,15; Trypsinlösung

Zellkulturmedium pH 7,15	Endkonzentration	Für 1 Schale
MEM Earl Standard w/o L-Glutamin	94 % (v/v)	9,4 ml
Zusätze:		
Fetales Kälberserum	4 %	0,4 ml
Glutamin	2 %	0,2 ml
Nichtessentielle Aminosäuren	1 %	0,1 ml
Trypsinlösung	Endkonzentration	
Trypsin	0,05 %	
EDTA	0,022 %	
PBS	Ad	

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen im Biotechnikum Greifswald im Zellkulturlabor der Arbeitsgruppe *Junior Research Group Transcriptomics / Functional Genomics* durchgeführt (Leitung Dr. Homuth). Die S9-Zelllinie wächst adhärent und wurde in Zellkulturschalen bei einer Temperatur von 37°C und in 5 %iger CO₂-Atmosphäre unter Zusatz von 10,0 ml Zellkulturmedium im Brutschrank kultiviert. Für die Experimente wurden Zellen zwischen der 17. und 24. Passage verwendet. In Abhängigkeit von der Zelldichte, spätestens jedoch nach 4 Tagen, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei Konfluenz des Zellrasens, etwa 1 x10⁶ Zellen/ml, wurden die Zellen passagiert. Zunächst wurden die Zellen mit 5,0 ml PBS gewaschen und für fünf Minuten mit 1,0 ml Trypsinlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Beklopfen der Schale konnten die Zellen von ihrer Unterlage gelöst werden. Die anschließende Inkubation mit 3,0 ml frischem Zellkulturmedium stoppte die enzymatische Peptidasereaktion und mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette trennte vorhandene Zell-Zell-Aggregate. Die abgelösten Zellen wurden im Verhältnis 1:4 auf neue Zellkulturschalen verteilt. Die Vitalität der Zellen wurde nach Instruktionen des Herstellers Invitrogen mit dem Indikator Alamar Blue[®] überprüft.

2.1.3. Das Wundmodell und die Inkubation mit Roxithromycin

Für die Umsetzung des Wundmodells nach Beule^{75,76} wurden konfluente S9-Zellen in einer Zellkulturschale (Durchmesser 10,0 cm) mit einer Hautstanze (Durchmesser 4,0 mm) behandelt. Pro Schale wurden 21 Wunden nach dem in der Abbildung 6 dargestellten Schema gesetzt und adhärenente Zellen innerhalb der gesetzten Stanze mit Medium ausgespült. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und mit 10 ml frischem Medium überschichtet. Nachdem alle für ein Experiment benötigten Zellkulturschalen diesem Procedere unterzogen worden sind, wurden die Schalen in Kontrollgruppe und Roxithromycinbehandlung mit jeweiligem Erntezeitpunkt (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h) eingeteilt. Dazu wurden die Schalen entsprechend beschriftet und die für das Medikament vorgesehenen Schalen mit Roxithromycin versetzt. 1 g Roxithromycin (Sigma) wurde in 50 ml 99,8 % Ethanol (Roth) gelöst und anschließend 1 ml dieser Lösung in 19 ml nicht supplementiertes Medium überführt und steril filtriert, sodass eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml zur Verfügung stand. Entsprechend der gewünschten Roxithromycin Endkonzentration von 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml und 160 µg/ml wurde diese Stammlösung der Zellkulturschale zugefügt. Die Qualität der Wunden und ihre Entwicklung wurden mikroskopisch über den gesamten Experimentverlauf kontrolliert und je Zellkulturschale fünf Wunden über den Verlauf des Experimentes digital fotografiert. Um den Einfluss des Medikamentes ohne Wunde zu analysieren, wurde stets ein Set bestehend aus Kontrollgruppe und Roxithromycinbehandlung mit gleichen Konzentrationen und Erntezeitpunkten parallel gestartet.

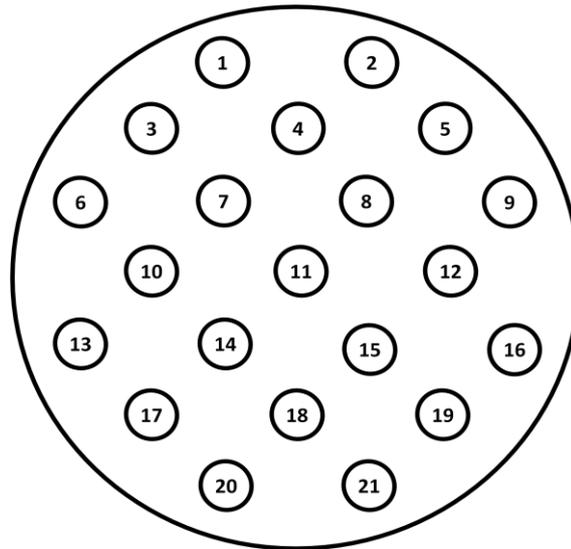


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Zellokulturschale (d= 10 cm) mit definiertem Wundmodell und Nummerierung der gestanzten Wunden.

2.1.4. Die Zellernte

Tabelle 2: Lösungen für die Zellernte (Lysispuffer und PBS)

1x Lysispuffer	Endkonzentration	Menge
Urea	8 M	24,0 g
Thiourea	2 M	7,625 g
A.dest.	-	ad 50,0 ml
<hr/>		
1x PBS pH 7,4	Endkonzentration	Menge
NaCl	137 mM	8,0 g
KCl	2,7 mM	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	6,5 mM	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,9 mM	0,2 g
Aqua dest.	-	ad 1000,0 ml

Für die Zellernte wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit 5,0 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1,2 ml Lysispuffer inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden die restlichen, nicht lysierten Zellen vom Untergrund abgelöst und die entstandene Suspension in 2,0 ml Reaktionsgefäße mit Safe-Lock überführt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das Procedere mit 0,6 ml Lysispuffer wiederholt. Die Zellen wurden in flüssigem

Stickstoff schockgefroren und entweder direkt mittels Proteinextraktion aufgeschlossen (s. Kapitel 2.2.1) oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert.

2.1.5. Software- gestützte Auswertung des Wundmodells

Um Unterschiede im Wachstum zu detektieren, wurden pro Bedingung (unbehandelte Kontrolle/ Roxithromycin in den verschiedenen Dosierungen) je Zellkulturschale 5 der 21 Wunden alle 12 bzw. 24 Stunden digital fotografiert, bis diese ihren Erntezeitpunkt erreichten. Daran schloss sich eine Software-gestützte (*Photoshop CS4, Adobe*) Auswertung der fotografierten Wunden an. Es wurde eine benutzerdefinierte Messskala erstellt, die die gemessene Pixellänge in den definierten Stanzendurchmesser von 4 mm umrechnet. Anschließend wurde mithilfe des „Lasso-Werkzeuges“ die von Zellen bewachsene Fläche innerhalb der Stanze umrandet und die residuale Wundfläche in mm^2 berechnet. (siehe Abb. 7). Die Verlässlichkeit der Wundflächenbestimmung wurde durch mehrmaliges Vermessen an verschiedenen Zeitpunkten (day-to-day Reliabilität) bzw. durch mehrere unabhängige, verblindete Untersucher (interobserver-Reliabilität) überprüft. Als Maß der Übereinstimmung wurde ein Intraclass-Korrelation Koeffizient (ICC) in einem zufälligen zwei-Wege gemischtem Modell mit Testung auf Konsistenz mittels SPSS Version 20.0 berechnet. Es wurden Diagramme zur Entwicklung der residualen Wundfläche für die Kontrollgruppe und die Roxithromycindosierungen erstellt, indem die Rohwerte für die jeweiligen Zeitpunkte und Bedingungen einer Mittelwertbestimmung unterzogen wurden. Anschließend erfolgte die Umrechnung in die prozentuale Restfläche und Auftrag gegen die Zeitpunkte der Ernte. Mittels Test für verbundene Stichproben wurde ein Gruppenunterschied in der Entwicklung der residualen Wundfläche unter Verwendung einer post-hoc Korrektur (Bonferroni) ermittelt. Hierbei lag das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$. Die Analyse erlaubte Aussagen über Therapieeffekte für jeden untersuchten Zeitpunkt und jede verwendete Medikamentenkonzentration.

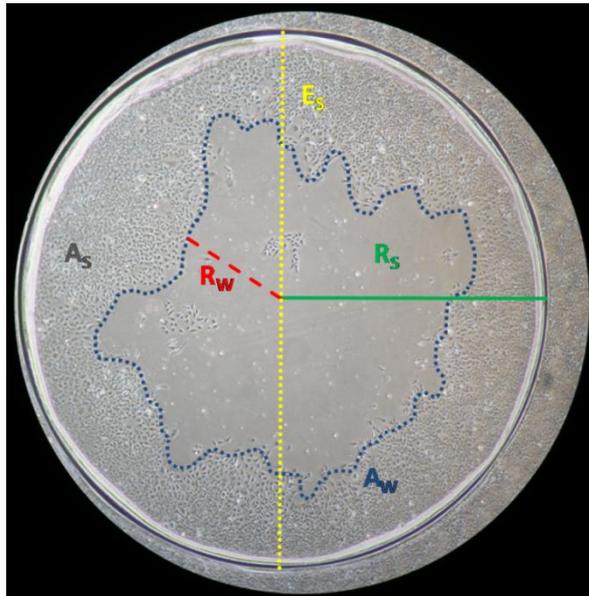


Abbildung 7: Schematische Beschreibung der Wundmessung: Vergleich der ursprünglichen mit der momentanen Wunde basierend auf dem Wunddurchmesser oder der Wundfläche.

A_W = residuale Wundfläche

A_S = gestanzte Wundfläche

R_W = Radius des minimalen Wunddurchmessers

R_S = Radius der gestanzten Wunde

E_S = Eichlänge (4 mm) der gestanzten Wunde.

2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.1. Proteinextraktion mittels „freeze and thaw“

Mit Hilfe der Proteinextraktion sollten die Proteine durch Auflösung des Zellverbandes in Lösung gebracht werden. Hierfür wurde eine „freeze and thaw“-Methode angewendet. Die gefrorenen Proben (vgl. 2.1.4) wurden für 10 Minuten bei 30°C und 1400 rpm im Wärmeschüttler aufgetaut und anschließend durch kurze Inkubation in Flüssigstickstoff erneut schockgefroren. Nach insgesamt fünf Zyklen wurden die Proben für eine Stunde bei 14000 rpm und 20°C der Kühlzentrifuge zugeführt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß (2,0 ml) pipettiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70°C eingefroren.

2.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde mit der Methode nach Bradford durchgeführt⁷⁷. Die Reaktion beruht auf der Bindung von Proteinen an das Bradford-Reagenz und wird durch ein Verschieben des Absorptionsmaximums von $\lambda = 465 \text{ nm}$ zu $\lambda = 595 \text{ nm}$ erfasst. Für die Messung einer Probe wurde zunächst eine Eichreihe beschickt (s.Tab.3) und mit dem Photometer gemessen:

Tabelle 3: Pipettierschema Eichreihe

	0	1	2	4	6	8	10	12
A.dest.	795 µl	785 µl	775 µl	755 µl	735 µl	715 µl	695 µl	675 µl
Proben- puffer	5 µl							
BSA	0 µl	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	100 µl	120 µl
Bradford	200 µl							

Der mitgeführte BSA-Proteinstandard (bovines Serumalbumin) besitzt eine Konzentration von 0,1 µg/µl. Anschließend wurden 5 µl der zu messenden Probe mit 795 µl Aqua dest. und 200 µl Bradford- Reagenz versetzt und somit ebenfalls auf ein Volumen von 1,0 ml aufgefüllt. Die Probe wurde in eine 1,0 ml Einmalküvette überführt und gegen den Leerwert 0 gemessen. Im Folgenden wurde der Proteingehalt der Probe anhand der Eichkurve bestimmt und entsprechend der eingesetzten Probenmenge berechnet. Bei den isolierten Proteinproben betrug der Proteingehalt zwischen 1,1- 3,3 µg/µl. Sofern nötig, wurden die Proben mit Probenpuffer verdünnt.

2.2.3. Zweidimensionale Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (2D-PAGE) wurde in den siebziger Jahren von Klose und O'Farrell etabliert und ist ein Verfahren, mit dem die Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend nach dem Molekulargewicht aufgetrennt werden^{78, 79}. Die 2D-PAGE mittels IEF- Streifen wurde in dieser Arbeit für die Extraktkontrollen und anschließende Silberfärbung verwendet.

2.2.3.1. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

In diesem Arbeitsschritt folgt auf die Beladung der Gelstreifen mit den Proteinen die Auftrennung nach ihrem isoelektrischen Punkt.

Tabelle 4: Puffer für die IEF

1x Lysispuffer	Endkonzentration	Menge
Urea	8 M	1,92 g
Thiourea	2 M	0,61 g
Aqua bidest.	-	ad 4,0 ml

10x Rehydratisierungspuffer	Endkonzentration	Menge
CHAPS (2 %)	0,4 %	80,0 mg
DTT	0,43 %	17,5 mg
Pharmalyte pH 3-10	13,125 %	52,5 µl
Bromphenolblau	-	Spatelspitze
Probenpuffer	-	ad 400,0 µl

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit einer *Pharmacia Biotech Multiphor II* von Amersham Biosciences durchgeführt. Als Träger für die Proben wurden 24 cm lange Streifen (*Immobiline DryStrips*) verwendet, die einseitig mit einem konserviertem Polyacrylamid-Gel beschichtet waren und einen nicht linearen immobilisierten pH-Gradienten zwischen pH 4 und pH 7 aufwiesen. Für eine anschließende Silberfärbung wurden die Streifen mit 100,0 µg Protein beladen, für die Kolloidale Coomassie-Färbung waren 400,0 µg erforderlich. Die Proben wurden mit dem Probenpuffer auf ein Volumen von 450,0 µl gebracht und mit 50,0 µl Rehydratisierungspuffer versetzt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 500,0 µl ergab. Anschließend wurde die Rehydratisierungslösung bei 20°C für 30 Minuten und 1400 rpm im Thermomixer inkubiert und für weitere 7 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. In Vorbereitung auf die IEF wurden die Gel-Streifen über Nacht in je 485,0 µl Rehydratisierungslösung inkubiert, um das Polyacrylamid-Gel mit den Proteinen zu beladen (In-Gel Hydration). Um ein Austrocknen während der Inkubation zu verhindern, wurden die Streifen mit Mineralöl (*Dry strip cover fluid*) überschichtet. Nach der Rehydratisierung wurde das Öl abgegossen und die Streifen mit Aqua dest. abgespült um überschüssigen Harnstoff zu entfernen. Anschließend wurden die Streifen in eine zum Fokussierungssystem gehörige Schale (*IPG strip tray*) gelegt, die an den Stromkreislauf angeschlossen wurde. Nachdem die Elektroden auf den mit Aqua dest. befeuchteten

Elektrodenstreifen platziert wurden, wurde vor die Kathode ein in 15 mM DTT getränkter Elektrodenstreifen gelegt und die Gel-Streifen mit Mineralöl bedeckt. Die IEF wurde bei konstant 20°C mit einer Stromstärke von 2 mA und einer Leistung von 5 W pro Streifen durchgeführt und dauerte 17 Stunden und 50 Minuten. (s. Tabelle 5)

Tabelle 5: Protokoll der IEF

Schritt	Spannung	Voltstunden
1	500 V	1 Vh
2	3500 V	3000 Vh
3	3500 V	57000 Vh

Nach Beendigung der IEF wurden die Gel-Streifen in eine Äquilibrationsschale überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren, um ein Diffundieren der pH-fokussierten Proteine zu verhindern.

2.2.3.2. Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

Für die zweite Dimension wurden 12,5 % Polyacrylamid-Gele als Trenngele benötigt. Für den Lösungsansatz wurde entgastes Aqua dest. verwendet. Glaskassetten (Spacerplatte + Deckplatte) mit geringer Eigenfluoreszenz wurden für fluoreszenzmarkierte Proben verwendet; für Extraktkontrollen Standard-Glaskassetten.

Tabelle 6: Puffer und Lösungen für die Herstellung von 12,5 % Polyacrylamid-Trenngelen

Gellösung für 12,5 % Polyacrylamid-Gele (Trenngel):

	Endkonzentration	Ansatz für 6 Gele
Acrylamid (40 %)	12,5 %	158,8 ml
Tris /HCL pH 8,8; 0,4 % SDS	25 %	127,0 ml
Aqua dest.	43,2 %	219,5 ml
APS (10 %)	0,049 %	2,5 ml
TEMED	0,0246 %	125,0 µl

Tris/HCL pH 8,8; 0,4 % SDS (Trenngelpuffer):

	Endkonzentration	1000,0 ml
Tris/ HCL	1,5 M	182,0 g
SDS (20 %)	0,4 %	20,0 ml
Aqua dest.	-	ad 1000,0 ml

Für die zweite Dimension wurden 12,5 % Polyacrylamid-Gele der Größe 21,0 x 25,5 x 0,1 cm (H x B x T) benötigt. Dafür wurde die Gelgießapparatur *Ettan Dalt gel caster* von Amersham Biosciences verwendet, wodurch 6 Gele gleichzeitig hergestellt werden konnten. Nach einer Polymerisationsdauer von circa einer Stunde konnten die fertigen Gele in den Glaskassetten mit Wasser abgewaschen und bis zur weiteren Verwendung für die zweite Dimension im Kühlschrank gelagert werden.

2.2.3.3. Die Zweite Dimension; Trennung nach Molekulargewicht

Die zweite Dimension umfasst die Auftrennung der Proben nach dem Molekulargewicht der enthaltenen Proteine. In Vorbereitung wurden die Gel-Streifen zunächst einer reduzierenden Äquibrierlösung A und anschließend einer alkylierenden Äquibrierlösung B zugeführt. Das in Lösung B enthaltene Bromphenolblau (BPB) macht in der zweiten Dimension die Lauffront sichtbar.

Tabelle 7: Lösungen und Puffer für die Zweite Dimension

Stammlösung:	Endkonzentration	Für 10 Streifen
Urea	6 M	36,0 g
Tris/ HCL pH 8,8	25 %	25,0 ml
Glycerol (87 %)	20 %	23,0 ml
SDS (20 %)	4 %	20,0 ml
Aqua dest.	-	ad 100,0 ml

Äquibrierlösung A:

Stammlösung	-	50,0 ml
DTT	1,0 % (w/v)	500,0 mg

Äquibrierlösung B:

Stammlösung	-	50,0 ml
IAA	2,5 % (w/v)	1250,0 mg
BPB	-	Spatelspitze

Agarose	Endkonzentration	Menge
Agarose	0,5 % (w/v)	0,5 g
Laufpuffer	1 x	100,0 ml

10x Laufpuffer:	Endkonzentration	Menge
Glycin	1,92 M	720,0 g
Tris	0,25 M	150,0 g
SDS (20 %)	1 %	250,0 ml
Aqua dest.	-	ad 5,0 L

Nach Ansetzen einer Stammlösung für die Äquibrierung wurde diese in Aliquots für die Lösungen A und B geteilt. Die nach der IEF eingefrorenen Streifen wurden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur aufgetaut und den Äquibrierungsschritten unterzogen. Zu jedem Streifen wurden 5,0 ml Äquibrierlösung A pipettiert, um die Proteine zu reduzieren um ausgebildete Disulfidbrücken aufzubrechen, dann 15 Minuten auf dem Schüttler inkubiert und die Lösung verworfen. Daran schloss sich derselbe Zyklus mit der alkylierenden Lösung B an, um das Renaturieren, und somit erneute Ausbilden der Disulfidbrücken, zu verhindern. Nach der Äquibrierung konnten die behandelten Streifen auf die Gele aufgelegt und mit Agarose fixiert werden. Die Gelkassetten wurden anschließend in die mit 1 x Laufpuffer befüllte 2D- Kammer *Protean® plus Dodeca Cell* von Bio-Rad eingelegt. Die zweite Dimension lief bei konstant 20°C für eine Stunde bei 0,5 W pro Gel ein, um eine einheitliche Lauffront zu gewährleisten und wurde danach auf 1,5 W pro Gel hochgestellt. Das Programm lief über Nacht und wurde beendet, wenn sich die Bromphenolfront etwa 0,5 cm vor dem Gel-Ende befand. Die Gele, die fluoreszenzmarkierte Pro-

ben enthielten, wurden in den Glaskassetten belassen und mit einem Fluoreszenzscanner, dem Typhoon 9400 (*GE Healthcare*), mit drei unterschiedlichen Wellenlängen entsprechend der verwendeten DIGE- Farbstoffe gescannt. (Wellenlängen siehe Kap. 2.3.5.3; Tab. Scanparameter) Nach der Bilddokumentation wurden die Gele aus den Glaskassetten entfernt und bei Raumtemperatur in Plastikschalen in Fixierlösung inkubiert, um sie anschließend zu färben.

2.2.3.4. Färbungen

Es wurde entweder die sensitivere Silbernitratfärbung zur Extraktkontrolle oder die massenspektrometriekompatible kolloidale Coomassie-Färbung verwendet, um die Proteinspots nach der zweiten Dimension zu visualisieren. Alle Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt; die Lösungen inkubierten auf einem Schüttler.

2.2.3.4.1. Silbernitratfärbung

Die Sensitivität dieser Färbemethode liegt bei 0,3– 10 ng Protein und ist damit 100-mal größer als bei der konventionellen Coomassie-Färbung⁸⁰. Für diese Arbeit wurde eine modifizierte Form der von Blum et al. entwickelten Silbernitratfärbung mit weniger Formaldehyd für bessere Zugänglichkeit der Proteine für weiterführende massenspektrometrische Verfahren verwendet. Für jedes 21,0 x 25,5 cm Gel wurden 300,0 ml Lösung berechnet. Die aufgeführten Lösungen wurden mit Aqua dest. angesetzt. Die einzelnen Schritte sind dem Färbeprotokoll (Tabelle 8) zu entnehmen.

Tabelle 8: Färbeprotokoll Silbernitratfärbung

Arbeitsschritt	Reagenz	Endkonzentration	Dauer
1. Fixierung	Vergällter Ethanol	50 %	30 min
	Essigsäure	12 %	
2. Waschen	Vergällter Ethanol	50 %	2x 20 min
3. Sensitivierung	Na ₂ S ₂ O ₃ * 5H ₂ O	0,02 %	1 min
4. Waschen	Aqua dest.	-	2x 20 sec
5. Färbung	Silbernitrat	0,2 % (w/v)	20 min

	Formaldehyd 37 %	0,0375 %	
6. Waschen	Aqua dest.	-	2x 20 sec
7. Entwicklung	Na ₂ CO ₃	6 %	2-4 min
	Na ₂ S ₂ O ₃ * 5H ₂ O	0,04 %	
	Formaldehyd 37 %	0,025 %	
8. Waschen	Glycin	1 %	20 sec
9. Stoppen	Glycin	1 %	10-30 min
10. Waschen	Aqua dest.	-	30 min

2.2.3.4.2. Kolloidale Coomassie- Färbung

Die kolloidale Coomassie-Färbung wurde nach dem Protokoll von Neuhoff et al. durchgeführt und erreicht eine Sensitivität von ca. 20 ng Protein⁸¹. Für jedes Gel wurden 300,0 ml Lösung benötigt. Die aufgeführten Lösungen wurden mit Aqua dest. angesetzt. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden aufgeführt:

Tabelle 9: Färbeprotokoll Kolloidale Coomassie- Färbung

Arbeitsschritt	Reagenz	Endkonzentration	Dauer
1. Fixierung	Ethanol	40 %	1-2 h
	Essigsäure	10 %	
2. Waschen	Aqua dest.	-	2x 10 min
3. Färbung	Ammoniumsulfat	10 %	1-7 d
	Phosphorsäure 85 %	1,2 %	
	Coomassie brillant Blau G 250	0,1 %	
	Methanol	25 %	
4. Waschen	Methanol	20 %	2x 15 min
	Aqua dest.	-	2x 1 h

Nach der Färbung wurden die Gele in Laminierfolie gelegt und im Durchlicht- Scanmodus bei 16-8 Bit Graustufen und 254 dpi gescannt (*EPSON Perfection V750 Pro*).

2.2.4. 2D-Fluorescence Difference Gel Elektrophoresis

Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proben wurden mit der von Unlü et al. etablierten *2D-Difference gel electrophoresis* (2D-DIGE) untersucht⁸². Diese Methode folgt dem gleichen Auftrennungsprinzip wie die 2D-PAGE, ermöglicht jedoch durch die Markierung der Proben mit unterschiedlichen Farbstoffen (Cy2, Cy3, Cy5) die Vereinigung von zwei Proben und dem internen Standard auf einem Gel. (s. Abb.8)

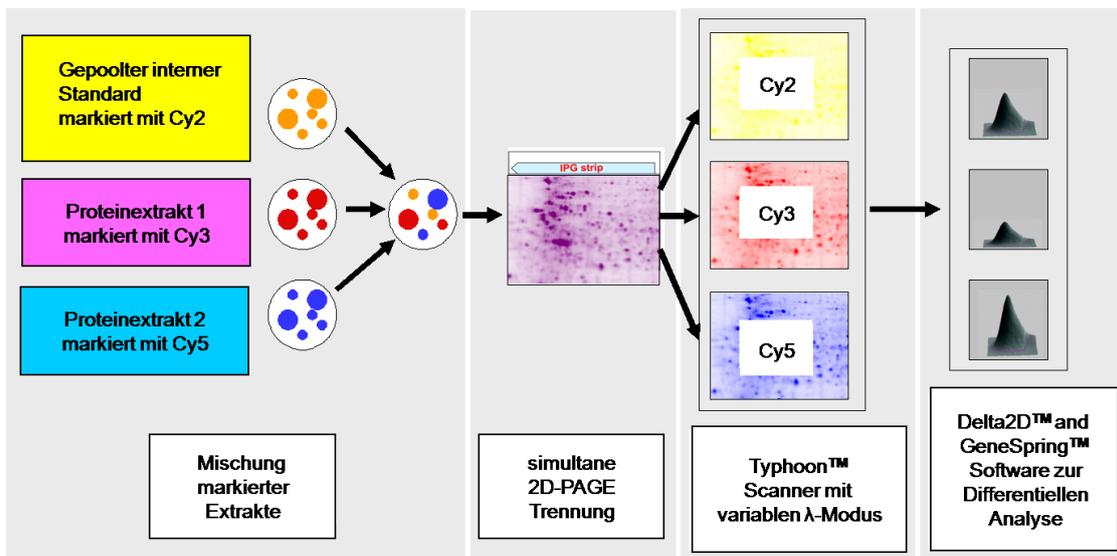


Abbildung 8: Schematische Darstellung des 2D-DIGE Workflows (modifiziert nach Westermeier et al. 2008) Vergleichende quantitative Proteomanalyse mittels 2D-fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE).

2.2.4.1. Vorbereiten der Markierung

Jede Probe wurde mit 50 mM NaOH versetzt, um den pH- Wert auf pH 8,5 einzustellen. Dieser Bereich stellt ein optimales Reaktionsmilieu zur Markierung dar und wurde mittels eines pH-Streifens überprüft. Für die Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen wurden die Proben in jeweils vier 50 µg Aliquots separiert. Um den internen Standard zu erzeugen, wurden 50 µg Aliquots aller in dem Experiment verwendeten Proben zusammengeführt. Das Gesamtvolumen des Standards wurde anschließend durch die Anzahl der Proben dividiert, um wieder ein 50 µg Aliquot zu erhalten. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die bei -20°C gelagerten CyDye-Farbstoffe wurden zunächst 5 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit

Dimethylformamid (DMF) rekonstituiert. Zu jedem 5 nmol CyDye wurden 5 µl DMF gegeben, sodass sich eine 1 mM (1000 pmol/µl) Stammlösung ergab. Diese Stammlösung wurde sofort für 30 Sekunden gevortext und für weitere 30 Sekunden bei 12'000 g zentrifugiert. Durch Verdünnung mit der 1,5-fachen Menge DMF wurde aus der Stammlösung eine Gebrauchslösung zur Markierung der Proben angesetzt, die eine Endkonzentration von 400 pmol Farbstoff/µl aufwies.

2.2.4.2. Markieren der Proben

Für diese Arbeit wurde für die Fluoreszenzmarkierung der Proben die Methode des *minimal labeling* verwendet.

Tabelle 10: Lösungen für das minimal labeling; CyDye DIGE Fluoreszenz-Farbstoffe und Lysin

Gebrauchslösung	Endkonzentration	Menge pro Gel
CyDye DIGE fluor Cy2 minimal dye	400,0 pmol	1,0 µl
CyDye DIGE fluor Cy3 minimal dye	400,0 pmol	1,0 µl
CyDye DIGE fluor Cy5 minimal dye	400,0 pmol	1,0 µl
Lysin	Endkonzentration	Menge
L-Lysin	10 mM	18,0 mg
Aqua dest.	-	ad 10,0 ml

Für die Markierung mit *CyDye DIGE fluor Cy3 minimal dye* und *CyDye DIGE fluor Cy5 minimal dye* wurden jeweils Aliquots von 50 µg Protein und 1,0 µl der jeweiligen Gebrauchslösung in einem neuen Reaktionsgefäß zusammen pipettiert. Dabei wurde der rote Cy3-Farbstoff für die Kontrollen und der blaue Cy5-Farbstoff für die Roxithromycinproben benutzt. Für die Erstellung des internen Standards wurde 2000 µg Protein (für 40 Gele) in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit der entsprechenden Menge *CyDye DIGE fluor Cy2 minimal dye* versetzt. Nach dem Zentrifugieren inkubierten die Ansätze für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln. Um die Reaktion abzustoppen, wurde 1,0 µl Lysin zu jedem Ansatz pipettiert, nochmals zentrifugiert und für weitere 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die

markierten Proben wurden entweder bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren oder sofort für die Rehydratisierung der *Immobiline DryStrips* verwendet.

Da von jeder Probe 4 Replikate angefertigt wurden, beziehen sich alle weiteren Berechnungen auf eben diese Mengen und für Streifen von 24 cm Länge. Sowohl die Rehydratisierung als auch die Auftrennung nach dem pH-Wert und dem Molekulargewicht erfolgt aufgrund der fluoreszenzmarkierten Farbstoffe im Dunkeln.

Tabelle 11a: DIGE-Experiment Pipettierschema für den Markierungsansatz: Zusammensetzung von Probe, Fluoreszenzfarbstoff und Lysin (Co = Kontrolle; Rx = Roxithromycin; - = ohne Wunde; + = mit Wunde).

Probe	c nach pH-Einstellung (µg/µl)	Protein für 200µg in µl	CyDye- Farbstoff in µl	Lysin in µl	Endvolumen in µl
Co - 0h	0,81	247,0	4,0	4,0	255,0
Co - 24h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Co - 48h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Co - 72h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Co - 96h	0,81	247,0	4,0	4,0	255,0
Rx - 0h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Rx - 24h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Rx - 48h	0,82	244,0	4,0	4,0	252,0
Rx - 72h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Rx - 96h	0,81	247,0	4,0	4,0	255,0
Co + 0h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Co + 24h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Co + 48h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Co + 72h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Co + 96h	0,81	247,0	4,0	4,0	255,0
Rx + 0h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Rx + 24h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Rx + 48h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Rx + 72h	0,83	241,0	4,0	4,0	249,0
Rx + 96h	0,81	247,0	4,0	4,0	255,0
Cy2-Standard	0,83	10 x 242,8	40,0	40,0	2508,0

Tabelle 11b: DIGE-xperiment Pipettierschema für den Rehydratisierungsansatz: Fluoreszenzfarbstoffmarkierte Proben und Zusätze.

Gel 01-04	Co - 0h	Rx - 0h	Standard in μl	10x RH in μl	1xUT in μl	Endvolumen in ml
	255,0 μ l	249,0 μ l	250,6	200,0	1045,4	2,0
Gel 05-08	Co - 24h	Rx - 24h				
	249,0 μ l	249,0 μ l	250,6	200,0	1051,4	2,0
Gel 09-12	Co - 48h	Rx - 48h				
	249,0 μ l	252,0 μ l	250,6	200,0	1048,4	2,0
Gel 13- 16	Co - 72h	Rx - 72h				
	249,0 μ l	249,0 μ l	250,6	200,0	1051,4	2,0
Gel 17- 20	Co - 96h	Rx - 96h				
	255,0 μ l	255,0 μ l	250,6	200,0	1039,4	2,0
Gel 21- 24	Co + 0h	Rx + 0h				
	249,0 μ l	249,0 μ l	250,6	200,0	1051,4	2,0
Gel 25- 28	Co + 24h	Rx + 24h				
	249,0 μ l	249,0 μ l	250,6	200,0	1051,4	2,0
Gel 29-32	Co + 48h	Rx + 48h				
	249,0 μ l	249,0 μ l	250,6	200,0	1051,4	2,0
Gel 33- 36	Co + 72h	Rx + 72h				
	249,0 μ l	249,0 μ l	250,6	200,0	1051,4	2,0
Gel 37- 40	Co + 96h	Rx + 96h				
	255,0 μ l	255,0 μ l	250,6	200,0	1039,4	2,0

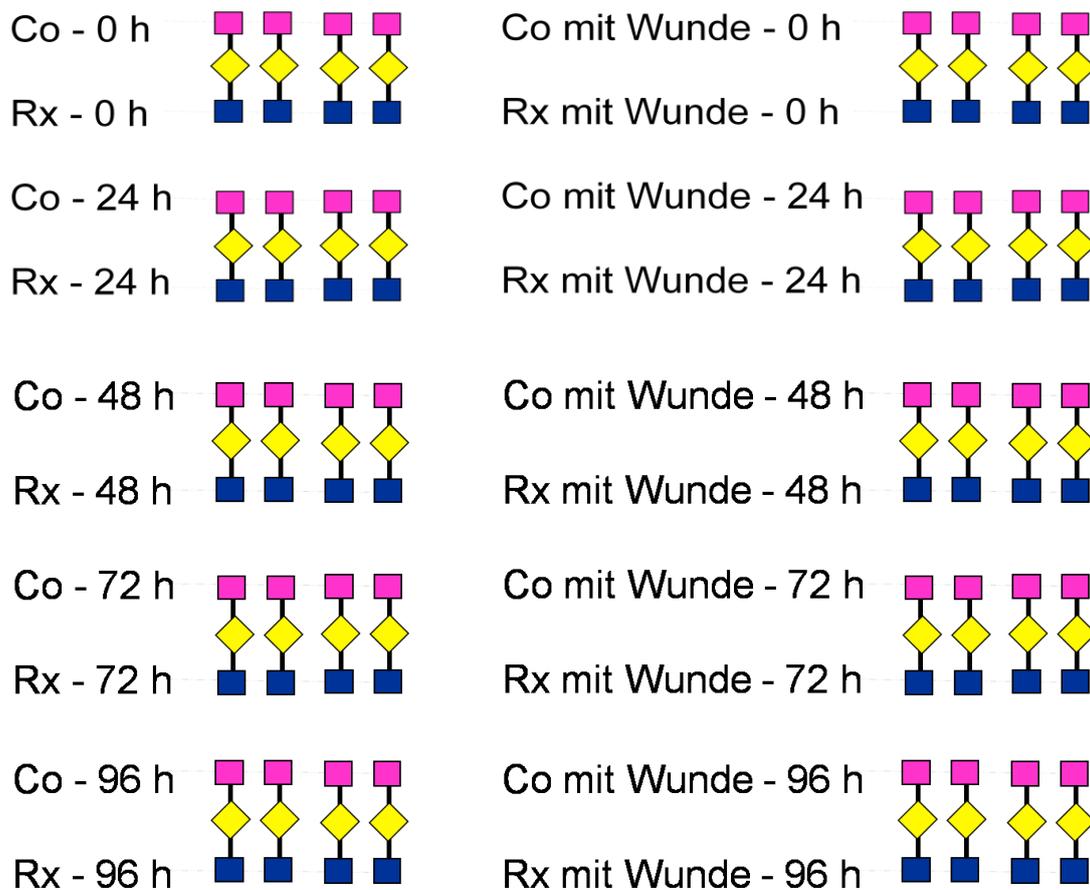


Abbildung 9: 2D-DIGE, Experimentdesign. Proteinmuster von nicht-behandelten (Co) und Roxithromycin-behandelten (Rx) S9-Epithelzellen wurden mittels DIGE Technologie (GE Healthcare) verglichen. Cy3 (rot)- und Cy5 (blau)-markierte Proteinextrakte wurden in 4 technischen Replikaten aufgetrennt, um eine statistische Auswertung mittels Delta2D Software zu gewährleisten. Alle Proben wurden mit dem gleichen Cy2 (gelb)- markierten internen Standard gemischt und aufgetrennt. Eine Normalisierung auf diesen Farbkanal ermöglichte die Vergleichbarkeit aller analysierten Proben.

2.2.4.3. Scannen der Gele

Nach Beendigung der zweiten Dimension werde die DIGE-Gele in ihren Glaskassetten belassen und mit dem *Typhoon 9400* Scanner in den drei Wellenlängen nach folgenden Parametern gescannt.

Tabelle 12: Scanparameter

Fluoreszenzfarbstoff	Laser	Wellenlänge	Emission filter (nm)
Cy2 minimal dye	Blue	488 nm	520 BP 40
Cy3 minimal dye	Green	532 nm	580 BP 30
Cy5 minimal dye	Red	633 nm	670 BP 30

2.3. Software-gestützte Auswertung der Gele

Um Unterschiede im Proteinmuster zwischen den mit Roxithromycin behandelten und den unbehandelten Proben zu detektieren, wurden die Gele nach dem Einscannen mit der Software *Delta2D* (Decodon GmbH, Greifswald) ausgewertet. Für die statistischen Analysen kam zusätzlich die Software *Genespring* (Agilent Technologies, USA) zur Anwendung.

Für jedes zusammengehörige Geltripllett wurde der interne Standard als „Matching“-Referenz genutzt, um einander entsprechende Proteinspots auf den einzelnen Gelen übereinander zu legen. Das „Matching“ wurde für alle Gele durchgeführt. Aus allen, in die Analyse eingegangenen Gelbildern wurde im Folgenden ein Fusionsbild erzeugt. Jeder einzelne sich auf dem Fusionsbild befindliche Proteinspot wurde anschließend mittels Spotdetektion erfasst. Um ein einheitliches Spotumrissmuster mit allen Spots des Projektes zu erhalten, wurden mittels Spottransfer die Spotumrisse des Fusionsbildes auf alle anderen Gelbilder übertragen und innerhalb der transferierten Spotgrenzen automatisch quantifiziert. Die detektierten Spotvolumina entsprechend der Graustufenverteilung pro Spotfläche wurden für die statistische Analyse verwendet und einem Normalisierungsschritt unterzogen. Dieser beinhaltet die Division der einzelnen Spotvolumina in Graustufen pro Spotfläche durch das entsprechende Spotvolumen in Graustufen pro Spotfläche

des internen Standards. Dies gewährleistet die Vergleichbarkeit aller Gele. Im nächsten Schritt wurde der Volumenanteil pro Spot auf einem Gel durch alle detektierten Graustufen dieses Gels dividiert und in % Volumen angegeben, was einem weiteren Normalisierungsschritt für jedes einzelne Gelset entspricht. In einer Quantifizierungstabelle wurden diese Spot-Expressionsprofile aller Gelbilder des Projektes dargestellt. Da insgesamt vier technische Replikate für jede experimentell erhobene Bedingung zur Verfügung standen, wurden im folgenden Mittelwerte aus den ermittelten % Volumina gebildet und Ratios durch Division interessierender Bedingungen erzeugt (z. Bsp.: Mittelwert der % Volumina für Roxithromycin mit Wunde bei 24 h dividiert durch Mittelwert der % Volumina für Kontrolle mit Wunde bei 24 h). Mittels Ein-Wege-Anova (*Genespring*) wurden die p-Werte für die Mittelwerte der technischen Replikate ermittelt. Dabei wurden jene als statistisch signifikant verändert bewertet, für die $p < 0,05$ zutraf. Eine Regulation um mindestens den Faktor 1,2, 1,5 oder 2,0 war Berechnungsgrundlage. Gruppenunterschiede (Ratios) wurden zwischen (i) Kontrolle mit und ohne Wunde, (ii) Roxithromycin mit und ohne Wunde, (iii) Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde sowie (iv) Roxithromycin und Kontrolle ohne Wunde für die Erntezeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h ermittelt. In Delta2D wurde der Students T-Test mit gleichen Parametern durchgeführt, um falsch-positive (irrtümlicherweise als signifikant differentiell exprimiert gefundene) Spots heraus zu filtern.

2.4. Herstellung präparativer Gele für die 2D Gelelektrophorese und Probenpräparation mittels In-Gel Trypsin Verdau

Für die Herstellung präparativer Gele wurde ein Pool aus allen Proben (je 225 µg behandelte und unbehandelte Probe) gebildet und mit Rehydratisierungspuffer versetzt, sodass pro Gel 450 µg Protein zur Verfügung standen. Die sich anschließende 2-D Gelelektrophorese wurde wie oben beschrieben durchgeführt und die Gele mittels Coomassie brilliant blue gefärbt. Die Gele wurden eingescannt und mittels Delta 2D Software analysiert. Interessante Proteinspots (foldchange > 1,5 oder visuell) wurden im Anschluss manuell mittels Spot picker (Durchmesser 2 mm) aus dem Gel entfernt und in eine 96-Well-Microtiterplatte überführt. Die Wells wurden vorher mit jeweils 100 µl A.dest. beschickt.

Zum Entfärben des Gelstückchens wurden 200 µl einer frischen Ammoniumbicarbonat (200 mM) – Lösung zugegeben und für 30 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Zur Dehydratisierung erfolgte die Zugabe von 100 µl Acetonitril (ACN) auf das Gelstückchen und eine 15-minütige Inkubation; dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Anschließend wurden 18 µl Trypsin-Lösung (Trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 20 mM Ammoniumbicarbonat) auf das Gel gegeben, bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert und die überschüssige Lösung abgenommen. Über Nacht wurden die Reaktionsgefäße nochmals bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion der Peptide wurde die Extraktionslösung 1 zugegeben, im Ultraschallbad bei 30°C für 30 min die Peptide extrahiert und nach anschließender zweiminütiger Zentrifugation bei 8000 g der Überstand in Microvials überführt.

Hiernach wurde eine zweite Extraktion durchgeführt. Nach 2 min Zentrifugation bei 8000 g wurde der Überstand abgenommen und zum ersten Extrakt hinzugegeben. Die nun vorliegende Lösung wurde entweder sofort der Massenspektrometrie zugeführt oder bei -80°C eingefroren. Zur Vorbereitung der Massenspektrometrie wurden 1 µl Peptidextrakt mit 1 µl CHCA- Matrix gemischt (50 % v/v ACN/ 0.5 % w/v TFA gesättigt mit a-cyano-4-hydroxyzimt Säure (CHCA) und auf einem Messtarget auskristallisiert.

Tabelle 13: Protokoll für den tryptischen Verdau von Coomassie- Spots

	Reagenz	Endkonzentration
Entfärbelösung	NH ₄ CO ₃	200 mM
Dehydratisierungslösung	ACN	100 %
Trypsin- Lösung	Trypsin	10 ng/µl
	NH ₄ CO ₃	20 mM
Extraktionslösung 1	Essigsäure (5 %)	0,1 %
	Aqua dest.	Ad
Extraktionslösung 2	ACN	50 %
	Essigsäure (5 %)	0,05 %
	Aqua dest.	ad

2.5. Prinzip der Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) und der Liquidchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Veränderte oder regulierte Proteine aus einem Polyacrylamidgel wurden mit Hilfe der Matrix unterstützten Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) identifiziert. Dieses Verfahren bedient sich eines Vakuums, in dem durch Laserbeschuss Proteine aus einer Trägermasse gelöst und durch ein elektrisches Feld auf eine Detektorfläche geleitet werden. Die Trägermatrix ist zumeist eine organische Säure mit großem Absorptionsvermögen für das auftreffende Laserlicht. Dies führt zum Verdampfen der Probe und zur Dissoziation der Säure, wobei positive Ladungen auf die Peptidfragmente der Probe übertragen werden. Diese Fragmente werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und treffen nach Durchfliegen einer feldfreien Driftstrecke auf die Detektorfläche. Da leichte Probenfragmente die Driftstrecke schneller passieren als schwere, erfolgt eine Trennung nach der Masse. Aufgrund der unterschiedlichen Flugzeiten lassen sich die jeweiligen Molekularmassen der tryptisch erzeugten Peptidfragmente bestimmen und durch Abgleich mit einer Datenbank (MASCOT) dem jeweiligen Protein zuordnen (peptide mass fingerprint).

Die MALDI-TOF-MS Messungen für diese Arbeit wurden mit einem Proteome Analyzer 4800 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Genutzt wurde der Reflectormodus; aufgenommen wurden Massenspektren von 900 bis 3700 Da bei einem Massenfokus von 2000 Da. 25 Subspektren mit je 100 Laserbeschüssen bei zufälliger Treffpunktauswahl wurden zusammengefasst um ein Hauptspektrum zu erzeugen. Es erfolgte eine automatische interne Zwei-Punkt Kalibrierung wenn die autolytischen Trypsinfragmente für Monoisotope ($(M+H)^{1+}$ bei Masse pro Ladung m/z bei 1045.564 und 2211.104) ein Signal zu Rauschen Verhältnis (S/N) von mindestens 10 erreichten. Zusätzlich wurden nach Abzug aller Signale, die auf chemisches Hintergrundrauschen, Keratin oder Trypsin zurückzuführen waren, die fünf größten Peaks mit MS/MS gemessen. Hier wurden für ein Hauptspektrum 20 Subspektren mit je 125 Schüssen und zufälliger Treffpunktauswahl gewählt. Eine automatische interne Ein-Punkt-Kalibrierung wurde als ausreichend angesehen, wenn die monoisotopische Aminosäure Arginin $(M+H)^{1+}$ bei einem

Masse /Ladungsverhältnis (m/z) von 175,119 bzw. Lysin ($M+H$)¹⁺ bei einem m/z von 147,107 ein S/N von mindestens 5 erreichten.

Mit Hilfe der GPS-Explorer Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurden Peak-Listen automatisch nach folgenden Parametern erstellt: Massenbereich von 900 bis 3700 Da, Peak-Dichte von 50 Peaks pro 200 Da, Maximum 200 Peaks pro Protein Spot, Minimum S/N ratio von 6.

Die Toleranz bei der Peptidsuche betrug 50 ppm, wobei der tatsächliche RMS-Wert (RMS mass error = Root Mean Square mass error) zwischen 5 und 15 je Suchergebnis lag.

Die resultierenden Listen wurden mittels MASCOT (Version 2.1) mit der UniProt SwissProt database (Rel. 51.5 beschränkt auf menschliche Taxonomie) verglichen. Positive Identifikationen unterlagen dabei folgenden Parametern: Sequenzabdeckung von mindestens 30 % sowie Erreichen eines Mowse-Score von mindestens 49. Der Mowse-Score entspricht dem negativen dekadischen Logarithmus der Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Massenauswahl; diese wurde nicht größer als $p \leq 0,05$ gewählt und dient dem Ausschluss einer falschpositiven Identifizierung auf 95%igem Vertrauensniveau.

Proteine und Peptide, die mit diesem Verfahren nicht identifiziert werden konnten, wurden mittels LC-MS reanalysiert. Die zugrundeliegende Datenbank war Uniprot Swissprot (human_uniprot_sprot_2014_02_fwd_rev) und die Suche wurde über Sequest (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA; version 1.0) durchgeführt. Die Massentoleranz betrug 1.00 Da. Oxidation von Methionin und Carbamidomethylierung von Cystein wurden als Modifikationen akzeptiert. Die Proteinidentifikationen der MS- Analyse wurden in Scaffold (version 4.4.1.1, Proteome Software Inc., Portland, OR, USA) validiert. Die Peptid-Identifikationen wurden mit folgenden Datenbank-Einstellungen gefiltert: ein DeltaCn Score größer 0.10 sowie ein XCorr Score größer 1.8, 2.5, 3.5 and 3.5 für einfach, zweifach, dreifach und vierfach geladene Peptide. Proteinidentifikationen wurden akzeptiert, wenn diese mit mindestens 95.0 % Wahrscheinlichkeit etabliert werden konnten und mindestens aus zwei identifizierten Peptiden bestanden. Proteine, welche identische Peptide enthielten und basierend auf der MS-Analyse nicht weiter differenziert werden konnten, wurden in Gruppen zusammengefasst.

2.6. Western Blots

Zur Validierung der Ergebnisse der DIGE-Experimente und LC-MS Analysen wurden Western Blots mit den Molekülen Spermidin-Synthase (SRM) und *Eukaryotic translation initiation factor 5A-1* (EIF5A) mit GAPDH als Kontrolle durchgeführt.

Dazu wurden 10 µg Protein jeder Probe (Roxithromycin mit und ohne Wunde sowie Kontrolle mit und ohne Wunde für die Zeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) auf ein 12.5 % Acrylamid-Gel mit je 10 Slots aufgetragen und nach dem Molekulgewicht aufgetrennt; als Marker wurde der Precision Plus Protein Dual Color Standard von BIORAD (# 161-0374) verwendet. Im Anschluss erfolgte der elektrophoretische Proteintransfer auf eine Immobilon-P polyvinyliden fluorid (PVDF) Membran (Millipore) für 2 Stunden mittels Milliblot Graphic Electrobloetter II (Millipore, Billerica, MA, USA). Bevor die Membran mit den entsprechenden Antikörpern beladen werden konnte, wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für 90 Minuten bei Raumtemperatur in TBS-TPuffer (137 mM Tris-HCl, 2,68 mM NaCl und 0,1 % Tween 20) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver blockiert. Dieser Puffer wurde danach durch 15-minütiges Waschen mit TBS-T Puffer entfernt. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper erfolgte im Anschluss daran über Nacht bei 4 °C; in Abhängigkeit vom Antikörper wurde dieser vorher zwischen 1:1000 bis 1:5000 in TBS-T Puffer mit Magermilchpulver verdünnt. (s. Tab. 14)

Nach der Inkubation wurde die Membran 3-6 mal mit TBS-T Puffer gewaschen und anschließend mit dem sekundären, Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Antikörper (Life Technologies) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert; dieser wurde auf 1:2500 in TBS-T Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver verdünnt. Auf einen weiteren Waschschritt mit TBS-T Puffer folgte die Inkubation mit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat (Pierce; Thermo Fisher) für 5 min. Die Signale wurden mit einem Fusion-SL-3500.WL-Gerät (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany) gemessen. Die Bandintensität wurden mittels ImageQuant Software Version 5.0 (GE Healthcare) detektiert. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde bei $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Tabelle 14: Auflistung verwendeter Antikörper beim Western Blot

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Verdünt in
Anti-Spermidine Synthase, 34 kDa	abcam 111884	1:5000	
GAPDH, 37 kDa	Cell Signaling# 2118	1:5000	Magermilch
EIF-5a, 17 kDa	Epitomics S2096	1:1000	
goat anti-rabbit HRP	Life Technologies	1:2500	

2.7. Statistische Auswertung der Wundflächen

Zur statistischen Auswertung wurde Microsoft Office Excel genutzt. Es wurden der Median, der Mittelwert und die Standardabweichung aus je fünf Wundmessungen pro Zeitpunkt und Replikat einer jeden Konzentration berechnet. Die Konzentrationsfindungsversuche wurden zweimal durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse nachzuweisen.

Der Mann-Whitney-U-Test wurde benutzt, um das Zellwachstum unter Einfluss von Roxithromycin in den jeweiligen Konzentrationen gegen die medikamentös unbeeinflusste Kontrolle zu testen. Hierbei handelt es sich um einen statistischen Test zur Überprüfung einer signifikanten Übereinstimmung zweier unabhängigen Verteilungen (Zellwachstum unter Einfluss der Testsubstanz versus ohne Einfluss der Testsubstanz). Ein p-Wert $\leq 0,05$ bzw. $\leq 0,01$ galt als signifikant. Bei multiplen Paarvergleichen wurde die Alphafehler-Kumulierung mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur neutralisiert.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu evaluieren, ob ein Einfluss von Roxithromycin auf das Wachstumsverhalten und das Proteom von respiratorischen Epithelzellen nachweisbar ist.

Hierfür wurde zunächst anhand eines standardisierten in-vitro Wundmodells das Zellwachstum von S9-Epithelzellen mikroskopisch untersucht. Es wurden initial fünf verschiedene Medikamentenkonzentrationen gegen eine Kontrolle (ohne Testsubstanz) getestet, um die optimale Konzentration zu ermitteln.

Es wurden zwei Bioreplikate mit jeweils fünf photographisch dokumentierten Wunden je Konzentration angefertigt. Anschließend wurde ein DIGE-Experiment mit vier technischen Replikaten und der gewählten Roxithromycin-Konzentration 10 µg/ml durchgeführt. Die Proteomanalyse erfolgte mittels Delta2D- und IPA-Software. Validiert und spezifiziert wurde die gewonnenen Erkenntnisse durch Ergänzung von Western-Blots und LC-MS-Analysen. Zum Ausschluß einer Observervarianz folgte zudem ein Experiment mit zwei parallelen Sets roxithromycinbehandelter – und Kontrollwunden sowie verblindete Auswertung der Wundfläche.

3.1. Alamar-Blue Vitalitätstest nach Inkubation mit Roxithromycin

Resazurin (Synonym AlamarBlue) wird in metabolisch aktiven Zellen zu dem rot fluoreszierenden Resorufin reduziert. Dies ermöglicht eine quantitative Erfassung der Vitalität von Zellen. Nach entsprechender Inkubation mit Alamar Blue wird die Reduktion durch Messung der Absorption im Spectrophotometer bei 570 nm und 600 nm Wellenlänge bestimmt (s. Abb. 10).

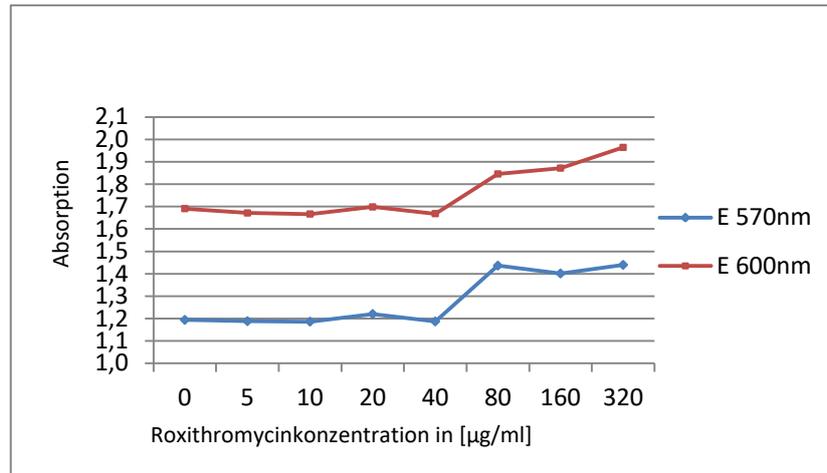


Abbildung 10: Messung der Absorption bei 570 nm und 600 nm nach 4- stündiger Inkubation mit Roxithromycin in verschiedenen Konzentrationen.

Es zeigt sich keine Beeinflussung der Zellvitalität bei den Roxithromycinkonzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml und 40 µg/ml, sowie in der Kontrollgruppe ohne Roxithromycinbehandlung.

Bei einer Roxithromycinkonzentration von 80 µg/ml zeigt sich sowohl mikroskopisch als auch in der Fluoreszenzmessung eine eindeutige Zellschädigung, zum Teil finden sich aber auch noch vitale, teilungsfähige Zellen.

Die Konzentrationen 160 µg/ml und 320 µg/ml Roxithromycin führten mikroskopisch zur Zell-Lyse. Teilungsfähige, vitale Zellen wurden nicht mehr detektiert, die Absorptionsmessung wurde durch das Lyse-bedingte Ausschwemmen intrazellulärer Reduktionsäquivalente interpretiert.

Der Alamar-Blue Vitalitätstest liefert somit Hinweise auf zytotoxische Wirkkonzentrationen von Roxithromycin ab einer Konzentration von 80 µg/ml. Für eine Beeinflussung der Vitalität der S9-Zellen ergab sich bei den untersuchten Konzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml und 40 µg/ml kein Anhalt.

3.2. Auswertung der Zellkultur

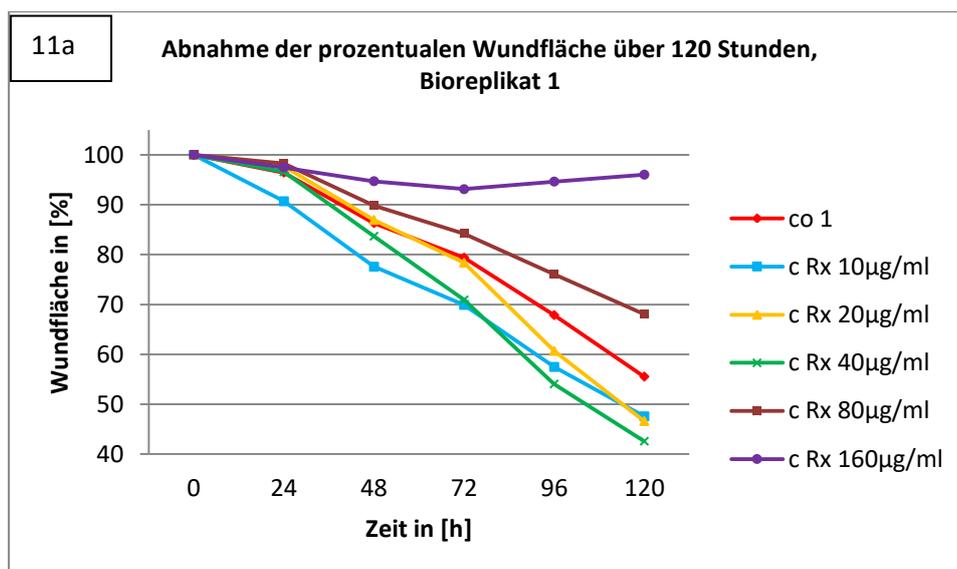
Roxithromycin wurde in den Konzentrationen 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml und 160 µg/ml getestet. In klinischen Untersuchungen wurde nach Gabe von 300 mg Roxithromycin im Abstand von 24 Stunden eine maximale Plasmakonzentration $10,9 \pm 1,4$ µg/ml ermittelt. Im steady-state liegen die maximalen Plasmakonzentrationen

des Wirkstoffes bei $9,3 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$ (nach 96 Stunden Therapie)²⁰. Höhere Roxithromycin-Konzentrationen wurden im Rahmen dieser Arbeit ergänzend getestet, da bei topischer Anwendung in vivo höhere Konzentrationen erreicht werden können.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe beschleunigt Roxithromycin im ersten Bioreplikat in Konzentrationen von $10 \mu\text{g/ml}$, $20 \mu\text{g/ml}$ und $40 \mu\text{g/ml}$ die Wundheilung, während Konzentrationen von $80 \mu\text{g/ml}$ und $160 \mu\text{g/ml}$ zu einer signifikanten ($p \leq 0.01$ bzw. $p \leq 0.05$) Hemmung der Wundheilung führen (siehe Abb. 11). Die Effekte waren jeweils über die ganze Beobachtungsdauer und im Ausmaß zunehmend nachweisbar. Roxithromycin in einer Konzentration von $160 \mu\text{g/ml}$ konnte die Zellproliferation 96 und 120 h nach Wundsetzung so stark hemmen, dass die residuale Wundfläche sogar anstieg.

Bei der Auswertung des zweiten Bioreplikates zeigten sich analoge Effekte für die Konzentration $80 \mu\text{g/ml}$ und $160 \mu\text{g/ml}$, auch hier wurde eine signifikante Hemmung der Proliferation von S9-Zellen registriert ($p \leq 0.01$ bzw. $p \leq 0.05$). Erste Hinweise für einen konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekt von Roxithromycin ergaben sich bereits bei der Auswertung des Alamar Blue Assay (s. Kap. 3.1.).

Allerdings ließ sich im Bioreplikat 2 nur für die Roxithromycin-Konzentration $20 \mu\text{g/ml}$ ein proliferationsfördernder Effekt auf die Wundheilung feststellen. Roxithromycin in einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ zeigt ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die Kontrolle. Die Konzentration $40 \mu\text{g/ml}$ wächst nicht signifikant langsamer als die Kontrolle.



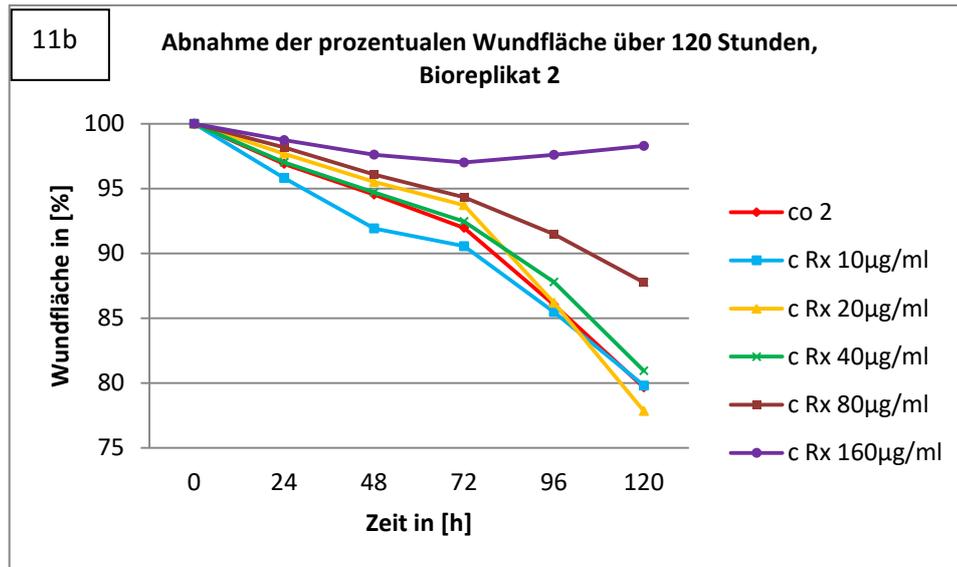


Abbildung 11a und 11b: Wachstum von S9-Zellen in unbehandelter Kontrollgruppe (co 1 und co 2) und mit Roxithromycin behandelt in zirkulärer Wunde über 120 Stunden. Effekt verschiedener Roxithromycin-Konzentration (10 - 160 µg/ml) auf die Wundheilung von Epithelzellen. Abnahme der prozentualen Wundfläche nach postoperativem Zeitpunkt (0 – 120 h) in Bioreplik 1 (Abbildung 11a) und 2 (Abbildung 11b).

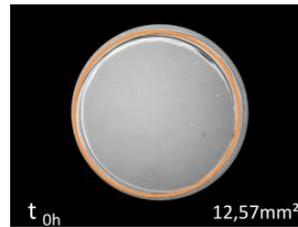
Die statistische Auswertung wurde mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Der p-Wert wurde $p \leq 0.01$ bzw. $p \leq 0.05$ definiert. Eine signifikante Hemmung des Wundverschlusses wurde in beiden Bioreplikaten für die Roxithromycinkonzentrationen 80 µg/ml und 160 µg/ml registriert. Im ersten Bioreplikate ergab sich zudem eine signifikant schnellere Wundheilung für die Konzentration 40 µg/ml.

Im Anhang finden sich der Vollständigkeit halber Diagramme zur Abnahme der Wundfläche inklusive eingetragener Standardabweichung und Signifikanzniveaus für jede getestete Roxithromycinkonzentration in beiden Replikaten sowie die Auswertung des Mann-Whitney U- Testes für beide Bioreplikate.

Eine exemplarische Fotodokumentation von unbehandelter und mit Roxithromycin behandelter Wunde (Konzentration 20 µg/ml) über 120 Stunden mit Markierung der Wundfläche zeigt folgende Abbildung 12:



Kontrolle (A)



Roxithromycin (B)

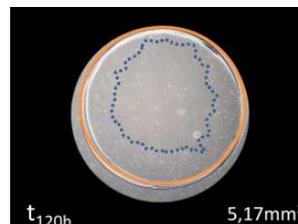
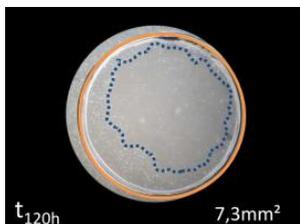
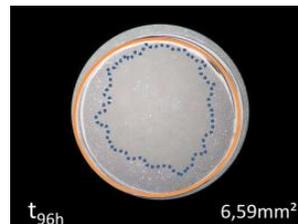
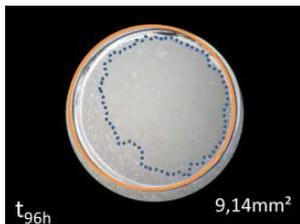
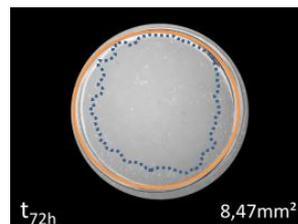
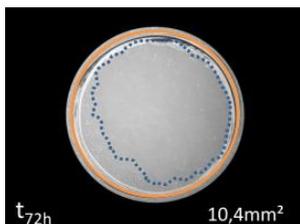
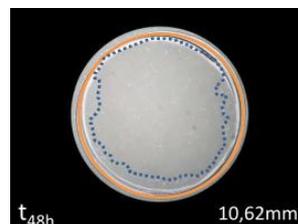
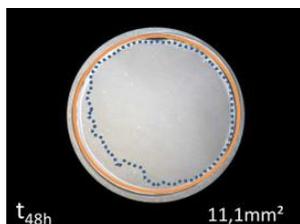
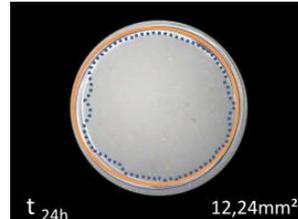
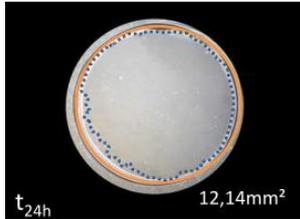


Abbildung 12: Photographische Dokumentation der Entwicklung der residualen Wundfläche einer medikamentös nicht behandelten (A) und einer roxithromycinbehandelten (B) Wunde ($C_{\text{Roxithromycin}} = 20 \mu\text{g/ml}$) über 120 h im 24-Stunden Intervall. Wundverschluß in der roxithromycinbehandelten Wunde von $12,57 \text{ mm}^2$ auf $5,17 \text{ mm}^2$ nach 120 h. In der Kontrollgruppe beträgt die residuale Wundfläche nach 120 h $7,3 \text{ mm}^2$. Mediumwechsel nach 60 h.

Im untersuchten in- vitro Wundmodell erschien die getestete Roxithromycin Konzentration von 10 µg/ml effektiv. Im Vergleich zur Kontrollgruppe registrierten wir tendenziell eine beschleunigte Proliferation und Wundheilung über 120 Stunden ohne sichtbare zytotoxische Effekte. Zudem stimmt diese Konzentration sehr gut mit der in vivo bestimmten maximalen Plasmakonzentration bei systemischer Anwendung überein. Daher wurden S9-Zellen, die einer Roxithromycinkonzentration von 10 µg/ml ausgesetzt waren, vergleichend zu medikamentös nicht behandelten S9-Zellen mittels Proteomanalyse weiterführend untersucht.

3.3. Qualitative Auswertung von 2D-Gelen mittels Silberfärbung

S9-Zellen wurden einer standardisierten Wundsetzung unterzogen und mit einer Roxithromycinkonzentration von 10 µg/ml behandelt oder medikamentös nicht behandelt. Weitere S9-Zellen wurden lediglich einer Roxithromycinkonzentration von 10 µg/ml ausgesetzt oder blieben gänzlich unbehandelt. Die Erntezeitpunkte lagen entweder direkt nach Behandlungsende (T= 0 h) oder 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden bzw. 96 Stunden nach Behandlungsende. Um die Qualität der Extrakte zu kontrollieren, wurde vor Durchführung des DIGE-Experimentes eine 2D-PAGE mit anschließender Silbernitratfärbung durchgeführt (siehe Abb. 13). Die gewonnenen Proben wurden anschließend mittels 2D-DIGE analysiert.

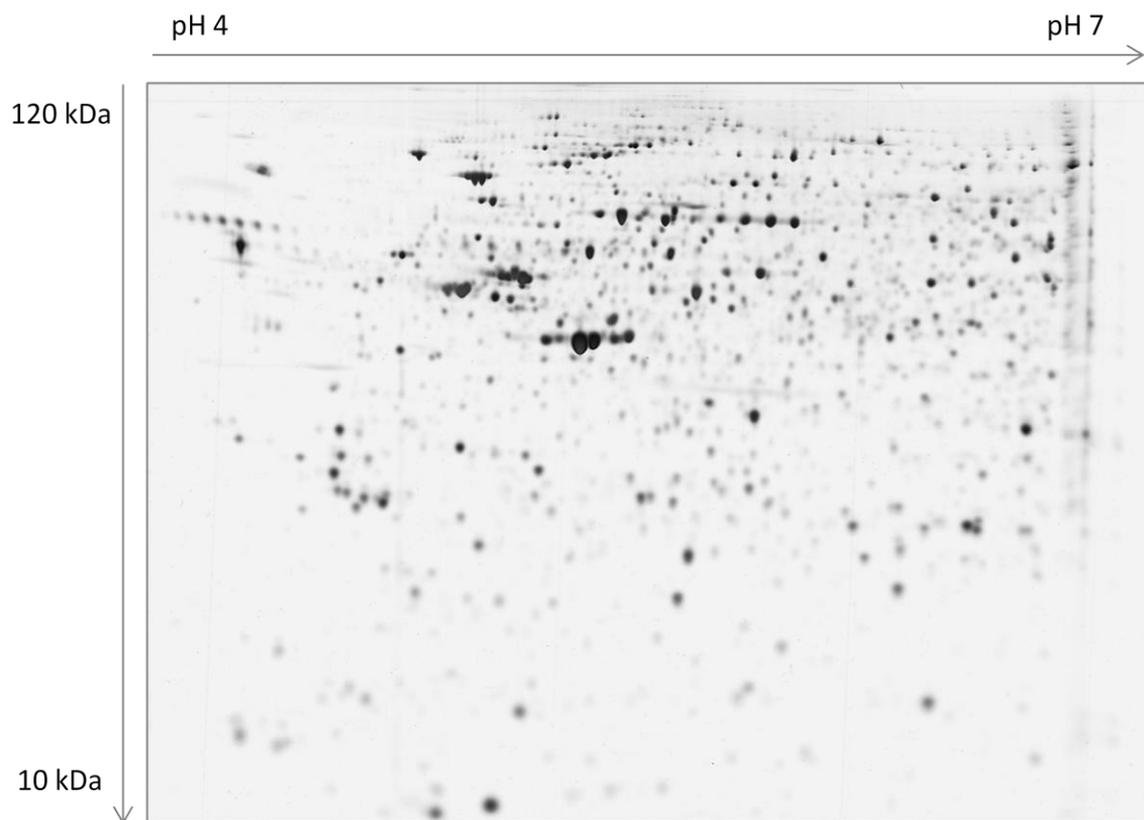
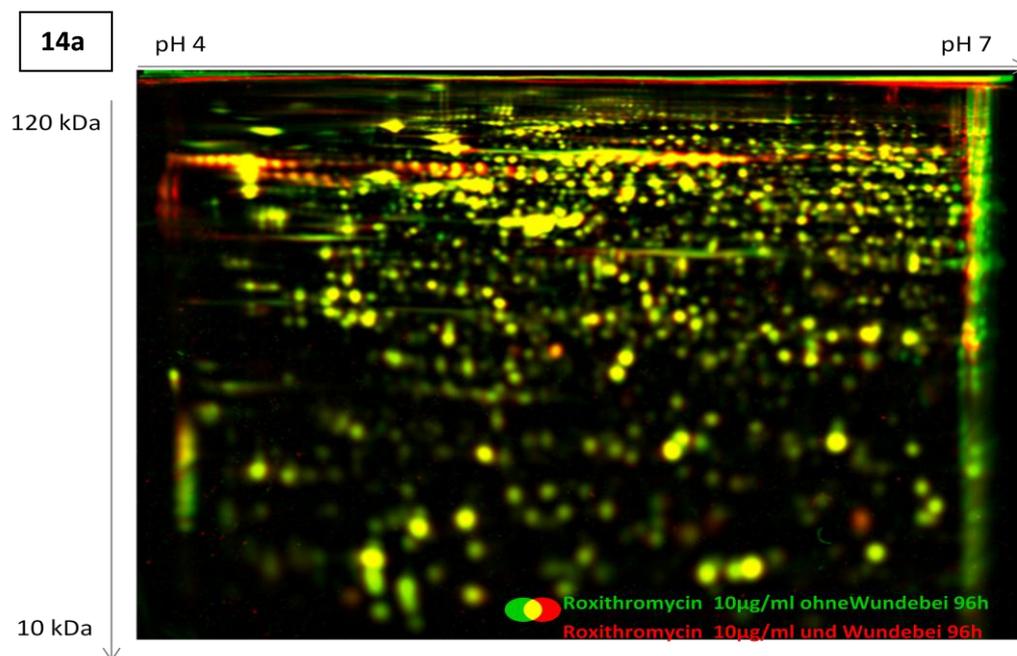


Abbildung 13: Silbernitratfärbung zur Extraktkontrolle (50 µg Protein pro Gel), unbehandelte Wunde mit dem Erntezeitpunkt 24h. Gute Auftrennung der Proteinspots zwischen den pH- Werten 4 und 7 und nach dem Molekulargewicht, die Graustufen zeigen die Spotintensitäten an.

3.4. Qualitative Analyse von Roxithromycineffekten mittels 2D- DIGE



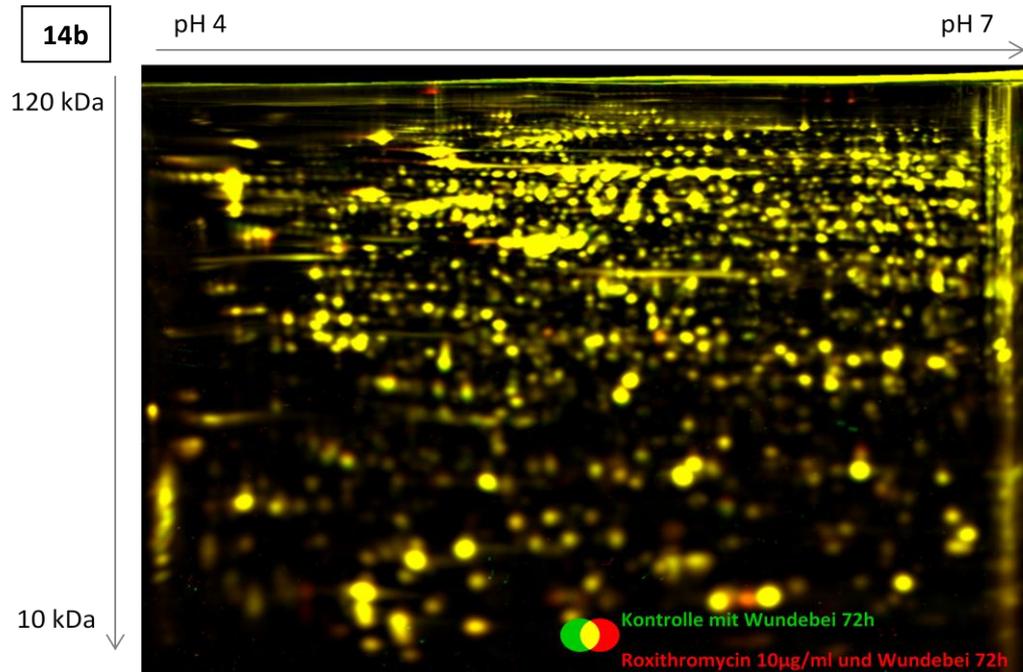


Abbildung 14a und 14b: Fusionsgelbilder von Roxithromycinbehandelten und der Wundsetzung unterzogenen S9-Zellen verglichen mit den korrespondierenden roxithromycinbehandelten, nicht der Wundsetzung unterzogenen S9-ellen (14a) sowie der nicht behandelten Kontrolle (14b). Die Proteinproben wurden mittels 2D-DIGE Verfahren analysiert, bei dem pH-Werte von 4 bis 7 sowie ein Molekulargewicht von 10 kDa bis 120 kDa abgedeckt werden. Fusionsgelbilder wurden von allen vier technischen Replikaten mittels Average-Fusionsmodus erstellt. Grüne Spots entsprechen dabei Proteinen, die in der Roxithromycin-Probe ohne Wunde bei 96 h (14a) sowie in der Kontrollprobe mit Wunde bei 72 h (14b) in höherer Menge erscheinen. Rote Spots markieren einen Unterschied in der Proteinmenge für die Bedingung Roxithromycin-Probe mit Wunde bei 96 h sowie Roxithromycin-Probe mit Wunde bei 72 h. Gelbe Spots entsprechen Proteinen, die in beiden Proben in annähernd gleichen Mengen vorliegen.

3.5. Effekt von Roxithromycin auf die Proteinsynthese von S9-Zellen

Nach Berechnung der Spotvolumina der einzelnen Proteinspots mit Hilfe der Delta 2D-Software wurden für die vorgenannten Bedingungen und Zeitpunkte Ratios aus den jeweiligen Mittelwerten der Spotvolumina gebildet und der Genespringssoftware einer Ein-Wege-Anova zugeführt ($p < 0,05$). Nach Durchführung eines Students T-Testes und Anwendung eines Regulationsfaktors von 1,5 wurden die Daten in Ingenuity Pathway Analysis (IPA) geladen. Das Signifikanzniveau in der dafür angewendeten Varianzanalyse lag bei $p < 0,05$. Insgesamt wurden bei der S9-Zelllinie 1749 Spots quantifiziert und 1413 Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die Analyse der quantitativen 2D-DIGE-Daten kombiniert mit den mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteinspots ergab für

die Zelllinie S9 insgesamt 30 Proteine, die durch die Anwendung von Roxithromycin signifikant verändert waren.

122 Proteinspots, die in der statistischen Analyse mit signifikant veränderter Proteinmenge gefunden wurden, jedoch in der ersten massenspektrometrischen Untersuchung nicht identifiziert werden konnten, wurden in einem präparativen Gel manuell gecuttet und der Analyse mittels LC-MS Technologie zugeführt.

Es wurden 195 Proteine identifiziert und nach Fusion mit den vormals identifizierten Proteinen in IPA eingespeist. IPA nutzt die Ingenuity® Knowledge Base, eine Datenbank, die molekularbiologische Wechselwirkungen und Informationen zu eingespeisten Proteinen sowie Beziehungen und Netzwerke zwischen diesen generiert. Um den Effekt von Roxithromycin zu ermitteln, wurden die Proteinmengen im Vergleich von roxithromycin-behandelten Zellen mit Wunde und der Kontrollgruppe mit Wunde und im Vergleich von medikamentös behandelten Zellen ohne Wunde und der Kontrolle ohne Wunde untersucht.

Folgende Tabellen stellen die signifikant regulierten Proteine für die gewählten Bedingungen Roxithromycin und Wunde gegen Kontrolle und Wunde sowie Roxithromycin ohne Wunde gegen Kontrolle ohne Wunde dar. 16 Spots erwiesen sich für die Bedingungen Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde als signifikant (s. Tab. 15), sowie 24 für Roxithromycin und Kontrolle ohne Wunde (s. Tab. 16).

Alle Ergebnisse unterlagen einem p-value $p < 0,05$. Spots, die keine signifikante Regulation aufwiesen oder nicht identifiziert werden konnten, blieben von der Auswertung unberührt.

Tabelle 15: Signifikant regulierte Proteine (mindestens um den Faktor 1,5) Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde (rx+ / co+) über 96 Stunden

Protein/Zeit	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Protein Name
ACTG1	1,75	1,68	1,77	1,97	1,93	Aktin
BASP1	1,39	1,41	1,30	1,31	1,50	Brain acid soluble protein 1
CALU	1,21	-1,37	-1,57	-1,60	-1,56	Calumenin
CORO1B	-1,14	-1,31	-1,53	-1,02	-1,14	Coronin 1B
DPYSL2	-1,16	-1,35	-1,69	1,05	1,18	Dihydropyrimidinase related protein
HSP90AA1	1,61	2,65	2,08	3,31	3,76	HSP90AA1 protein
HSP70	1,39	1,34	1,65	1,85	1,70	78 kDa Glucose regulated

						protein
MYL12B	1,11	1,14	1,17	-1,03	-1,80	Myosin regulatory light chain 12B
NPM1	-1,02	-1,11	-1,12	-1,35	-1,67	Nucleophosmin
PAFAH1B2	1,02	1,20	1,47	1,68	1,71	Platelet activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
PCNA	1,49	1,52	1,11	1,07	1,09	Proliferating cell nuclear antigen
SH3GL1	1,29	1,16	1,26	1,19	1,78	Endophilin- A2
SRM	1,06	1,39	1,78	2,05	2,31	Spermidin Synthase
SWAP70	-1,19	-1,21	-1,52	-1,07	-1,11	Switch associated protein 70
TMOD3	-1,12	1,02	-1,55	-1,05	-1,28	Tropomodulin 3
UBA5	1,04	1,11	1,12	-1,14	-8,36	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5

Tabelle 16: Signifikant regulierte Proteine (mindestens Faktor 1,5) Roxithromycin und Kontrolle ohne Wunde (rx- / co-) über 96 Stunden

Protein/Zeit	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Protein Name
ACTG1	1,69	1,62	1,73	2,02	2,05	Aktin
APRT	-1,19	-1,18	-1,51	-1,05	-1,22	Adenine phosphoribosyltransferase
CALU	-1,18	-1,42	-1,80	-1,69	-1,51	Calumenin
CBX1	-1,05	-1,50	-1,05	1,01	-1,10	Chromobox homolog 1
CTSD	1,01	1,00	-1,63	-1,37	-1,23	Cathepsin D
DNAJC9	-1,22	-1,05	-1,47	-1,13	-1,23	DnaJ homolog subfamily C member 9
DPYSL2	-1,01	-1,21	1,39	-1,52	1,22	Dihydropyrimidinase related protein
HSP90AA1	1,38	3,95	2,09	1,92	1,95	HSP90AA1 protein
HSP70	1,52	1,63	1,83	1,72	1,55	78 kDa Glucose regulated protein
HSPA8	1,46	1,42	1,60	1,40	1,33	HSPA8 protein
NASP	1,23	-1,70	-1,14	1,19	1,15	Nuclear autoantigenic sperm protein
PAFAH1B2	1,02	1,29	1,32	1,72	1,95	Platelet activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
PCNA	1,22	-2,56	-1,06	1,51	1,10	Proliferating cell nuclear antigen
PPP1CA	-1,01	-1,14	-1,82	-1,46	1,13	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit
PTGES3	-2,13	-1,07	-1,05	1,08	-1,05	Prostaglandin E Synthase 3
RCN1	-1,02	1,15	1,35	1,49	1,39	Reticulocalbin 1

SET	-1,14	-1,61	-1,79	-1,50	-1,22	Protein SET
SGTA	-2,73	-1,68	-1,15	1,14	1,15	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha
SRM	1,00	1,82	1,53	1,87	2,25	Spermidin Synthase
STAM	-1,29	-1,68	-1,48	-1,22	-1,22	Signal transducing adapter molecule 1
TRIM28	-1,13	-3,51	-1,02	1,04	-1,07	Transcription intermediary factor 1-beta
UBA5	1,02	-1,59	1,07	1,07	-1,10	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5
UQCRC1	-1,26	1,07	-1,60	-1,27	-1,50	Cytochrome b-c1 complex subunit 1
VIM	-1,52	-1,23	-1,99	-1,27	-1,03	Vimentin

Für das Protein Spermidin-Synthase (SRM) zeigt sich für die Bedingungen Roxithromycinbehandlung mit und ohne Wunde (rx+/rx-) sowie Kontrolle mit und ohne Wunde (co+/co-) eine verringerte Menge über 96h. Unter den Bedingungen Roxithromycin und Kontrolle ohne Wunde (rx-/co-) sowie mit Wunde (rx+/co+) kommt es über 96 Stunden zu einer mehr als zweifach erhöhten Proteinmenge (s. Abb. 15). Es liegt somit die Vermutung nahe, dass die Roxithromycinbehandlung einen signifikant stimulierenden Einfluss auf die Synthese des Proteins ausübt, während die Wunde eher einen hemmenden Faktor darstellt.

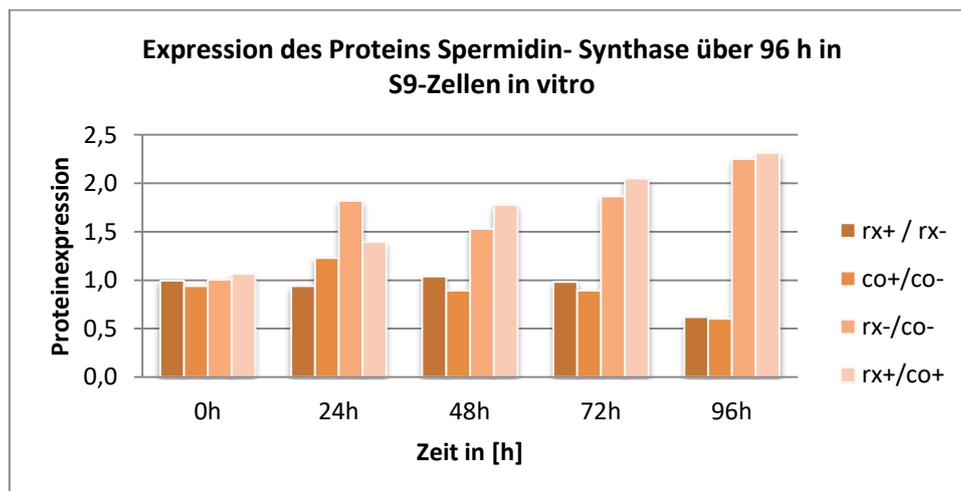


Abbildung 15: Darstellung der Proteinexpression von Spermidin- Synthase (SRM) über 96 h in S9-Zellen. Für die Bedingungen Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde (rx+/co+), Roxithromycin und Kontrolle ohne Wunde (rx-/co-), Roxithromycinbehandlung mit und ohne Wunde (rx+/rx-) sowie Kontrolle mit und ohne Wunde (co+/co-).

Das Protein Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta (PAFAH1B2) zeigt ein ähnliches Expressionsprofil. Im Verlauf der 96 Stunden findet eine progrediente Hochregulation bei den roxithromycinbehandelten Zellen statt, unabhängig von einer Wundsetzung. Das Maximum findet sich bei 96 Stunden mit einer Stimulation auf das 1,95-fache für die Bedingung Roxithromycin und Kontrolle ohne Wunde (rx-/co-) sowie um 1,71-fach für die Bedingung mit Wunde (rx+/co+) (s. Abb. 16). Des Weiteren zeigt sich eine Repression des Proteins in den Vergleichen zwischen Wunde und intaktem Zell-Monolayer, unabhängig von einer medikamentösen Behandlung.

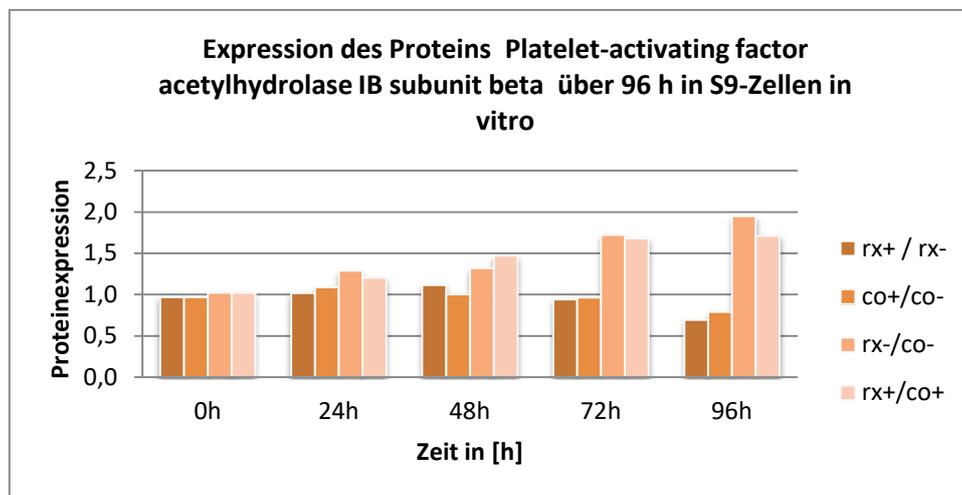


Abbildung 16: Darstellung der Proteinexpression von Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta (PAFAH1B2) über 96 h in S9-Zellen. Für die Bedingungen Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde (rx+/co+), Roxithromycin und Kontrolle ohne Wunde (rx-/co-), Roxithromycinbehandlung mit und ohne Wunde (rx+/rx-) sowie Kontrolle mit und ohne Wunde (co+/co-).

3.6. Netzwerkanalysen (IPA)

Die Auswertung der mittels *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) generierten Daten erlaubt die Zuordnung der regulierten Proteine zu molekularen und zellulären Funktionen. IPA ermöglicht die Bündelung von in der Fachliteratur veröffentlichten Erkenntnissen. Somit gelingt die Darstellung mannigfaltiger molekularer Effekte von Mediatoren (z.Bsp. Medikamente). In den folgenden Abbildungen 17a und 17b sind für die Bedingungen Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde sowie Roxithromycin und Kontrolle ohne Wunde die Entwicklung der Proteinfunktionen in S9-Zellen in einem Rangsystem über 96 Stunden dargestellt.

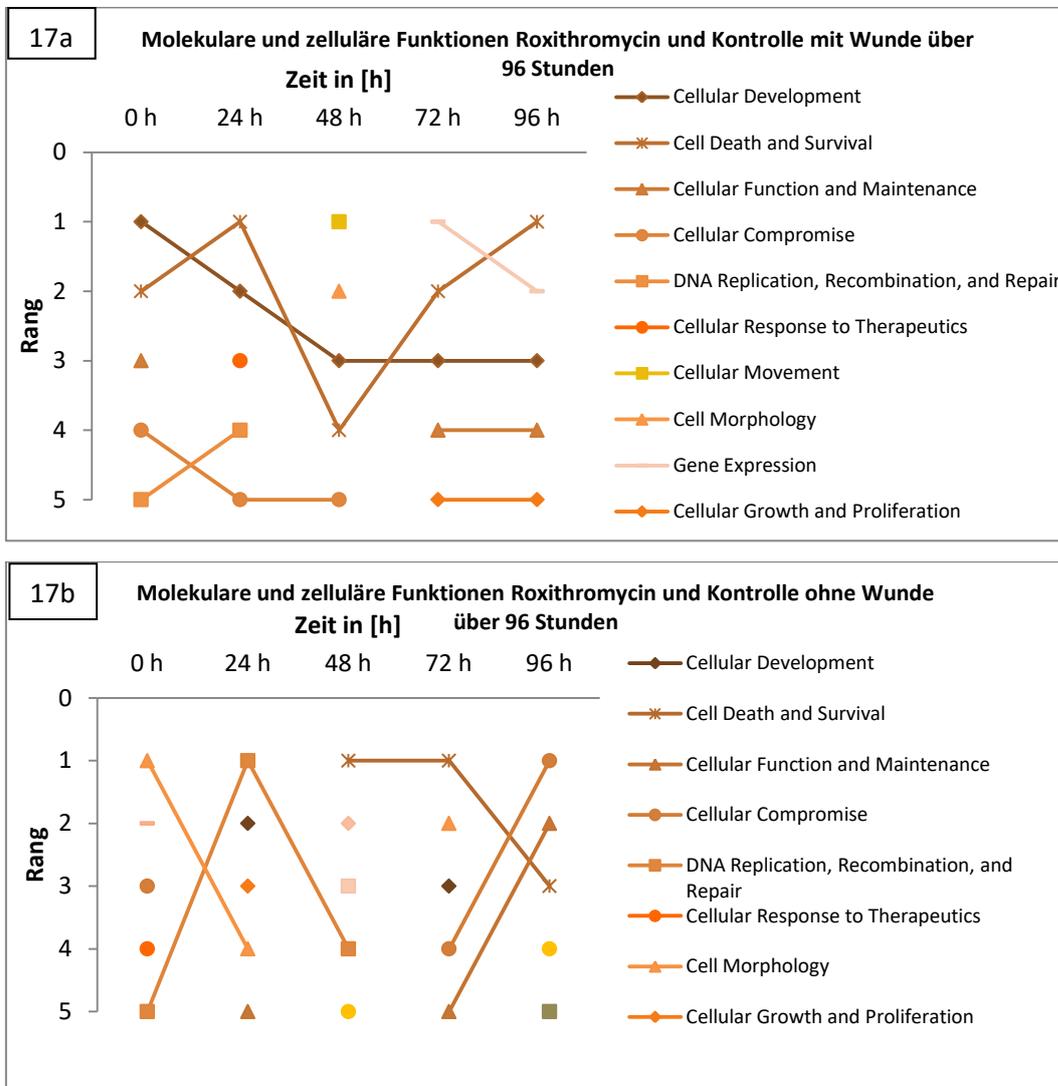
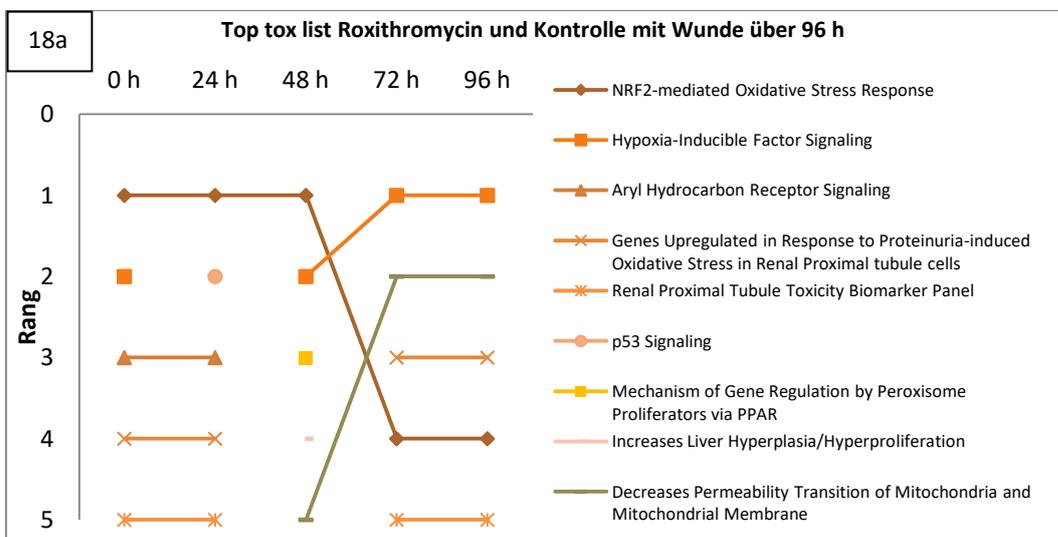


Abbildung 17a und 17b: Molekulare und zelluläre Funktionen für die Bedingung Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde (a) bzw. Roxithromycin und Kontrolle ohne Wunde (b) über 96 h. Darstellung als Rangsystem nach den Erntezeitpunkten 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden.

Für die medikamentendefinierten Bedingungen Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde sowie Roxithromycin und Kontrolle ohne Wunde über 96 Stunden zeigt sich eine Auswirkung auf Proteinfunktionsgruppen, die für die Zellentwicklung und den Zelltod bzw. Zellüberleben verantwortlich sind. Korrespondierend finden sich Proteingruppen, die durch Zellschäden bzw. Proliferation induziert werden. („Cellular Compromise“, Zellwartung oder Zellwachstum). In beiden Bedingungen kommt in der Frühphase (0 oder 24 Stunden nach Inkubation mit Roxithromycin) eine zelluläre Reaktion auf Therapeutika zur Darstellung.

Die IPA-Tox[®] Datenanalyse ermöglicht eine fokussierte Toxizitäts- und Sicherheitsbewertung der untersuchten Stoffe und zeigt biologische Mechanismen auf, die mit der Toxizität auf molekularer, zellulärer und biochemischer Ebene zusammenhängen. Dargestellt sind die Schädigungsmechanismen in abnehmender Gewichtung der identifizierten Proteine der entsprechenden Pathways im Zeitstrahl von 0 bis 96 Stunden für die Bedingungen Roxithromycin und Kontrolle mit und ohne Wunde (s. Abb. 18a und 18b).



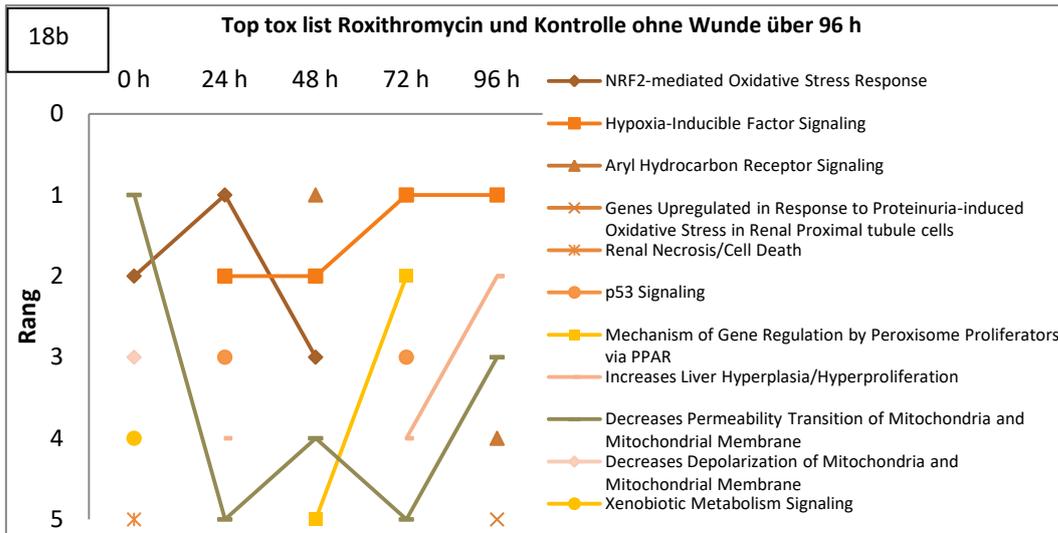


Abbildung 18a und 18b: Schädigungsmechanismen in abnehmender Gewichtung der identifizierten Proteine der entsprechenden Pathways im Zeitstrahl von 0 bis 96 Stunden für die Bedingungen Roxithromycin und Kontrolle mit (a) und ohne (b) Wunde.

Die Toxizitätsanalyse der medikamentendefinierten Bedingungen zeigte mit und ohne Wundbehandlung vordergründig eine mitochondriale Beeinflussung durch Herabsetzen der Mitochondrienmembranpermeabilität. Ohne Wundbehandlung findet sich initial auch eine Schädigung durch verminderte Depolarisation an der Mitochondrienmembran (T 0 h, Rang 3).

Ein weiterer Faktor, der sich in beiden Diagrammen konstant in den vorderen Rängen findet, ist die NRF-2 vermittelte Antwort auf oxidativen Stress. Zusätzlich zeigen sich für beide roxithromycinabhängigen Bedingungen für die Zeitpunkte 48 bis 96 Stunden sowie bei intaktem Monolayer bei 24 Stunden sowie mit Wunde bei Zeitpunkt T= 0 Stunden Hypoxie- induzierte Signalwege.

Roxithromycin führt mit oder ohne Wundbehandlung zu einer Aktivierung des PPAR-Alpha (Peroxisomen-Proliferations-aktivierter Rezeptor Alpha), (s. Abb. 18a und 18b).

3.7. Effekt der Wunde auf die Proteinsynthese von S9-Zellen

Für die Bedingung Roxithromycin mit und ohne Wunde über 96 Stunden wurden 38 Proteine als signifikant verändert gefunden. Kontrolle mit und ohne Wunde über 96 Stunden ergab 37 signifikant regulierte Proteine. Da in dieser Arbeit primär der Roxithromycineffekt untersucht werden sollte, finden sich die Tabellen mit den signifikant regulierten Proteinen der wundabhängigen Bedingungen der Vollständigkeit im Anhang.

In der Analyse der beeinflussten molekularen und zellulären Funktionen der wundabhängigen Bedingungen Roxithromycin mit und ohne Wunde sowie Kontrolle mit und ohne Wunde spielen Proteine, die den Zelltod bzw. das Zellüberleben regulieren konstant die wichtigste Rolle. Für die Bedingung Roxithromycin mit und ohne Wunde finden sich im Zeitverlauf von 0 bis 72 Stunden zudem vermehrt Proteine, die die Zellintegrität („cellular compromise“) beeinflussen, sowie in der Frühphase der Wundheilung (bis 48 Stunden) Proteine, die die Zellentwicklung dominieren.

Die Bedingung Kontrolle mit und ohne Wunde zeigt wie erwähnt Proteine, die den Zelltod bzw. das Zellüberleben regulieren über den gesamten Zeitraum an erster Stelle. Die weiteren gefunden Funktionen haben mehr punktuellen Charakter, was möglicherweise der geringen Anzahl an regulierten Proteinen geschuldet ist. Die Abbildungen zu den beeinflussten molekularen und zellulären Funktionen für die Bedingungen Roxithromycin mit und ohne Wunde bzw. Kontrolle mit und ohne Wunde über 96h sind ebenfalls im Anhang hinterlegt.

3.8. LC-MS-Analyse über einen kurzen Gradienten zur weiteren Differenzierung eines konzentrationsabhängigen Roxithromycineffektes

Zur weiteren Klärung eines molekularen Effektes von Roxithromycin auf Proteinebene und zum besseren Verständnis des bereits mikroskopisch erfassten konzentrationsabhängigen Roxithromycineffektes wurden S9- Zellen für 24 Stunden mit Roxithromycin in Konzentrationen von 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml und 80 µg/ml inkubiert. Parallel wurde eine medikamentös unbehandelte Zellkulturschale als Kontrollgruppe mit erfasst. Auf die Wundsetzung wurde in diesem Experimentdesign verzichtet, um tieferen Einblick in die singular durch Roxithromycin induzierten Proteomveränderungen zu erhalten.

Nach Erreichen des Zeitpunktes T= 24 h wurden die S9-Zellen geerntet und die Proben für die Analyse mittels LC-MS aufbereitet. Die Proben wurden zunächst mittels eines LC- Gradienten über 60 Minuten analysiert, um erste Anhaltspunkte eines dosisabhängigen Roxithromycineffektes zu erhalten. Insgesamt konnten dabei 1296 Proteine identifiziert werden, davon blieben 88 Proteine nach Filterung über einen Regulationsfaktor von 1,2 übrig. Für die Bedingung Roxithromycin in einer Konzentration von 10 µg/ml gegen Kontrolle ohne Wunde zeigten sich 7 Proteine signifikant verändert. Bei einer Dosis von 20 µg/ml 38 Proteine, 14 bei 40 µg/ml und 51 bei einer Roxithromycinkonzentration von 80 µg/ml. Aufschluss über die Verteilung der von IPA gefilterten Top-Proteine auf die einzelnen Konzentration gibt folgende Tabelle (s. Tab. 17).

Tabelle 17: Signifikant regulierte Proteine (fett markiert) aufgeschlüsselt nach den einzelnen Konzentrationen beginnend mit der höchsten Regulation je Bedingung. Ergänzung von Proteinregulationen in weiteren Konzentrationen (nicht fett markiert), sofern vorhanden.

Name/ Konzentration	C = 10 µg/ml	C = 20 µg/ml	C = 40 µg/ml	C = 80 µg/ml	Proteinname
COL5A1	1,80	1,77	1,68	1,46	collagen, type V, alpha 1
NUCB1	1,79	2,87	3,40	3,53	nucleobindin 1
COL12A1	1,41	1,54	1,53		collagen, type XII, alpha 1
CD99	2,16	2,98	2,56	2,67	CD99 molecule
KPNA3		2,29			karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)

CTSZ		2,26			cathepsin Z
UBXN7	1,15	1,94	-1,21	-1,58	UBX domain protein 7
MARCKS		1,70			myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
NME1		1,66			NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1
RPL6		1,56			ribosomal protein L6
GSTK1	1,366	1,344	1,64	1,48	glutathione S-transferase kappa 1
UGP2			1,51		UDP-glucose pyrophosphorylase 2
ALB			1,32		Albumin
SSBP1	1,119		1,29		single-stranded DNA binding protein 1, mitochondrial
PPIB	1,145	1,33	1,27	1,28	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
PHGDH			1,26	1,45	phosphoglycerate dehydrogenase
RAN	1,087		1,23	1,22	RAN, member RAS oncogene family
NSF	-1,11	-1,21	1,43	1,77	N-ethylmaleimide-sensitive factor
SQSTM1	1,009			1,64	sequestosome 1
COPB1	1,027		1,42	1,58	coatamer protein complex, subunit beta 1
RARS				1,58	arginyl-tRNA synthetase
P4HA2	1,36		1,36	1,49	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II
CTNNB1				1,47	catenin (cadherin-associated protein) beta 1
RPL21				1,43	ribosomal protein L21
HNRNPC	-1,33	-1,40			heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C
THBS1	-1,31	-1,50	-1,47	-1,69	thrombospondin 1
CFL1	-1,28				cofilin 1 (non-muscle)
VDAC1	-1,23			-1,06	voltage-dependent anion channel 1
ALDOC	-1,25	-1,7		-1,32	aldolase C, fructose-bisphosphate

CARHSP1		-1,49	-1,51	-1,55	calcium regulated heat stable protein 1
APRT		-1,46			adenine phosphoribosyltransferase
VTNC	-1,32	-1,33	-1,87	-5,9	Vitronectin
SET	-1,21	-1,37		-1,17	SET nuclear proto-oncogene
CPNE1	1,0	-1,36		-1,05	copine I
ACTG1	-1,197	-1,36			actin gamma 1
B2M	-1,07	-1,34		1,02	beta-2-microglobulin
NACA	-1,08		-1,31	-1,14	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit
CALM1	-1,04			-8,77	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)
C1QBP	-1,04		-1,40	-2,33	complement component 1, q subcomponent binding protein
RPS5				-2,17	ribosomal protein S5
RPS13				-1,86	ribosomal protein S13
TPM4	-1,14			-1,80	tropomyosin 4
RPLP0				-1,59	ribosomal protein, large, P0
EEF1B2				-1,46	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2
PTGR1	-1,14	-1,28	-1,317	-1,46	prostaglandin reductase 1

In der Analyse der beeinflussten Zellfunktionen definierten sich nach einer Roxithromycininkubation von 24 Stunden konzentrationsabhängig unterschiedliche Schwerpunkte (s. Tab. 18).

Während bei den niedrigeren Roxithromycinkonzentrationen 10 µg/ml und 20 µg/ml Zelltod/Zellüberleben bzw. Zellbewegung vordere Rangplätze einnehmen, sind dies bei 40 µg/ml Zellmorphologie bzw. Zellorganisation und bei 80 µg/ml DNA-Replikation und Reparaturmechanismen sowie Nukleinsäuremetabolismus. Bei allen Konzentrationen findet man den Funktionsbereich Zellkommunikation und Interaktion.

Tabelle 18: Signifikant beeinflusste Zellfunktionen von S9- Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Roxithromycin in Konzentrationen von 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml und 80 µg/ml im Vergleich zu medikamentös nicht behandelten S9-Zellen. Darstellung als Rangsystem (1-5).

Zellfunktion/ Rang	1	2	3	4	5
Cell Death and Survival	10 µg/ml	20 µg/ml			
Carbohydrate Metabolism		10 µg/ml		40 µg/ml	
Cell Morphology	40 µg/ml		10 µg/ml		
Cell Signaling				10 µg/ml	
Cell-To-Cell Signaling and Interaction			20 µg/ml	80 µg/ml	10 µg/ml 40 µg/ml
Cellular Movement	20 µg/ml				
Cellular Assembly and Organization		40 µg/ml			80 µg/ml
Cellular Growth and Proliferation				20 µg/ml	
Nucleic Acid Metabolism		80 µg/ml			20 µg/ml
Amino Acid Metabolism			40 µg/ml		
DNA Replication, Recombination, and Repair	80 µg/ml				
Small Molecule Biochemistry			80 µg/ml		

Die Toxizitätsanalyse offenbart kongruent zu der gewählten Roxithromycinkonzentration im DIGE-Experiment bei 10 µg/ml eine Beeinflussung der Mitochondrien durch Veränderung des Membranpotenzials. Die mittleren Roxithromycindosierungen 20 µg/ml und 40 µg/ml induzieren primär eine NRF2-vermittelte Antwort auf oxidativen Stress. Zusätzlich findet sich bei der Roxithromycinkonzentration 40 µg/ml eine Beeinflussung von Akute-Phase Proteinen. Singulär bei einer Roxithromycindosis von 80 µg/ml erscheinen der p53-Signalweg sowie Zellzyklus-Regulationsmechanismen während der Mitose zur Verhinderung von DNA-Schäden.

Mit Hilfe der signifikant regulierten Proteine erstellt IPA zudem Netzwerke, die die Zusammenhänge der einzelnen Proteine im Kontext der betreffenden Funktion visualisieren. Folgende Tabelle (s. Tab. 19) gibt hierzu einen Überblick.

Tabelle 19: Zusammenfassung der signifikant regulierten Proteine nach 24-stündiger Inkubation mit Roxithromycin ohne Wunde (c= 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml) in Funktionsgruppen nach Punktzahl geordnet als Grundlage für die Darstellung in funktionellen Proteinnetzwerken

C [µg/ml]	Top Funktionen	Score	Molekül- anzahl
10	Cell Death and Survival, Renal Necrosis/Cell Death, Renal and Urological System Development and Function	19	7
20	Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Respiratory Disease	26	13
	Cell Cycle, Cellular Development, Protein Synthesis	19	10
40	Cell Morphology, Protein Synthesis, Cell Death and Survival	28	11
	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking	5	3
80	Dermatological Diseases and Conditions, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Connective Tissue Disorders	42	20
	Infectious Disease, Cellular Development, Connective Tissue Development and Function	24	13
	Cellular Assembly and Organization, Dermatological Diseases and Conditions, Cancer	15	9
	Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	13	8
	Protein Synthesis, Gene Expression, Cellular Assembly and Organization	2	1

Hier zeigen sich Assoziationen zwischen bestimmten Pathways/Funktionsgruppen mit Erkrankungen (z.Bsp. für Roxithromycin in einer Konzentration von 80 µg/ml Pathway 1 *Dermatological Diseases and Conditions, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Connective Tissue Disorders*). Mittels IPA-Analysen ist eine weiterführende Differenzierung der Molekülgruppen zwischen Pathways und Erkrankungen nicht möglich. Es erfolgen daher getrennte Pathway-Analysen zum Beispiel über Westernblots für geeignete Vertreter dieser Regulationswege, da im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen auf Erkrankungen nicht

weiter betrachtet, sondern die Wirkweise des Medikamentes anhand geeigneter Markerproteine (z. Bsp. Spermidin-Synthase) untersucht werden soll.

3.9. LC-MS-Analyse über einen langen Gradienten nach Behandlung von S9-Zellen mit Roxithromycinkonzentrationen von 20 µg/ml und 40 µg/ml

Zum weiteren Verständnis des konzentrationsabhängigen Roxithromycineffektes auf S9-Zellen wurden die mittleren Roxithromycindosierungen 20 µg/ml und 40 µg/ml im Anschluss erneut, nun mittels LC-Gradienten über 135 Minuten untersucht.

In der getesteten Roxithromycinkonzentration $c = 20 \mu\text{g/ml}$ konnten 1228 Proteine identifiziert werden, nach Anwendung eines Regulationsfaktors von mindestens 1,5 waren 162 Proteine quantitativ signifikant verändert für den Vergleich Roxithromycin ($c = 20 \mu\text{g/ml}$) gegen Kontrolle ohne Wunde nach 24 Stunden.

In der Analyse der beeinflussten Zellfunktionen definierten sich nach einer Roxithromycininkubation von 24 Stunden die Schwerpunkte Zell-zu-Zellsignale und Interaktion, Zellbewegung, Zelltod sowie Zellwartung (s. Tab. 20).

Tabelle 20: Signifikant beeinflusste Zellfunktionen von S9-Zellen nach 24- stündiger Inkubation mit Roxithromycin in einer Konzentration von 20 µg/ml im Vergleich zu medikamentös nicht behandelten S9-Zellen. Darstellung von p-Wert, z-score und Molekülanzahl.

Zellfunktion	spezifisch	p-Value	z- Score	Molekülanzahl
Cell-To-Cell Signaling and Interaction		2,85E-02 - 8,84E-05		21
	adhesion of endothelial cells	2,50E-04	0,611	7
	adhesion of tumor cell lines	3,09E-03	0,041	8
	development of gap junctions	1,46E-02	-0,798	5
Cellular Movement		2,85E-02 - 9,17E-05		17
	invasion of cells	1,82E-02	0,006	12
	cell movement of epidermal cells	5,91E-03	0,182	4

cell movement of macrophages	2,25E-02	-0,218	6
Cell Death	2,85E-02 - 1,84E-04		43
apoptosis	1,04E-02	-0,205	40
apoptosis of tumor cells	3,60E-03	-0,812	22
Cellular Compromise	1,91E-02 - 3,40E-04		10
transdifferentiation of squamous epithelial cells	8,80E-03		1
adhesion of cancer cells	3,03E-04		4
Cellular Function and Maintenance	2,85E-02 - 5,43E-04		18
engulfment of fibroblasts	4,56E-04		2
formation of vesicles	8,83E-03		4
formation of ribosome	1,07E-02		2

Im speziellen konnten für die Roxithromycinkonzentration 20 µg/ml 15 signifikant regulierte Proteine bezüglich „cell movement of epithelial cells“ gefunden werden. Angewendet wurde ein Regulationsfaktor von 1,2. Folgende Tabelle gibt diese wieder (s. Tab.21.)

Tabelle 21: Signifikant regulierte Moleküle für die Bedingung Roxithromycin (20 µg/ml) ohne Wunde nach 24 Stunden, LCMS. Dargestellt sind alle nachgewiesenen Proteine die in Bezug stehen zu „cell movement of epithelial cells“.

Protein	Proteinname	Regulationsfaktor
STAT3	signal transducer and	-1,471
TRIM25	tripartite motif containing 25	-1,426
MTPN	myotrophin	-1,419
ILK	integrin linked kinase	-1,41
FGF2	fibroblast growth factor 2	-1,382
VTN	vitronectin	-1,338
MAPK1	mitogen-activated protein	-1,288
CTNNB1	catenin beta 1	-1,253
KRAS	KRAS proto-oncogene,	-1,248
HAT1	histone acetyltransferase 1	1,227
COL5A1	collagen type V alpha 1 chain	1,77
DNAJB6	DnaJ heat shock protein fa-	1,803

SPARC	secreted protein acidic and	1,998
TSP1	Thrombospondin	-1,50
JUP	junction plakoglobin	-2,0

Die Toxizitätsanalyse ergab eine Beeinflussung des p53-Signalweges sowie Schädigung durch oxidativen Stress. Deutlich wird zudem, dass der Anteil der am Pathway beteiligten Proteine ohne signifikante Regulation stark überwiegt. Die gefundenen Mechanismen sind somit als ein Anhalt für das Wirk- und Schädigungsprinzip von Roxithromycin zu verstehen, bedürfen jedoch einer weiteren, tiefgründigen Untersuchung (s. Tab 22).

Tabelle 22: Schädigungsmechanismen nach 24-stündiger Inkubation von S9-Zellen mit Roxithromycin (c= 20 µg/ml) ohne Wunde. Darstellung des p-Values, Ratios, absolute und prozentuale Verteilung der signifikant hoch – oder runter regulierten Proteine, bzw. Anteil ohne signifikante Regulation

Mechanismus	p-Value	Ratio	Overlap	Moleküle
p53 Signaling	1,33E-02	4,21E-02	4,2 % 4/95	Thrombospondin-1, Histone deacetylase 1, Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 5, Apoptosis regulator BAX
Oxidativer Stress	1,74E-02	5,26E-02	5,3 % 3/57	Glutathione reductase, Intercellular adhesion molecule 1, Glutathione S-transferase Mu 3

Mit Hilfe der signifikant regulierten Proteine erstellt IPA Netzwerke, die die Zusammenhänge der einzelnen Proteine im Kontext der betreffenden Funktion visualisieren. Folgende Tabelle (s. Tab. 23) gibt hierzu einen Überblick.

Tabelle 23: Zusammenfassung der signifikant regulierten Proteine nach 24-stündiger Inkubation mit Roxithromycin (c= 20 µg/ml) in Funktionsgruppen nach Punktzahl geordnet als Grundlage für die Darstellung in funktionellen Proteinnetzwerken.

Top Funktionen	Score	Molekülanzahl
Infectious Disease, Tissue Morphology, Connective Tissue Disorders	91	47
RNA Post-Transcriptional Modification, Amino Acid Metabolism, Drug Metabolism	60	37
Cellular Movement, Immunological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	57	35
Cell-mediated Immune Response, Cellular Movement, Hematological	56	33

Nach Aufbereitung der Proben mit einer Roxithromycinkonzentration von 40 µg/ml und Analyse mittels LCMS konnten 1388 Proteine identifiziert werden. Nach Anwendung des Regulationsfaktors 1,5 erwiesen sich 111 Proteine für die Bedingung Roxithromycin und Kontrolle ohne Wunde (T= 24h) als signifikant verändert exprimiert und wurden einer weiterführenden IPA-Analyse unterzogen.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigten sich in der Auswertung der molekularen und Zellfunktionen eine Beeinflussung des Kohlenhydrat- und Nucleinsäuremetabolismus sowie Zelltod- und Zellbewegung regulierende Proteine (s. Tab. 24).

Tabelle 24: Signifikant beeinflusste Zellfunktionen von S9-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Roxithromycin in einer Konzentration von 40 µg/ml im Vergleich zu medikamentös nicht behandelten S9-Zellen. Darstellung von p-Wert, z-score und Molekülanzahl.

Zellfunktion	spezifisch	p-Value	z- Score	Molekülanzahl
Carbohydrate Metabolism		4,49E-02 - 7,86E-05		8
Nucleic Acid Metabolism		4,89E-02 - 1,02E-04		9
Small Molecule Biochemistry		4,89E-02 - 1,02E-04		17
Cell Death		4,94E-02 - 7,96E-04		22
Cellular Movement		4,30E-02 - 2,28E-03		8

Die durch die Roxithromycinbehandlung (c= 40 µg/ml) hervorgerufenen Schädigungsmechanismen bildet Tabelle 25 ab. Primär fanden sich Hinweise für Apoptose und mitochondriale Schädigungsmuster. Der p53- Signalweg scheint ebenfalls betroffen.

Tabelle 25: Schädigungsmechanismen nach 24-stündiger Inkubation von S9-Zellen mit Roxithromycin (c= 40 µg/ml) ohne Wunde. Darstellung des p- Values, absolute Moleküanzahl und prozentualer Overlap der signifikant regulierten Proteine.

Mechanismus	p- Value	Overlap	Moleküle
Glutathione Depletion-Phase II Reactions	5,76E-03	10 % (2/20)	Glutathione S-transferase Mu3, Glutathione S-transferase kappa 1
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1,23E-02	2,6 % (4/156)	Apoptotic protease-activating factor 1, Apoptosis regulator BAX, Glutathione S-transferase Mu3, Glutathione S-transferase kappa 1
p53 Signaling	1,72E-02	3,2 % (3/95)	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 5, Apoptotic protease-activating factor 1, Apoptosis regulator BAX
Decreases Transmembrane Potential of Mitochondria and Mitochondrial Membrane	1,77E-02	3,1 % (3/96)	Collagen alpha-2(IV) chain, Apoptotic protease-activating factor 1, Apoptosis regulator BAX
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	1,25E00	1,73E-02	Glutathione S-transferase Mu3, Glutathione S-transferase kappa 1, DnaJ homolog subfamily B member 6, Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 5

Die sich anschließende Netzwerkanalyse der signifikant regulierten Proteine ordnete diesen den Schwerpunktfunktionen Zell-Zell-Interaktionen, an zweiter Stelle Genexpression, Proteinsynthese und Zelltod sowie Zellorganisation zu (s. Tab. 26).

Tabelle 26: Zusammenfassung der signifikant regulierten Proteine nach 24-stündiger Inkubation mit Roxithromycin (c= 40 µg/ml) in Funktionsgruppen nach Punktzahl geordnet als Grundlage für die Darstellung in funktionellen Proteinnetzwerken.

Top Funktionen	Score	Moleküanzahl
Connective Tissue Disorders, Dermatological Diseases and Conditions, Developmental Disorder	93	43
Gene Expression, Protein Synthesis, Cell Death	62	33
Cellular Assembly and Organization, Cell Cycle, DNA Replication, Recombination, and Repair	61	32

Die Analyse der Daten über einen 135-minütigen statt kurzem Gradienten führte zu einer besseren Trennschärfe der Proteine mit höherer Ausbeute. (kurzer Gradient insgesamt 1296 Proteine, nach Filterung über einen Regulationsfaktor von 1,2 für Roxithromycin 20 µg/ml 38 Moleküle und bei 40 µg/ml 14 Moleküle signifikant reguliert. Bei langem Gradi-

enten 1228 Proteine, nach Anwendung des Regulationsfaktors 1,5 162 Proteine für die Konzentration 20 µg/ml, 111 Proteine bei 40 µg/ml).

In beiden Analysen kommen ähnliche Pathways zur Darstellung, mit Schwerpunkt auf Zellmotilität und-entwicklung, Proliferation und Zelltod.

3.10. Western Blots Anti- Spermidin- Synthase und EIF 5a

Im 2D-DIGE-Experiment zeigte sich die Spermidin-Synthase in den roxithromycinabhängigen Bedingungen signifikant induziert (s. Abb.15). Zur Validierung eines Effektes der Roxithromycinbehandlung auf die Expression des Proteins Spermidin-Synthase wurden ergänzend zunächst 1D-Western Blots mit Anti-Spermidin-Synthase Antikörpern (SRM) und GAPDH zur internen Kontrolle durchgeführt. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung dargestellt:

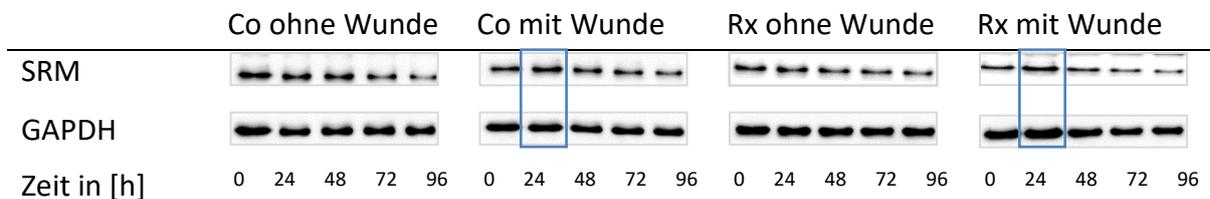


Abbildung 19: Westernblot Anti-Spermidin-Synthase (SRM) Blot 1- Kontrolle (Co) ohne Wunde, Blot 2 Kontrolle (Co) mit Wunde, Blot 3 Roxithromycin (Rx) ohne Wunde, Blot 4 Roxithromycin (Rx) mit Wunde, Detektionszeit 10 Sekunden. Zeitverlauf jeweils 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Zur internen Kontrolle erfolgt parallel ein **Westernblot mit GAPDH**: Blot 1- Kontrolle (Co) ohne Wunde, Blot 2 Kontrolle (Co) mit Wunde, Blot 3 Roxithromycin (Rx) ohne Wunde, Blot 4 Roxithromycin (Rx) mit Wunde, Detektionszeit 10 Sekunden. Zeitverlauf jeweils 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h.

Hier zeigte sich bis auf die Banden „Kontrolle mit Wunde 24 h“ und „Roxithromycin mit Wunde 24 h“ kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Bedingungen (siehe blaue Markierung Abb. 19).

Daher folgte ein Experimentansatz mittels 2D-Westernblots unter Detektion und Quantifizierung der Spotvolumina in Delta 2D für die Bedingung „Roxithromycin mit Wunde 24h gegen Kontrolle mit Wunde 24h“ nach Applikation des Antikörpers SRM. Errechnet wurde nach Aufsummierung ein Ratio von 1,44 (s. Abb. 20 und Tabelle 27). Im DIGE-Experiment ergab sich für diese Bedingung eine Ratio von 1,39.

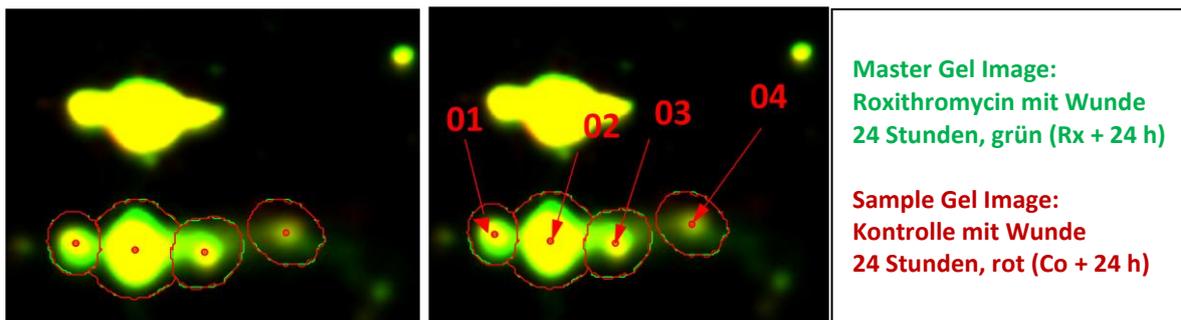


Abbildung 20: Quantifizierung von Spotvolumina des Proteins Spermidin- Synthase (SRM) in Delta2D für die Bedingung Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde bei 24 h. Im Gel-Overlap zeigt sich grün die erhöhte Menge des Proteins im Gel Roxithromycin mit Wunde bei 24 h. Gelb sind gleich quantifizierte Anteile. Mit 1 bis 4 sind die Einzelspots markiert und gelabelt.

Tabelle 27: Aufsummierung der Spotvolumina 01 - 04 des Proteins Spermidin-Synthase (SRM) für die Bedingung Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde bei 24 h. Errechnet wird eine Ratio von 1,44.

Label	Grau-Volumen ohne Hintergrund Co + 24 h	Grau-Volumen ohne Hintergrund Rx + 24 h
01	200,93	351,95
02	886,12	1146,88
03	269,63	468,31
04	123,44	166,04
Aufsummierung der Volumina der Einzelspots	1480,12	2133,18
Ratio Rx + 24 h/ Co + 24 h		= 1,44

Das Protein EIF 5a (Eukaryotic translation initiation factor 5A) wurde in den LCMS- Versuchen bei einer Roxithromycinkonzentration von 40 µg/ml identifiziert und beeinflusst Zellproliferation und Apoptose.

Anschließend erfolgte ebenfalls ein 2D-Westernblot mit einer Detektionszeit von 10 Sekunden für die im DIGE-Experiment gewählte Roxithromycinkonzentration von 10 µg/ml im Wundarm. Abbildung 21 präsentiert den Overlap mit markierten Einzelspots; Tabelle 28 gibt die Aufsummierung dieser wieder. Wir errechneten eine Ratio von 1,5.

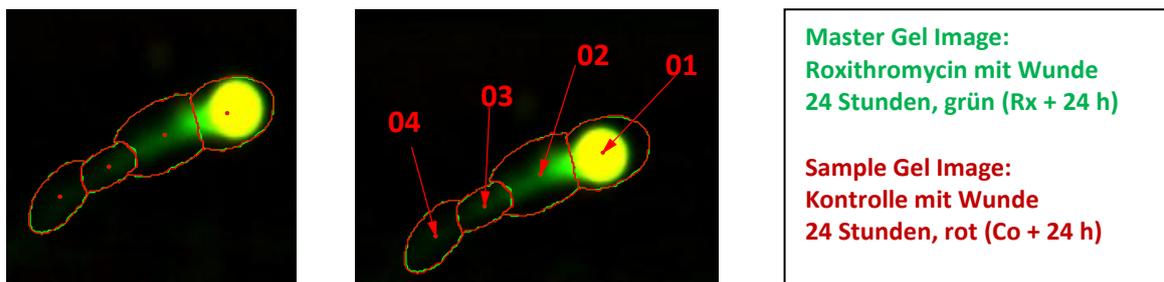


Abbildung 21: Quantifizierung von Spotvolumina des Proteins EIF 5a in Delta2D für die Bedingung Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde bei 24 h. Im Gel-Overlap zeigt sich grün die erhöhte Menge des Proteins im Gel Roxithromycin mit Wunde bei 24 h. Gelb zeigen sich gleiche Anteile. Mit 01 bis 04 sind die Einzelspots markiert und gelabelt. Nach Aufsummierung der Einzelspotvolumina errechnet sich eine Ratio von 1,50.

Tabelle 28: Aufsummierung der Spotvolumina 01 - 04 des Proteins Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (EIF 5a) für die Bedingung Roxithromycin und Kontrolle mit Wunde bei 24 h. Errechnet wird eine Ratio von 1,5.

Label	Grau- Volumen ohne Hinter- grund Co + 24 h	Grau- Volumen ohne Hinter- grund Rx + 24 h
01	878,69	1081,01
02	35,98	231,38
03	2,74	41,2
04	2,13	30,47
Aufsummierung der Volumina der Einzelspots	919,56	1384,06
Ratio Rx + 24 h/ Co + 24 h		= 1,5

3.11. Testung des Wundmodells auf Reliabilität (Experimentator- und Observervarianz)

Um den Einfluss der auswertenden Person auf das Ergebnis der Wundexperimente zu erfassen, wurden die residualen Wundflächen von drei unabhängig voneinander arbeitenden Personen berechnet. Nur der ersten auswertenden Person war bekannt, welche Wunden zur Roxithromycin- und welche zur Kontrollgruppe gehörten. In das Experimentdesign integriert sollte zudem der Einfluss des Experimentierenden auf die Ergebnisse der Wundexperimente untersucht werden.

Dazu wurde der Versuch mit je einem Set bestehend aus Kontrolle und roxithromycinbehandelten S9-Zellen zeitgleich von zwei unabhängig voneinander arbeitenden Personen durchgeführt, sodass parallel zwei komplette Experimente unter den gleichen Laborbedingungen abliefen. Für die Berechnung der residualen Wundflächen wurden nach Experimentabschluss Personen beauftragt, die nicht in den Experimentablauf integriert waren. Die Auswertenden wussten nicht, welche Gruppen Kontrollen oder roxithromycinbehandelt waren und dass es sich um Parallelen handelt, sondern wurden lediglich in die Methodik der Auswertung eingeführt.

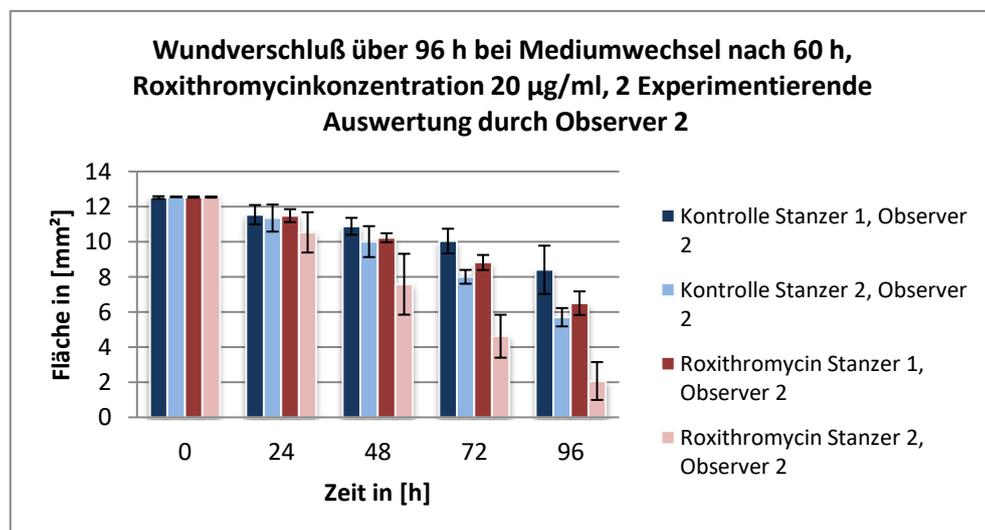
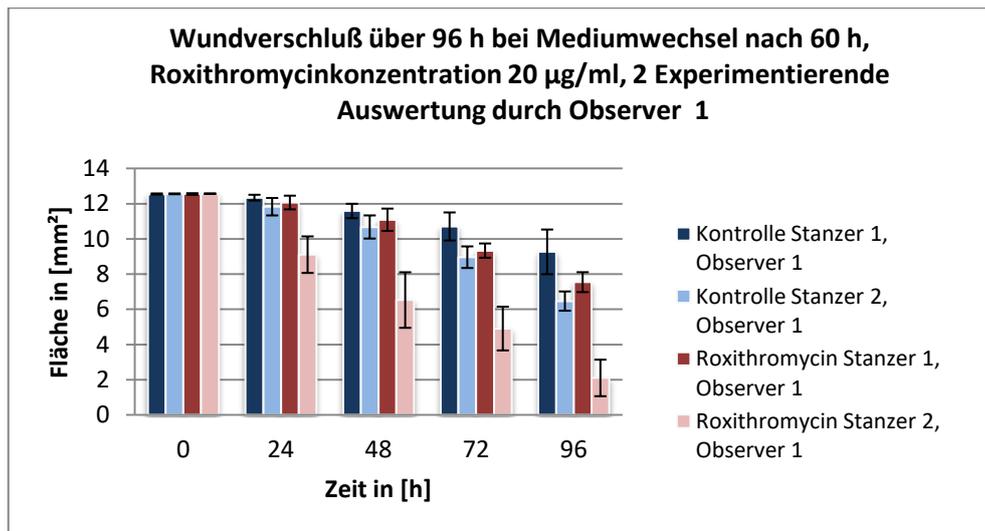
Der Focus wurde auf die day-to-day Reliabilität durch Vermessen an unterschiedlichen Zeitpunkten gelegt. Es wurden insgesamt 100 Wundflächen je auswertender Person vermessen, jeweils 20 pro Erntezeitpunkt (je 5 Wunden Kontrolle 1 und 2, Roxithromycin 1 und 2). In der Auswertung ergeben sich Intraclass-Korrelations Koeffizienten (ICC) von 0,93 und 1,00 zwischen den Observern (s. Tabelle 29).

Tabelle 29: Darstellung der Intraclass- Korrelations Koeffizienten (ICC) zwischen den einzelnen Observern 1 bis 3 nach Auswertung von je 20 Wundflächen pro Bedingung.

	Observer 1/ Observer 2	Observer 1/ Observer 3	Observer 2/ Observer 3
Roxithromycin, Stanzer 1	0,94	0,99	0,95
Roxithromycin, Stanzer 2	0,98	0,95	0,93
Kontrolle, Stanzer 1	0,94	0,99	0,95
Kontrolle, Stanzer 2	0,94	1,00	0,95

Dies sind alles exzellente Werte, die einen beeinflussenden Effekt der auswertenden Personen ausschließen und die Güte des Modells stark belegen.

Die Ergebnisse jedes einzelnen Observers sind in Abbildung 22 und Tabelle 30 dargestellt und demonstrieren die Stabilität der Methode; eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die auswertende Person konnte nicht bestätigt werden.



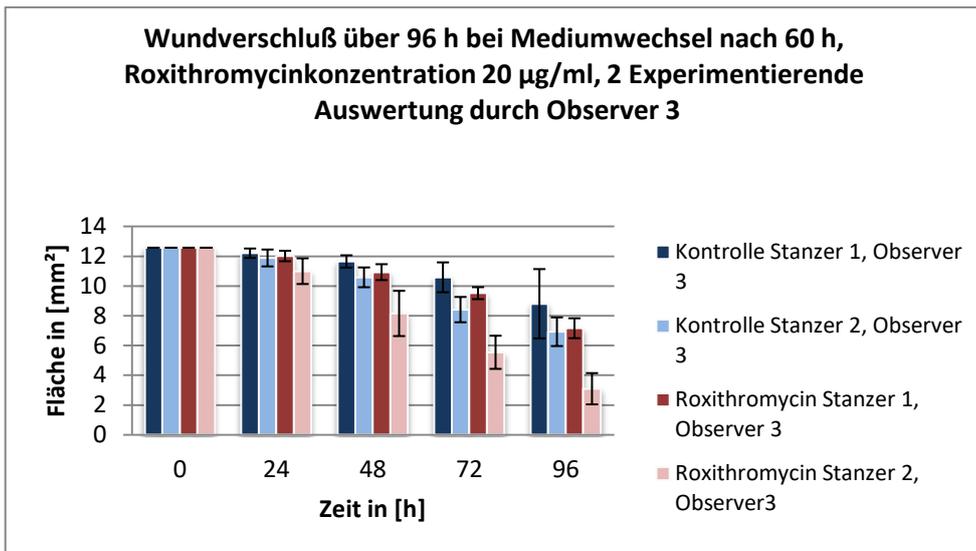


Abbildung 22: Entwicklung der residualen Wundfläche von S9-Zellen über 96 h bei Wundsetzung durch zwei Experimentierende und Auswertung durch drei unabhängige Observer. Berechnung der residualen Wundfläche von roxithromycinbehandelten und nicht medikamentös behandelten S9-Zellen über 96 Stunden durch drei unabhängige Observer, Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung.

Tabelle 30: Residualer Wundverschluß von S9-Zellen über 96 h bei Wundsetzung durch zwei Experimentatoren (1 und 2) und Auswertung durch drei unabhängige Observer. Darstellung der Mittelwerte der residualen Wundfläche in [mm²] und Standardabweichungen (SAB) aus jeweils fünf Wunden roxithromycinbehandelter S9-Zellen und Kontrollgruppe pro Zeitpunkt 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h.

	0 h		24 h		48 h		72 h		96 h	
	Fläche	SAB								
Kontrolle 1, Observer 1	12,54	0,04	12,34	0,16	11,59	0,41	10,71	0,80	9,26	1,36
Kontrolle 1, Observer 2	12,53	0,07	11,56	0,55	10,89	0,48	10,05	0,70	8,42	1,37
Kontrolle 1, Observer 3	12,57	0,0	12,20	0,32	11,65	0,41	10,58	1,00	8,8	2,03
Kontrolle 2, Observer 1	12,56	0,02	11,83	0,50	10,68	0,66	8,96	0,61	6,47	0,55
Kontrolle 2, Observer 2	12,57	0,0	11,36	0,77	10,02	0,88	8,02	0,39	5,71	0,52
Kontrolle 2, Observer 3	12,57	0,0	11,88	0,56	10,58	0,66	8,41	0,85	6,93	0,96

Roxithromycin 1, Observer 1	12,55	0,04	12,07	0,39	11,09	0,63	9,33	0,40	7,54	0,57
Roxithromycin 1, Observer 2	12,56	0,03	11,5	0,37	10,24	0,26	8,83	0,43	6,51	0,67
Roxithromycin 1, Observer 3	12,57	0,0	12,01	0,35	10,93	0,53	9,52	0,40	7,16	0,67
Roxithromycin 2, Observer 1	12,57	0,0	9,10	1,03	6,53	1,57	4,91	1,24	2,1	1,03
Roxithromycin 2, Observer 2	12,56	0,03	10,55	1,15	7,59	1,73	4,63	1,22	2,08	1,08
Roxithromycin 2, Observer 3	12,57	0,0	10,99	0,86	8,15	1,52	5,54	1,11	3,09	1,05

Um zu überprüfen, ob die wundsetzende Person einen Einfluss auf das Ergebnis der Experimente hat, wurden parallel zwei komplette Sets bestehend aus roxithromycinbehandelten und unbehandelten S9-Zellen durchgeführt. Über 96 Stunden wurden alle 24 Stunden je 5 Wunden pro Bedingung digital fotografiert und ausgewertet. Die mittlere residuale Wundfläche beträgt bei 96 Stunden für das erste Set 8,83 mm² für nicht medikamentös behandelte S9-Zellen und 6,37 mm² für den zweiten Wundsetzer. Bei den roxithromycinbehandelten Zellen betrug die mittlere residuale Wundfläche bei 96 Stunden für den ersten Wundsetzer 7,07 mm² und für den zweiten Wundsetzer 2,42 mm². In den Abbildungen 12a und 12b sind die Ergebnisse dieser Auswertung zusammengefasst. Der ICC zwischen beiden Wundsetzern errechnet sich mit 0,862. Hier zeigt sich ein Unterschied zwischen den Experimentierenden.

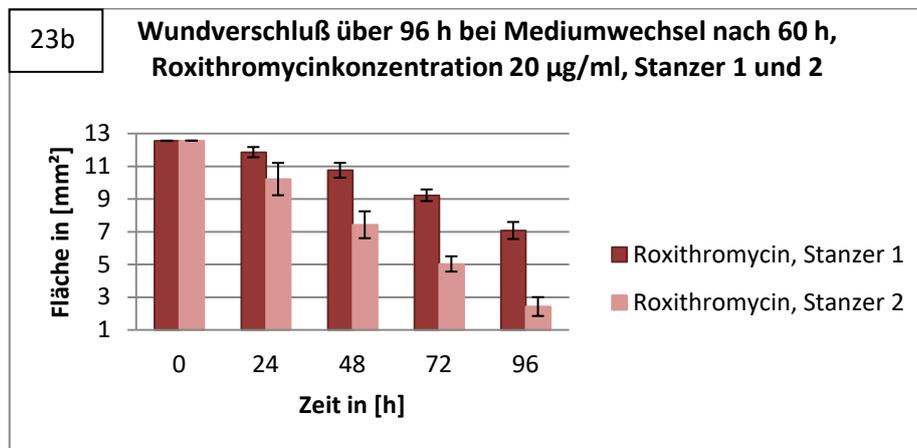
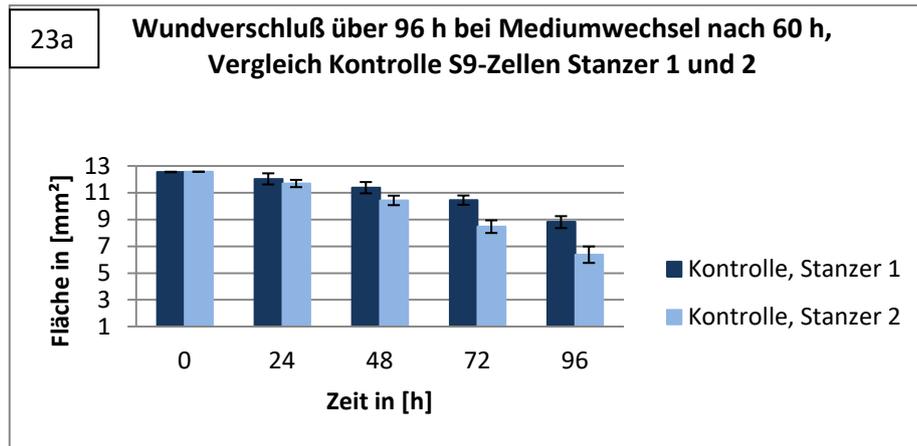


Abbildung 23a und 23b: Entwicklung der residualen Wundfläche von S9-Zellen über 96 h bei Wundsetzung durch zwei Experimentatoren (Stanzer 1 und Stanzer 2). 23a: Entwicklung der residualen Wundfläche medikamentös nicht behandelter S9-Zellen. 23b: Entwicklung der residualen Wundfläche roxithromycinbehandelter S9-Zellen. Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung.

Zur Prüfung auf Signifikanz wurde der Mann-Whitney U- Test angewandt. Es zeigt sich bei beiden Experimentierenden eine signifikante Beschleunigung der Wundheilung von roxithromycinbehandelten S9-Zellen gegenüber der medikamentös nicht behandelten Kontrollgruppe, bei Stanzer 1 für die Zeitpunkte 72 und 96 Stunden, bei Stanzer 2 zudem bei 48 Stunden ($p \leq 0,05$). Dies illustrieren die Abbildungen 24a und 24b. In Tabelle 31 und 32 sind die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests dargestellt.

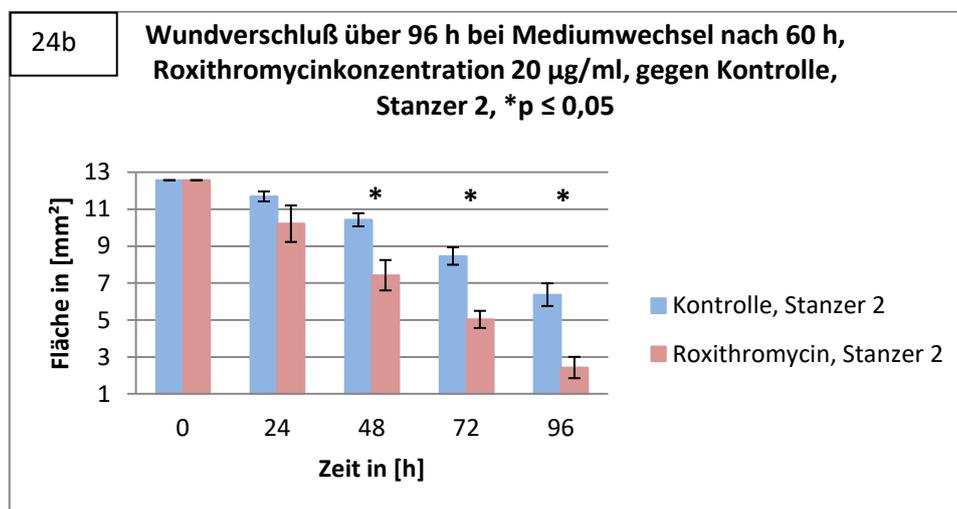
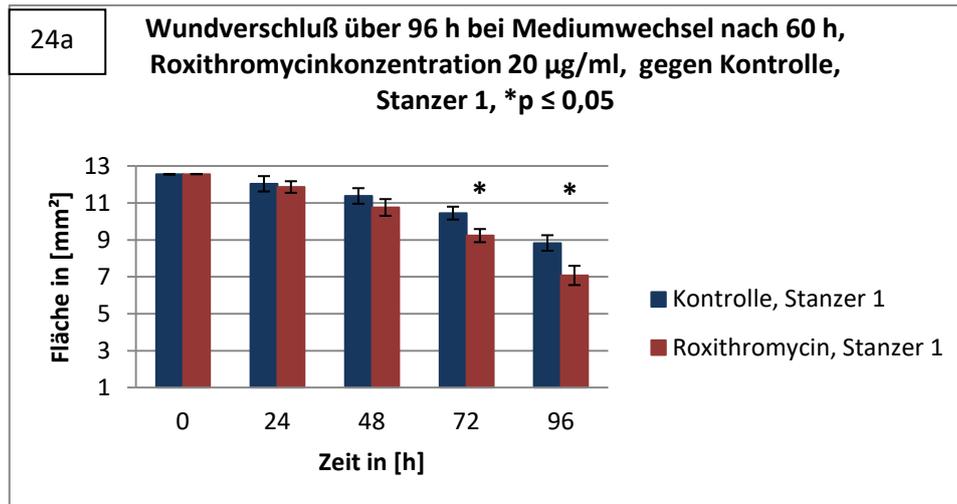


Abbildung 24a und 24b: Entwicklung der residualen Wundfläche von S9-Zellen über 96 h bei Wundsetzung durch zwei Experimentatoren (Stanzer 1 und Stanzer 2). 24a: Entwicklung der residualen Wundfläche medikamentös nicht behandelter S9-Zellen und roxithromycinbehandelter S9-Zellen bei Wundsetzung durch Stanzer 1. 24b: Entwicklung der residualen Wundfläche medikamentös nicht behandelter S9-Zellen und roxithromycinbehandelter S9-Zellen bei Wundsetzung durch Stanzer 2. Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichung. Statistische Signifikanz * entspricht $p \leq 0,05$.

Tabelle 31: Auswertung Mann-Whitne-U-Test für Stanzer 1. Roxithromycin gegen Kontrolle. Testung des Signifikanzniveaus $p \leq 0.05$. Darstellung p-Wert, z-score und U-value an den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 Stunden für die Roxithromycinkonzentration 20 µg/ml.

1	z-score	p- value, errechnet	U- Value	signifikant
24 h	1,04	0,14917	7,0	Nein
48 h	1,25	0,10565	6,0	Nein
72 h	2,30	0,01072	1,0	Ja
96 h	1,78	0,03754	3,5	Ja

Tabelle 32: Auswertung Mann-Whitney-U-Test für Stanzer 2. Roxithromycin gegen Kontrolle. Testung des Signifikanzniveaus $p \leq 0.05$. Darstellung p-Wert, z-score und U-value an den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 Stunden für die Roxithromycinkonzentration 20 $\mu\text{g/ml}$.

2	z-score	p- value, errechnet	U- Value	signifikant
24 h	0,17	0,94	7,5	Nein
48 h	2,30	0,01072	1,0	ja
72 h	-2,65	0,00402	0,0	Ja
96 h	2,51	0,01208	0,0	Ja

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt des Makrolids Roxithromycin auf die postoperative Wundheilung anhand eines etablierten Modells an respiratorischen Epithelzellen in vitro untersucht werden. Im Lauf des Experimentes wurde zusätzlich ein neuer methodischer Aspekt ersichtlich, welcher als neuer Einflußfaktor auf die Ergebnisse angesehen werden muss.

Wenige Untersuchungen zur Wirkweise des Medikamentes bei Akutsituationen am Epithel sind publiziert. Eine protektive Wirkung am respiratorischen Epithel in vitro und bei Ratten nach Senfgasexposition konnte demonstriert werden. Dabei konzentrierte sich der Effekt auf eine verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-8) und Inhibierung von induzierten Synthesen. Zudem konnte eine verbesserte Makrophagenfunktion in vitro gezeigt werden^{83, 84, 85}.

Am intestinalen Epithel in vitro wurde eine signifikante Hemmung der NF- κ B DNA-Bindungskapazität und -Phosphorylierung nachgewiesen, was in einer verminderten IL-8 Expression resultierte. Zudem wurde ein Eingriff in den Streßhaushalt des endoplasmatischen Retikulums mittels Inhibierung der Markerproteine CHOP, XBP1, p-eIF-2 α , and p-JNK gezeigt⁸⁶. Auch im Asthma-Mausmodell konnte durch kurzzeitige Roxithromycingabe eine Hemmung der NF- κ B-Kaskade reproduziert werden⁸⁷. Andere Arbeitsgruppen erkannten makroskopische, mikroskopische und immunologische Veränderungen nach 10-tägiger Roxithromycinapplikation im Kolutismodell bei IL-10-defizienten Mäusen durch reduzierte Interferon-Gammafreisetzung⁸⁸.

In-vitro konnte auch ein hemmender Einfluss auf die Expression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) nachgewiesen werden^{89, 90}. VEGF ist ein wesentlicher TNF-Alpha induzierter Faktor der Neo-Angiogenese.

Weitere Untersuchungen bestätigten den hemmenden Einfluss auf VEGF, Zellproliferation und Beeinflussung des Zellzyklus⁹¹. Eine antiproliferative Wirkung wurde ebenfalls durch Hemmung von transforming growth factor B1 (TGF-B1) postuliert⁹².

In vivo wurde die Suppression von IL-2B, TGF-B und VEGF bei der Untersuchung von Gingiva- Flüssigkeit nach Einnahme von Roxithromycin über wenige Tage gezeigt ⁷¹.

Weitere in vivo Untersuchungen an Rhinosinusitis- Erkrankten, Asthmatikern, zur Behandlung von Bronchiektasien oder der diffusen Panbronchiolitis liefen unter mehrwöchiger Roxithromycingabe und konnten eine Depletion von Neutrophilen, Eosinophilen sowie Reduktion von IL-8, IL-1 und Matrixmetalloproteinasen zeigen ^{93, 94,95,96, 97, 98}.

Vor dem Hintergrund der multipel beschriebenen anti-inflammatorischen Wirkung von Roxithromycin stellte sich die Frage, ob bereits die Anwendung in der frühen postoperativen Phase mit einem Benefit in der Wundheilung einhergeht. Dies ist insbesondere im HNO-Bereich interessant, da Wunden hier sekundär heilen.

4.1. Methodik: Der Einfluss der Experimentierenden auf den Wundver- schluß

In den vorliegenden Proteom-Untersuchungen wurde der Effekt einer Verwundung auf respiratorisches Epithel mittels S9-Zellen unter Einfluss des Makrolids Roxithromycin untersucht. Um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die Experimentierenden zu untersuchen, wurde ein methodisches Experiment durchgeführt, in dem zwei identische Sets von zwei voneinander unabhängigen Experimentierenden bearbeitet wurden. Dabei war die Wundsetzung durch zwei Personen die einzige Variable des Experiments. Im Anschluss erfolgte die verblindete Auswertung durch zwei weitere unabhängig voneinander arbeitende Personen sowie einen Experimentierenden. Für dieses Experimentdesign betragen die ICCs für roxithromycinbehandelte Zellen bei Wundsetzer Eins 0,989, für die Kontrolle 0,97. Für den zweiten Wundsetzer betragen die Koeffizienten für roxithromycinbehandelte Zellen 0,998 und für die Kontrolle 0,989. Dies sind exzellente Werte, die einen negativen Effekt der Testsubstanz ausschließen und die Güte des Modells stark belegen. Für eine Beeinflussung der Testergebnisse durch die auswertenden Personen ergab sich kein Hinweis. Der ICC beträgt 0,862 zwischen beiden Wundsetzenden. Dies ist in jedem Fall ein akzeptabler Koeffizient, dennoch deutet sich hier eine Varianz zwischen den Experimentierenden an und korreliert mit unseren Beobachtungen während der Durchführung der Experimente. Aufgefallen war, dass je nach „Druckstärke“

der Stanze nicht nur der gewünschte Monolayer aus der Zellkulturschale entfernt wurde, sondern auch die Zellkulturschale selber beschädigt wurde. Im Verlauf der Fotodokumentation zeigte sich insbesondere an diesen Stellen ein verlangsamtes und nicht konzentrisches Wachstum, sodass die Beschädigung der Plastiksicht als Wachstumshindernis angesehen werden kann.

Betrachtet man die Wundverschlusskurven der beiden Experimentierenden, so fällt auf, dass die residuale Wundfläche bei Wundsetzer Zwei kleiner ist als bei Wundsetzer Eins, ebenso verhält es sich bei den Kontrollen. Dennoch produzierten beide Experimentierende statistisch signifikante Ergebnisse.

Als Konsequenz für alle weiteren Wund- Experimente sollten diese immer von einer Person durchgeführt werden. Falls dies aufgrund der Größe des Experimentes nicht möglich ist, wäre auch eine Randomisierung zwischen Therapiegruppen möglich und auf eine ausreichende Schulung vor Beginn des Experimentes zu achten.

Zum Zeitpunkt der Zellkulturversuche für das DIGE-Experiment und zur Konzentrationsfindung war diese Erkenntnis noch nicht vorhanden. Retrospektiv lassen sich die diskrepanten residuellen Wundflächen der Bioreplikate in den nicht zytotoxischen Roxithromycinkonzentrationen durch den Einfluß des Experimentierenden aber gut erklären. Für die Proteomanalyse werten wir die Unterschiede in der Residualfläche nicht als kritisch.

Die Vorteile einer reproduzierbaren, etablierten Wunde überwiegen, wie bereits von Roth et al ⁷⁶, Beule et al ⁷⁵ und Lendeckel et al ⁹⁹ gezeigt wurde.

4.2. Proteomanalyse der medikamentös unbeeinflussten Wundheilung von S9-Epithelzellen

An der Nasenschleimhaut findet der erste Kontakt zwischen respiratorischem Epithel und der Umwelt statt. Daher ist eine effektive, koordinierte Antwort auf Verletzungen essenziell. Aktuelle Publikationen zum vertiefenden Verständnis der Wundheilung an der Nasenschleimhaut liegen vor¹⁰⁰. In dieser Arbeit wurden die molekularbiologischen Veränderungen an der physiologischen Wunde zwar aufgrund des Experimentdesigns mituntersucht, diese sind aufgrund der Fülle der Daten jedoch nur als aktuelle Bestandsaufnahme zu verstehen. Zur detaillierten Betrachtung wird auf weitere Dissertationen aus unserer Arbeitsgruppe verwiesen (Kunze, Denise).

4.3. Konzentrationsabhängige, antiproliferative Wirkung von Roxithromycin im Wundversuch

Im Wundexperiment führte die Roxithromycinbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe in Konzentrationen von 10 und 20 µg/ml eher zu einer beschleunigten Wundheilung von Epithelzellen, während Konzentrationen von 80 und 160 µg/ml zu einer Hemmung der Wundheilung führten. Die Effekte waren jeweils über die ganze Beobachtungsdauer und im Ausmaß zunehmend nachweisbar und korrelieren mit den Ergebnissen des vorab durchgeführten AlamarBlue-Vitalitätstests (s. Kap. 3.1.).

Roxithromycin in einer Konzentration von 160 µg/ml konnte die Zellproliferation 96 Stunden nach Wundsetzung so stark hemmen, dass die residuale Wundfläche anstieg. Als Folge zeigte sich die residuale Wundfläche statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe vergrößert. Die getestete Konzentration 40 µg/ml führte in einem Replikat zur beschleunigten, im zweiten Replikat zu einer nicht signifikant langsameren Wundheilung der S9-Zellen gegenüber der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind weitgehend kongruent zur vorliegenden Literatur, wenngleich in vitro Studien an respiratorischem Epithel quantitativ den Studien an mesenchymalen Zellen unterlegen sind.

Der Grenzwert zur antiproliferativen Wirkung ist nach Zellart verschieden. So reagieren in vitro humane coronary artery smooth muscle cells (CASMC) konzentrationsabhängig bereits bei 1 oder 10 µg/ml mit einer reduzierten Proliferation durch Beeinflussung von Zellzyklus regulierenden Proteinen sowie Inhibierung des NF-κB Pathways¹⁰¹.

In vivo reagieren Hepatozyten (HepG2-Zelllinie) der Maus ab einer Konzentration von 100 µmol/L (entspricht 84 µg/ml) Roxithromycin mit einer dosisabhängigen Inhibierung des Zellwachstums⁸⁹. Nicht jedoch bei 24-stündiger Roxithromycinbehandlung bei Konzentrationen kleiner 50 µmol/L (42 µg/ml)¹⁰². Dabei wurde ein Eingriff in die Neoangionese via VEGF-Blockade⁸⁹ bzw. eine reduzierte endotheliale Zellmigration und Gefäßbildung bei Konzentrationen größer 20 µmol/L (16,8 µg/ml)¹⁰² als pathophysiologischer Mechanismus diskutiert.

Bei Lymphomzellen liegt die Inhibitionsschwelle bei Konzentrationen größer 50 µmol/L (42 µg/ml)¹²⁰.

Bereits in niedrigen Konzentrationen (0,1 - 10,0 µg/ml) konnte ein dosisabhängiger Roxithromycin-Effekt auf die TGF-Beta Produktion von HM-Zellen (human mesangial cells) in vitro beobachtet werden ohne Induktion eines Zellschadens¹⁰³.

Eine konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion bei Neutrophilen wurde ebenso beschrieben¹⁰⁴.

Zusammenfassend zeigen sich zell- bzw. gewebespezifische Reaktionen. Im in vivo-Modell zeigt sich tendenziell eine höhere Toleranz als im in vitro-Modell. Die in dieser Studie genutzten Roxithromycinkonzentrationen von 10 µg/ml und 20 µg/ml zeigten übereinstimmend mit der zu dieser Fragestellung begrenzt verfügbaren Literatur mikroskopisch und im AlamarBlue-Vitalitätstest keine Proliferationshemmung der S9-Zellen.

4.4. Apoptose-Induktion durch höhere Konzentrationen von Roxithromycin (20 und 40 µg/ml)

Sowohl in der 24-stündlichen mikroskopischen Begutachtung der S9-Zellen über 120 Stunden als auch in der Vitalitätstestung mit Alamar Blue ergab sich für die Roxithromycinkonzentrationen von 20 µg/ml und 40 µg/ml kein Hinweis auf eine antiproliferative, pro-apoptotische bzw. zytotoxische Wirkung des Medikamentes.

In der Auswertung der Wundexperimente konnte die getestete Dosis im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe die Wundheilung teilweise signifikant beschleunigen (ab 72 Stunden) oder blieb unsignifikant unter dem Wachstum der Kontrolle.

Interessanterweise konnten in der molekularbiologischen Aufarbeitung der mit einer Roxithromycinkonzentration von 20 µg/ml bzw. 40 µg/ml behandelten S9-Zellen für den Erntezeitpunkt 24 Stunden Hinweise auf Apoptoseinduktion durch Induktion des proapoptotischen Proteins BAX (Bcl-2-like protein 4, foldchange +2,2 bzw. +2,5) und Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials gefunden werden. Ein weiteres Schlüsselprotein der mitochondrialen Apoptose, APAF-1, war nach 24-stündiger Roxithromycinbehandlung mit 40 µg/ml über den Faktor 1,56 ebenfalls hochreguliert.

Unterschiedlichste Stimuli können zur Apoptose (gerichteter Zelltod) führen. Sie münden via intrinsischen Weg in die Freisetzung von vorher mitochondrial lokalisiertem Cytochrom c ins Zytoplasma. Dort wird es in Anwesenheit von ATP an APAF-1 (apoptotic protease-activating factor 1) gebunden und es kommt zur Ausbildung eines Apoptosoms, welches zur Aktivierung von Pro-Caspase 9 und der Caspase-Kaskade führt¹⁰⁵. Nachgewiesen werden konnte die reduzierte Expression der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase (COX5A, foldchange -1,2 bei beiden Konzentrationen), sowie eine Induktion von Caspase 3 (foldchange +1,3) und 7 (foldchange +1,28) konzentrationsunabhängig.

In vitro an Zellen glatter Muskulatur des oberen Respirationstraktes ist ein konzentrationsabhängiger, zytotoxischer Roxithromycineffekt nach 48-stündiger Behandlung durch Apoptoseinduktion belegt. Roxithromycin induzierte dosisabhängig eine Depolarisation der Mitochondrienmembran, Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol sowie Expression von Caspase 3 und 9. Die Zell-Proliferation war bei Roxithromycinkonzentrationen von 25 – 100 µg/ml supprimiert¹⁰⁶.

An Lymphomzellen wurde eine dosisunabhängige Beschleunigung von Zelltod und erhöhter Expression von Caspase 3 bei den untersuchten Konzentrationen 10 µg/ml und 50 µg/ml herausgearbeitet¹⁰⁷. Zudem konnte eine Induktion von Fas-Ligand durch Roxithromycinbehandlung und damit einhergehende Caspaseaktivierung und Apoptose nachgewiesen werden¹⁰⁸.

In dieser Arbeit gelang sowohl bei einer Roxithromycinkonzentration von 20 µg/ml als auch bei 40 µg/ml mittels LC-MS-Analyse die Detektion des Moleküls FADD (FAS-associated death domain protein), welches bei der Bindung der Caspasen an den FAS-Rezeptor eine Rolle spielt und proapoptotisch wirkt. Für die Konzentration 20 µg/ml beträgt der Faktor -1,2 und für die Roxithromycinkonzentration 40 µg/ml -1,3. Durch vermehrte Bindung an den Rezeptor erklärt sich der erhöhte Verbrauch und konsekutiv geringerer Nachweisbarkeit von freiem FADD. Bei der getesteten Roxithromycinkonzentration von 10 µg/ml konnten diese Moleküle in der Aufarbeitung der signifikant veränderten Proteine nicht nachgewiesen werden.

Somit fügt sich diese Arbeit ein in den Teil der publizierten Literatur, welche eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Apoptose durch Roxithromycin bestätigen.

Einen Überblick über die Apoptoseinduktion durch Roxithromycin gibt folgende Abbildung (s. Abb. 28). Anschließend zeigen die Abbildungen 29a und 29b mittels IPA generierte Netzwerke für die Roxithromycinkonzentrationen 20 µg/ml (29a) und 40 µg/ml (29b) nach Filterung der apoptoserelevanten und signifikant regulierten Proteine aus den LCMS- Versuchen (LC- Gradient 135 Minuten, Zeit 24 Stunden, keine Wunde).

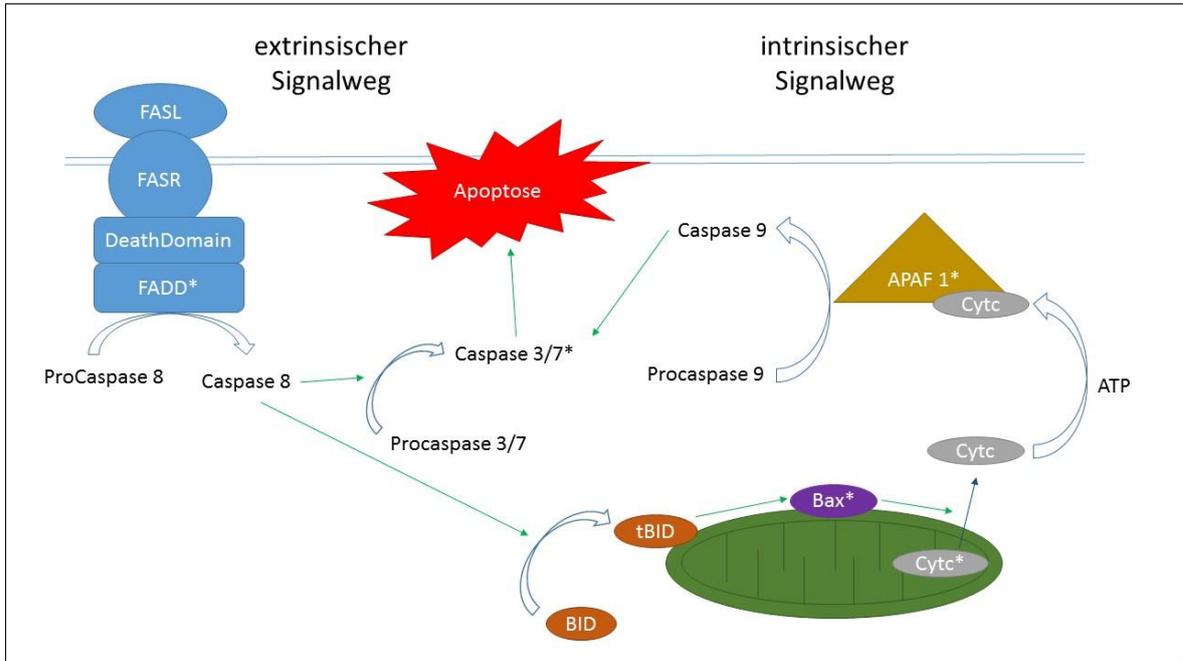
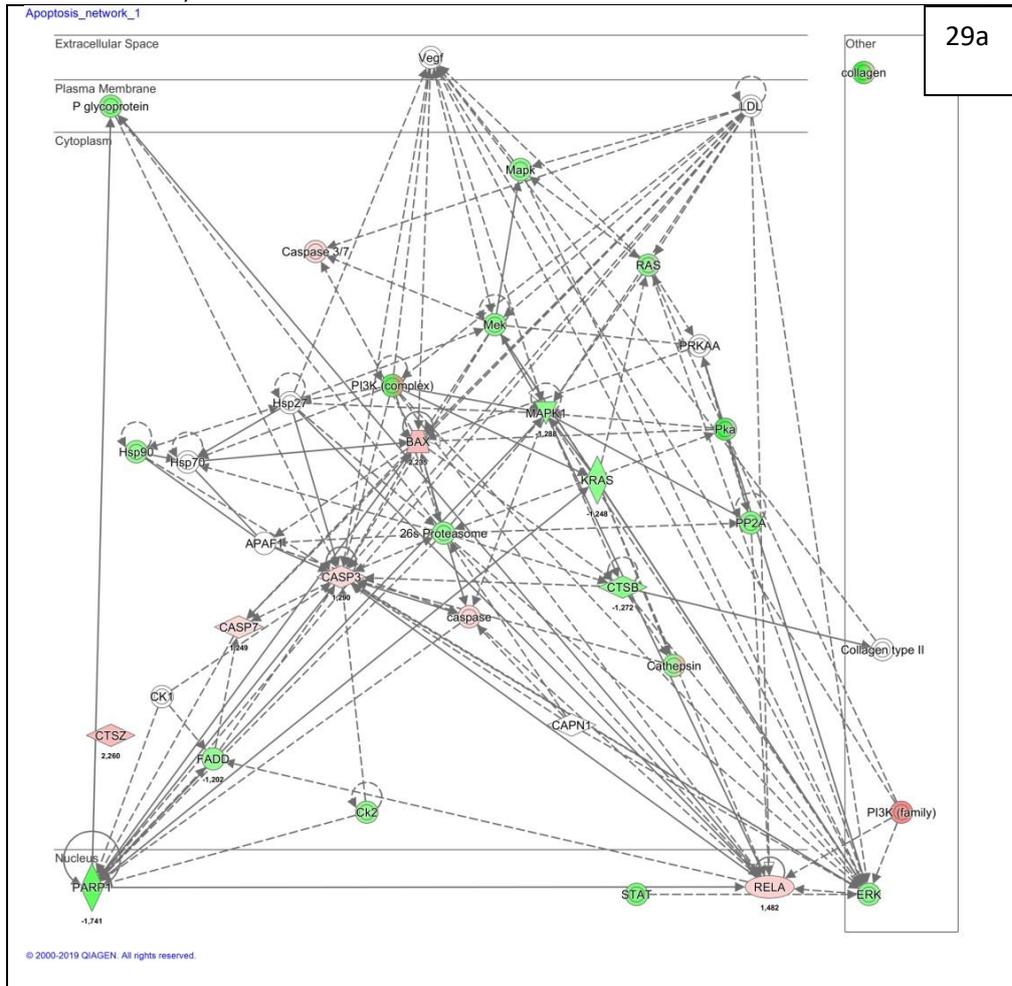


Abbildung 28: Beeinflussung des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges durch Roxithromycin. Mit * markiert sind nachgewiesene und quantifizierte Proteine (modifiziert nach Croft et al¹⁰⁹, Pistritto et al¹¹⁰ und Xu et al¹¹¹).



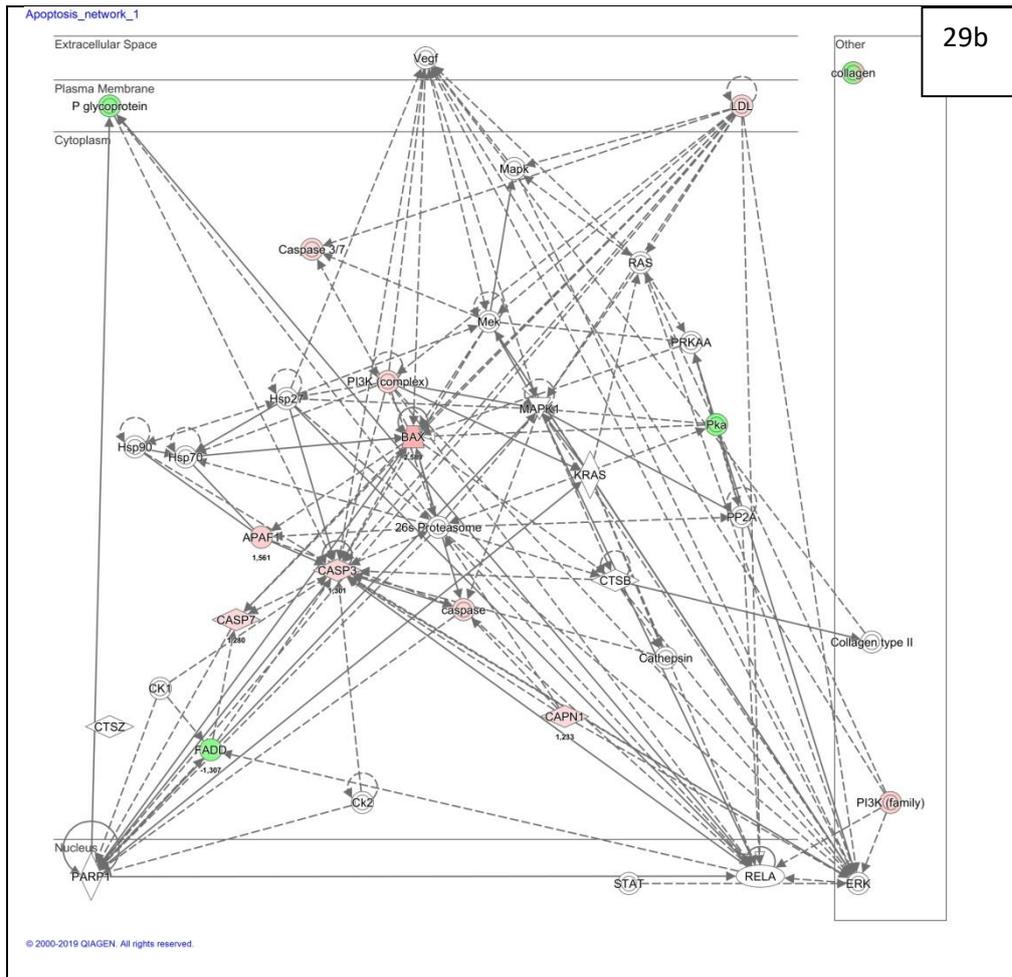


Abbildung 29a und 29b: Mittels IPA generierte Netzwerke für den Apoptosepathway für die getesteten Roxithromycinkonzentrationen 20 µg/ml (29a) und 40 µg/ml (29b) nach 24 Stunden Inkubationszeit ohne Wunde. Gefiltert wurden apoptoserelevante, signifikant regulierte Proteine. Rot markiert sind Proteine mit erhöhter, grün dargestellt Proteine mit erniedrigter Menge.

4.5. Roxithromycin beeinflusst den ERK1/2-Pathway

Wir haben einen konzentrationsabhängigen Apoptoseeffekt als Folge der Roxithromycinbehandlung von S9-Zellen herausgearbeitet. Die Vermutung bestand, dass dieser Effekt durch einen Eingriff in den ERK1/2-Pathway zustande kommt.

MAP-Kinasen bilden ein Signalnetzwerk, das auf mannigfaltige extra- und intrazelluläre Stimuli reagiert und eine große Rolle bei Zellproliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung spielt^{112–114}. Unterfamilien sind die extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) und die p38 MAPK^{115,116}.

ERK induziert beispielsweise die Expression von IL-8 und NF- κ B in humanen Bronchialepithelzellen¹¹⁷⁻¹¹⁹ und ist in die Kontrolle der Zellproliferation involviert und erforderlich um den Transit von der G1- in die S-Phase während des Zellzyklus zu bewältigen^{116, 121}.

Bei der Roxithromycinkonzentration 20 μ g/ml offenbarte sich nach 24 Stunden eine verminderte Expression beteiligter Moleküle des ERK1/2- Pathways mit Nachweis von MAPK1 (Mitogen-activated protein kinase 1) bzw. ERK2 (foldchange -1,28) sowie deren aktivierender Kinase MEK2 (Mitogen activated protein kinase kinase 2, foldchange -1,3). Einen Überblick über die beteiligten und nachgewiesenen Moleküle gibt folgende Abbildung (s. Abb. 30).

Publiziert ist für Clarithromycin durch Hemmung von ERK eine zeitabhängige Verminderung der IL-8-Expression sowie Induktion eines Zellzyklusarrestes an humanen Bronchialepithelzellen^{122,123}.

An Lymphomzellen konnte gezeigt werden, dass Roxithromycin dosisabhängig die Phosphorylierung von ERK und konsekutiv den Signalweg nach 24 Stunden hemmt und zu einer Reduktion der Zellproliferation führt¹²⁴.

In vitro führte eine Roxithromycinbehandlung zur Reduktion der VEGF-induzierten Zellproliferation an glatten Muskelzellen des Respirationstraktes und Induktion eines Zellzyklus-Arrestes durch Hemmung der ERK1/2-Aktivierung und des VEGF-Rezeptors⁹¹. Ebenso wurde an Zellen glatter Muskulatur in vitro eine Reduktion der TGF-Beta 1 induzierten Aktivierung von ERK1/2 sowie Proliferationshemmung nach Roxithromycinapplikation (c= 100 μ g/ml) demonstriert⁹². In vitro gelang an kultivierten Zellen aus Nasenpolypen der Nachweis, dass eine Erythromycinbehandlung zur Apoptoseinduktion durch Hemmung des ERK-Pathways führt¹²⁵.

Eine Dosisabhängigkeit konnten wir in unseren Versuchen nicht zeigen. Weder für die getesteten Konzentrationen 40 μ g/ml noch 80 μ g/ml gelang der Nachweis signifikanter Moleküle nach 24 Stunden. Kritisch anzumerken ist die Verwendung unterschiedlicher Zelltypen und Nachweisverfahren in der publizierten Literatur. Aufgrund des Studiendesigns ist es an dieser Stelle nicht möglich, die phosphorylierte von der dephosphorylierten Form der Kinasen zu unterscheiden. Um dies herauszuarbeiten sind weiterführende Versuche, z. Bsp. Westernblots gegen phosphorylierte Isoformen oder spezifische

massenspektrometrische Anwendungen mit angereicherten phosphorylierten Peptiden nötig.

Unter Würdigung der Kontextdaten dieser Arbeit (beispielsweise mittels IPA generierte Topfunktionen) findet sich für die Roxithromycinkonzentration von 20 µg/ml in Einklang mit einer Hemmung des ERK-Pathways eine Beeinflussung von Zelltod, Zellproliferation und Migration (s. Tab. 24 und 27).

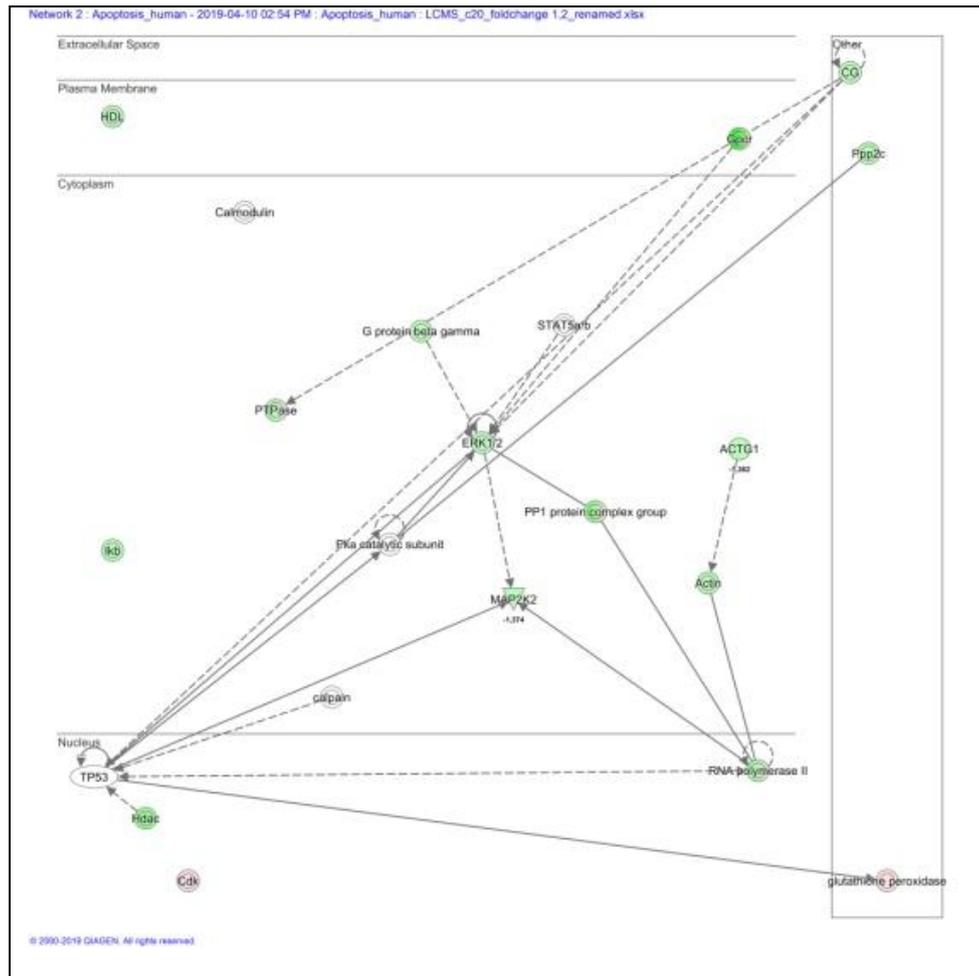


Abbildung 30: Mittels IPA generiertes Netzwerk für ERK-regulierte Proteine für die Bedingung Roxithromycin (c= 20 µg/ml) gegen Kontrolle ohne Wunde bei 24 Stunden. Grün dargestellt sind supprimierte nachgewiesene Proteine, rot dargestellt sind hochregulierte nachgewiesene Moleküle.

Folgende Abbildung fasst die in der Literatur beschriebene Beeinflussung des ERK-Pathways durch Makrolide zusammen und markiert den vermuteten Angriffspunkt für eine Roxithromycininteraktion (s.Abb. 31):

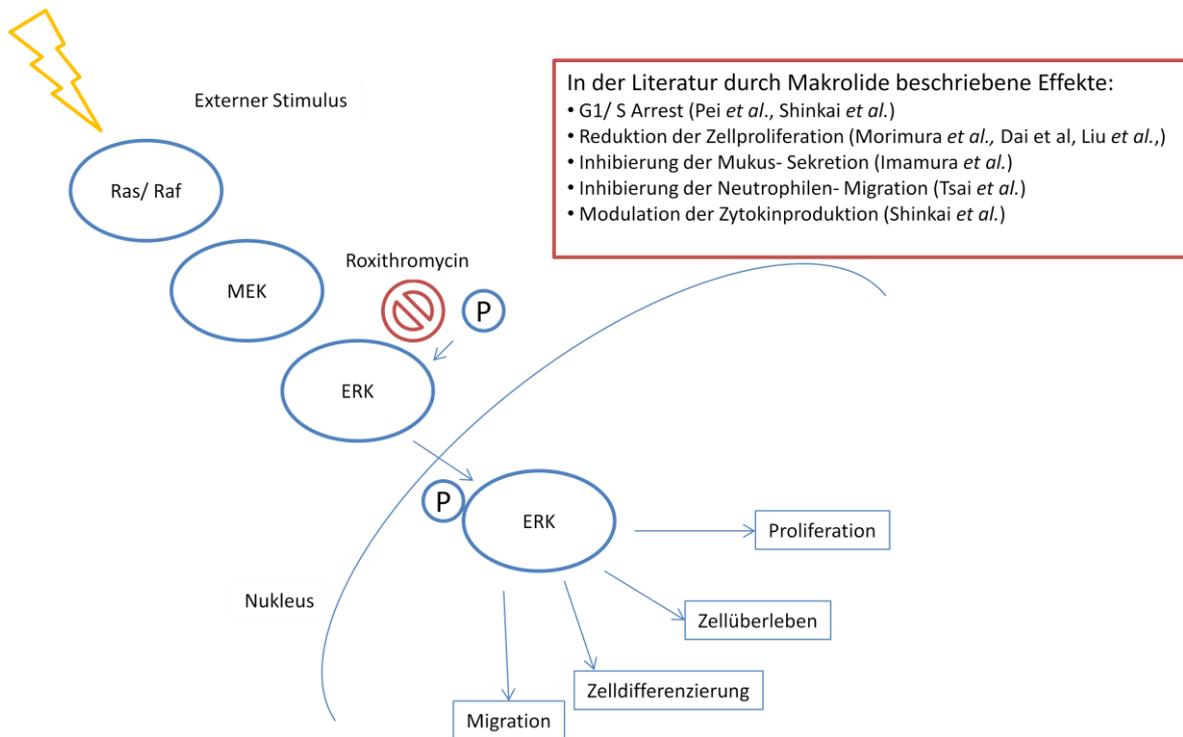


Abbildung 31: Darstellung des ERK- Pathways (blau) und in der Literatur sowie experimentell durch Roxithromycin belegte Beeinflussung durch Makrolide (rot), (Darstellung ERK-Pathway modifiziert nach Shaul *et al*¹²⁶ und Wu *et al*¹²⁷).

4.6. Roxithromycin und oxidativer Streß

Bei der Auswertung der durch Roxithromycin beeinflussten Reaktionswege zeigte sich für die Zeitpunkte 0 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden für die getestete Konzentration von 10 µg /ml im DIGE- Experiment, sowie für die Konzentrationen 20 µg/ml, 40 µg/ml und 80 µg/ml nach 24 Stunden im LCMS-Versuch der Nrf2-vermittelte Signalweg beeinflusst.

Unter physiologischen Bedingungen fallen ständig reaktive Stoffwechselnebenprodukte an (ROS, z.Bsp H₂O₂), welche zelluläre Makromoleküle schädigen können¹²⁸. Reicht die Kapazität der endogenen Antioxidantien nicht aus, die reaktiven Substrate abzubauen, resultiert oxidativer Streß¹²⁹. Erhöhter oxidativer Streß ist in der Pathogenese der COPD (chronic obstructive pulmonary disease), Cystischen Fibrose oder des ARDS (acute respiratory distress syndrome) beschrieben^{130,131}. Bekannt ist, dass Nrf2 bei COPD-Patienten reprimiert ist¹³².

Nuclear erythroid-related factor 2 (Nrf2) ist als ein wesentlicher Transkriptionsfaktor in die Reaktion auf oxidativen Streß eingebunden und kontrolliert die Expression einer Vielzahl an Antioxidantien und Detoxifizierungsenzymen bis hin zu Molekülen des Proteasoms. Ist die Zelle oxidativem Streß ausgesetzt, dissoziiert Nrf2 von seinem cytoplasmatisch gebundenem Repressor Protein (Keap1), gelangt in den Nukleus, bindet dort an die sog. ARE-Region (antioxidant response Region) und aktiviert zytoprotektive Gene ¹³³.

Die Nrf2-assoziierten antioxidativ wirkenden Enzyme umfassen unter anderem: die beiden Untereinheiten der Glutamat-Cystein-Ligase ¹³⁴, welche essentiell für die de novo Glutathion-Synthese ist. Zudem Antioxidantien, welche ROS direkt inaktivieren können, wie z. Bsp. Superoxiddismutasen (SOD 1-3), Katalase ¹³⁵⁻¹³⁷, Glutathion Peroxidase ¹³⁸ und Glutathion-Reduktase sowie sog. Phase 2-Enzyme, die zur Biosynthese bzw. Recycling oder Abbau von oxidierten Metaboliten beitragen, wie z. Bsp. die Glutathion-S-transferasen und Thioredoxinreduktase ¹³⁹.

Einen Überblick über die Nrf2-Effektoren gibt folgende Abbildung 32 (modifiziert nach ¹⁴⁰).

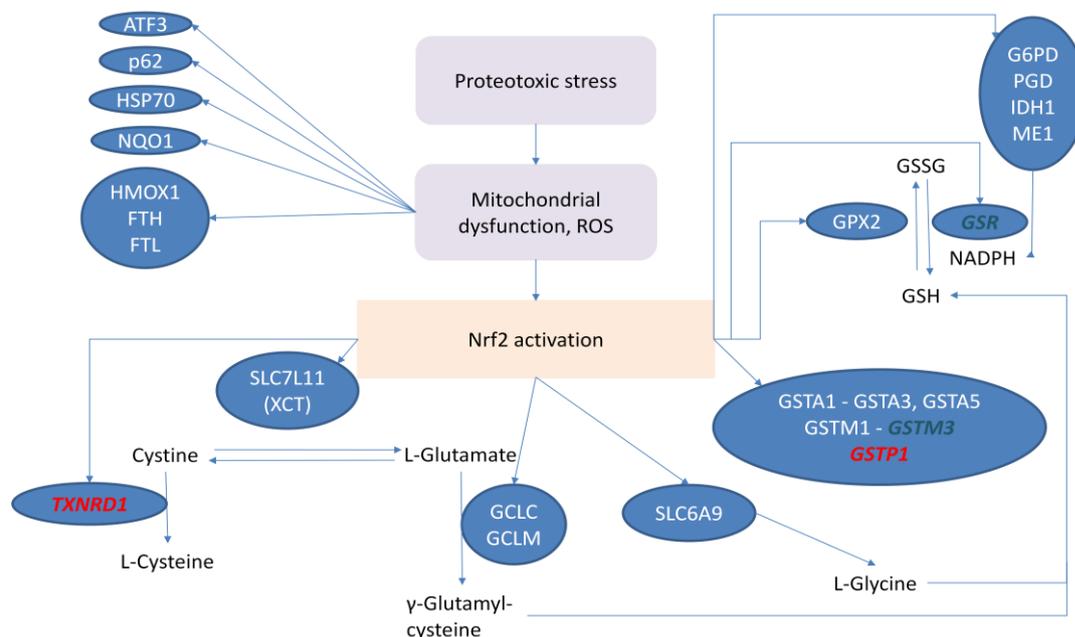


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Nrf2-vermittelten Effektoren mit Markierung der in den Experimenten gefundenen Proteine. Rot markiert sind die im DIGE-Experiment nachgewiesenen Proteine, in grüner Schrift erscheinen die mittels LCMS gefundenen Proteine (modifiziert nach Zhao et al, 2017¹⁴⁰).

Eine Vielzahl der durch Nrf2 beeinflussten Moleküle konnten wir sowohl bei der Roxithromycinkonzentration 10 µg/ml im DIGE-Experiment nachweisen, als auch in den

LCMS-Versuchen über 24 Stunden bei Konzentrationen von 20 µg/ml und 40 µg/ml. Eine vollständige Liste der nachgewiesenen Proteine für jede Konzentration und Bedingung findet sich im Anhang.

Interessanterweise ergaben sich nur geringe Überschneidungspunkte zwischen den gewählten Konzentrationen und Untersuchungsmethoden. Insgesamt 3 Proteine konnten in beiden Analysen für die gewählte Roxithromycinkonzentration 10 µg/ml nachgewiesen werden. Folgendes Venn Diagramm stellt die Überschneidung zwischen DIGE-Experiment und LCMS-Analyse dar (s. Abb. 33a). Es handelt sich um Aktin G (ACTG1), heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 (HSP90AA1) und Superoxiddismutase 1 (SOD1), im Anhang findet sich die entsprechende Proteintabelle. Vergleichend dazu zeigt sich im VENN- Diagramm für die Roxithromycinkonzentrationen 20 µg/ml und 40 g/ml zum Einen eine deutliche höhere Proteinanzahl als auch eine größere Schnittmenge (18 Proteine) bereits nach 24-stündiger Behandlung ohne Wundsetzung (s. Abb. 33b).

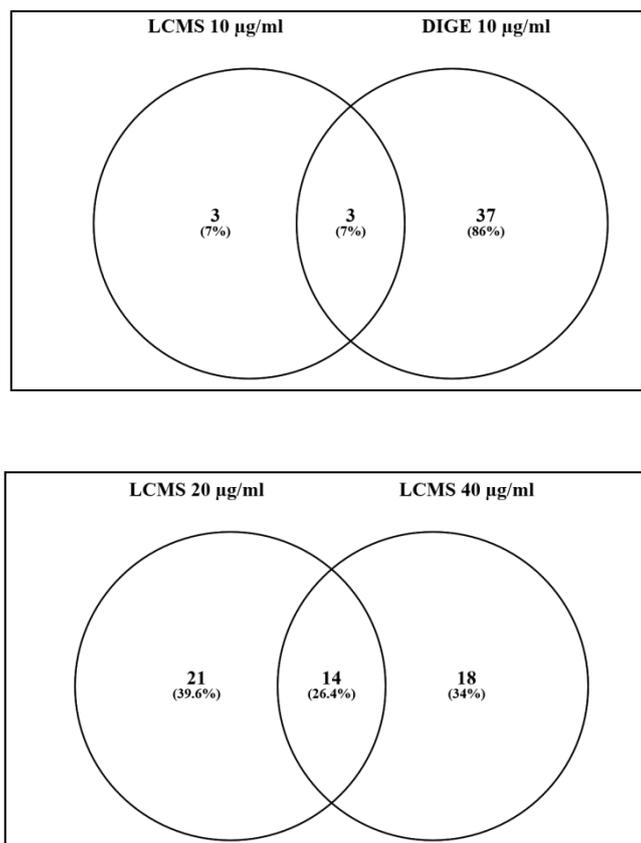


Abbildung 33a und 33b: **33a** Darstellung der nachgewiesenen Nrf2-vermittelten Proteine für das DIGE-Experiment (insgesamt 40) und die LCMS-Analyse für die Bedingung Roxithromycin 10 µg/ml, keine Wunde und Erntezeitpunkt 24h, kurzer Gradient (insgesamt 6 Proteine), Schnittmenge 3 Proteine. **33b** Darstellung der nachgewiesenen Nrf2-vermittelten Proteine der LCMS-Analysen für die Bedingungen Roxithromycin 20 µg/ml (35 Proteine) und 40 µg/ml (32 Proteine), keine Wunde und Erntezeitpunkt 24h, langer Gradient, Schnittmenge 18 Proteine.

Bei der Analyse der nachgewiesenen Proteine fällt auf, dass die Phase I Enzyme wie Superoxidismutase 1 und 2 sowie Glutathion- Reduktase teilweise reprimiert sind, während Katalase exprimiert wird. Glutathion Peroxidase wurde nicht nachgewiesen.

Auch bei den Phase II- Enzymen zeigt sich ein heterogenes Bild; während die Transferase kappa1 vermehrt synthetisiert wird, sind sowohl Transferase mu3 als auch omega 1 runterreguliert.

Die dazu publizierte Datenlage ist ebenfalls nicht einheitlich, wenngleich die Mehrheit der veröffentlichten Literatur zu Veränderungen auf mRNA-Ebene Stellung nimmt. Zudem gilt es, die unterschiedlichen genutzten Zellkulturen/Gewebetypen sowie die Zeitebene zu würdigen.

Beispielsweise konnte im Rattenmodell mit induzierter Kolitis nach 24 Stunden belegt werden, dass Roxithromycin dosisabhängig zu einer Normalisierung von Glutathionspiegeln nach Säurestimulation führt ¹³⁵. Ebenfalls am Rattenmodell konnte Roxithromycin bei induzierter Hepatokanzerogenese einen hemmenden Einfluß auf die ROS-Produktion und oxidativen Streß sowie die NF-κB-Aktivierung nach 7-wöchiger Behandlung ausüben ¹⁴¹.

Andere Veröffentlichungen hingegen konnte für Roxithromycin in vitro an humanen peripheren Blut Lymphozyten für die untersuchten Zeitpunkte 24 und 48 Stunden und diverse Konzentrationen (25, 50, 100 und 200 µg/ml) keine toxischen oder oxidativer Streß-vermittelte Effekte nachweisen ¹⁴².

In vitro am respiratorischen Epithel führte Erythromycin nach Stimulation mit Wasserstoffperoxid nach 36 Stunden zu einer Abschwächung der IL-8-Expression; nach 48 Stunden zeigte sich jedoch eine Hemmung der Wasserstoffperoxid-inhibierten Glutathionspiegel ¹⁴³.

Eine ähnliche Kinetik wurde für Clarithromycin in vitro an respiratorische Epithelzellen (SAEC) beschrieben. Während eine Behandlung mit niedrigen Konzentrationen (1 oder 5 µM) 72 Stunden vor Stimulation mit Wasserstoffperoxid zu einer reduzierten NF-κB-Aktivität, IL-8 mRNA-Expression und erhöhter Nrf2 mRNA-Expression führte, wurden diese Veränderungen nicht bei hoher Dosis (10 µM) oder kurzer Vorbehandlungszeit (24 und 48 Stunden) beobachtet ¹⁴⁴.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nach 72-stündiger Vorbehandlung mit niedrig dosiertem Clarithromycin (1 und 5 μM) die Wasserstoffperoxid-induzierte Reduktion von Glutathion Peroxidase 1, Glutathion Reductase, Superoxiddismutase, Katalase und Hemoxygenase auf mRNA-Ebene gehemmt wird.

Behandlung mit Clarithromycin in hoher Dosis (10 μM) führte nicht dazu, sondern zu einer Wasserstoffperoxid-induzierten Hemmung der Phosphorylierung von ERK, was zu einer Reduktion der Zellviabilität führte ¹⁴⁵.

Eine aktuelle Arbeit zeigte in vitro im Wundmodell an Epithelzellen und Fibroblasten eine Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Roxithromycin in niedriger Dosis (2,5 $\mu\text{g/ml}$) ¹⁴⁶.

In Einklang mit der publizierten Literatur kann somit postuliert werden, dass der Zeitpunkt 24 Stunden nach Wundsetzung und Therapiebeginn für die Untersuchung des oxidativen Streßes nur bedingt geeignet ist. Die von uns gewählte Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ ist an die maximale Serumkonzentration in vivo angelehnt und daher unproblematisch, weil nach 24 Stunden Disulfidbrücken-bedingte Proteinfehlfaltungen bereits reduziert sind (durch z.Bsp Thioredoxinreduktase, Glutathion- Peroxidase und Glutathion-Reduktase), sowie fehlgefaltete Proteine bereits nachsynthetisiert wurden. Hinweise für eine Depletion der Zellviabilität oder Zytotoxizität ergaben sich bei dieser Konzentration nicht. Erklärbar wäre die konzentrationsabhängige Zytotoxizität von Roxithromycin unter anderem durch die Beeinflussung der Zellhomöostase durch Hemmung der Phosphorylierung von ERK und Akkumulation von freien Radikalen.

Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre die Untersuchung auf Proteom- und Transkriptomenebene 72 Stunden nach Behandlung mit Roxithromycin in niedriger Konzentrationen bzw. Durchführung der Wundsetzung 72 Stunden nach Behandlung mit Roxithromycin in verschiedenen Konzentrationen zur Validierung der bereits gut dokumentierten Makrolideffekte auf die Expression von Nrf2 und Antioxidantien.

Interessant ist, dass wir bei höheren Roxithromycinkonzentrationen (20 $\mu\text{g/ml}$ und 40 $\mu\text{g/ml}$) bereits nach 24 Stunden Hinweise auf eine Beeinflussung des ERK-pathways und Apoptoseinduktion gefunden haben.

Aufgrund der deutlichen Hinweise, dass oxidativer Streß bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von chronischen Lungenerkrankungen eine Rolle spielt und dieser

durch Makrolide beeinflusst werden kann, sind weitere Untersuchungen hierzu sinnvoll
147–150

4.7. Beeinflussung von Zelladhäsion, Migration, Angiogenese und Zell-Matrix-Kontakten

Obwohl in den getesteten Roxithromycinkonzentrationen 20 µg/ml und 40 µg/ml molekulare Hinweise auf Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion gefunden wurden, ergab sich mikroskopisch und im durchgeführten Alamar-Blue-Zytotox-Assay dafür kein Anhalt, bzw. sogar eine zum Teil signifikant beschleunigte Wundheilung (s. Abb. 10 und 11a, 11b). Die Vermutung bestand daher, dass der schnellere Wundverschluss in einer Induktion von Proteinen begründet ist, welche für die Migration von Zellen, Angiogenese, Zell-Interaktion – oder Adhäsion verantwortlich sind. Im Folgenden wird diese Möglichkeit anhand ausgewählter signifikant regulierter Proteine erörtert.

Die Behandlung mit Roxithromycin in einer Konzentration von 20 µg/ml über 24 Stunden führte beispielsweise zu einer erhöhten Expression des Proteins SPARC (secreted protein, acidic, cysteine-rich) auf den Faktor 1,99 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Für die Roxithromycinkonzentration 40 µg/ml ist SPARC um den Faktor 2,08 exprimiert. Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein, welches Zell-Matrix-Kontakte reguliert ¹⁵¹. In vitro konnte an Fibroblasten durch Ausschalten von SPARC eine Hemmung der Zellmigration aber keine Beeinflussung der Zellproliferation nachgewiesen werden ¹⁵². In vitro und in vivo wurde anhand der cornealen Wundheilung ein proliferationsfördernder Effekt sowie Beeinflussung der Zellmigration durch SPARC nachgewiesen ^{153,154}.

Alveolarepithel, welches in vitro einer standardisierten Wundsetzung unterzogen wurde, zeigte eine schnellere Wundheilung, wenn dem Kulturmedium SPARC zugesetzt war. Bei einem konfluenten Monolayer führte SPARC jedoch zu einer Disorganisation der tight junctions und Einschränkung der Barriereintegrität des Epithels ¹⁵⁵.

Gemeinsam mit dem reprimiert gefundenen Thrombospondin 1 (TSP1) wird SPARC zu den antiadhäsiven Proteinen („counteradhesive proteins“) zugeordnet. Die Moleküle beeinflussen in Reaktion auf diverse Stimuli (wie z. Bsp eine Gewebeverletzung) Zell-Zell-

Kontakte in humanen Lungenendothelien via Phosphorylierung von Zonula adhaerens Proteinen und ermöglichen Zellmigration und Wundkontraktion ¹⁵⁶. Thrombospondin 1 tritt bereits im Frühstadium der Wundheilung in Erscheinung und ist ein wichtiger Aktivator für TGF-Beta ¹⁵⁷. Zudem erhöht Thrombospondin 1 in vitro die Zellmigration und führt zur Umorganisation fokaler Adhäsionskontakte, während in konfluenten, vollkommen adherenten Zellen profibrotische Effekte über Kollagenstimulation beschrieben sind ¹⁵⁸. Im Mausmodell führte Thrombospondin 1 zu einer schnelleren cornealen Wundheilung ^{159,160}, wohingegen für vaskularisierte Gewebe ein antiangiogenetischer und wundheilungsbehindernder Effekt beschrieben ist durch Inhibierung von VEGF ¹⁵⁵. Publiziert wurde ebenfalls eine Hemmung der Angiogenese durch Bindung an Fibroblasten Growth factor 2 (FGF2), welcher auch in dieser Arbeit signifikant negativ (-1,38) reguliert gefunden wurde ¹⁶³. Passend zur publizierten Literatur fanden wir die mit Thrombospondin interagierenden Liganden Vitronectin (VTN) und die zur Integrinfamilie gehörende Integrin-linked Kinase (ILK) ebenfalls in reduzierter Proteinmenge ¹⁵⁶.

In vitro wurde vielfach nachgewiesen, dass Thrombospondin 1 die Zellproliferation inhibiert und Seneszenz fördert sowie eine Blockade des Signalweges in vitro die Proliferationsfähigkeit erhält ¹⁶⁴.

Folgende Grafik zeigt ein mit Hilfe von IPA generiertes Netzwerk zur Illustration der induzierten Proteine im Kontext von Zellmigration, Zelladhäsion und Angiogenese. (s. Abb. 32)

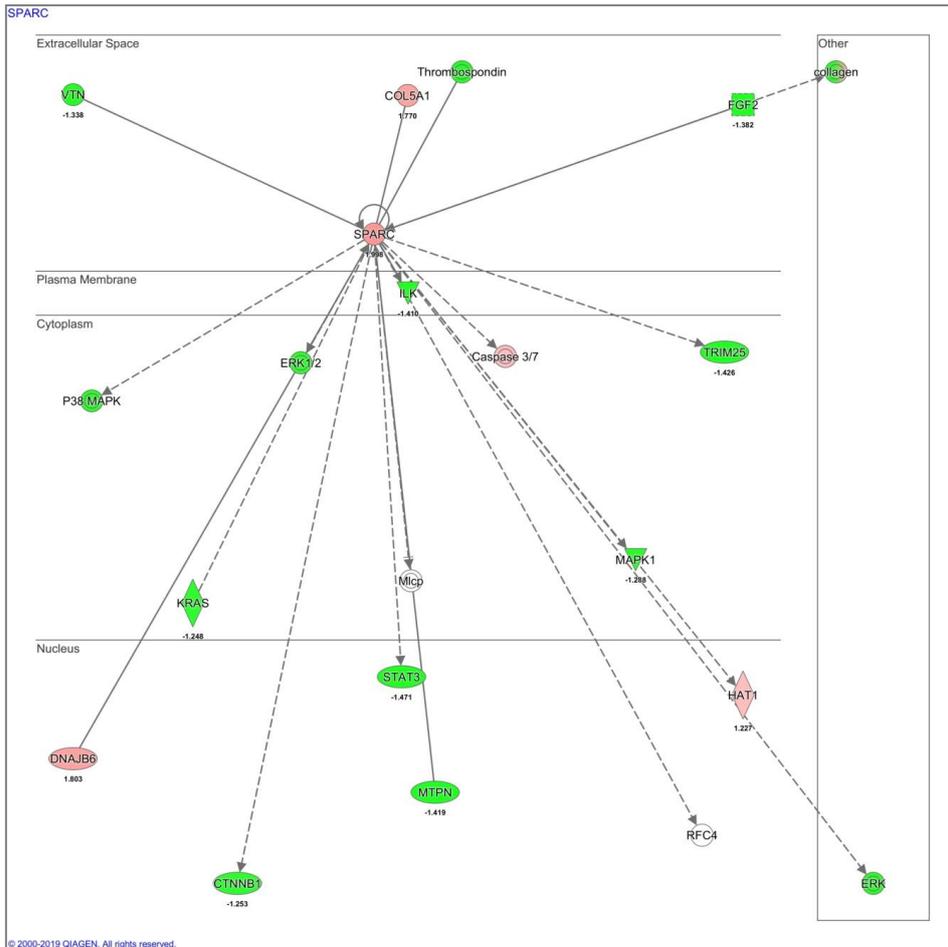


Abbildung 32: Mittels IPA generiertes Netzwerk für die Bedingung Roxithromycin ($c = 20 \mu\text{g/ml}$) gegen Kontrolle ohne Wunde bei 24 Stunden mit SPARC als zentralem Protein. Zusammengefasst sind Proteine, welche Zellmigration, Zelladhäsion und Angiogenese beeinflussen. Grün dargestellt sind supprimierte nachgewiesene Proteine, rot dargestellt sind hochregulierte nachgewiesene Moleküle.

In Übereinstimmung zur publizierten Literatur zeigte sich bei der getesteten Roxithromyckonzentration von 20 µg/ml nach 24 Stunden eine signifikante Supprimierung von ICAM 1 (intercellular adhesion molecule 1, foldchange -2,9)¹⁶⁵. Bei der Roxithromyckonzentration 40 µg/ml wurde ICAM 1 nach 24 Stunden über den Faktor 1,28 hochreguliert. Für humane umbilicale Endothelzellen ist nach hochdosierter Gabe von Erythromycin (6250 mg/l) in vitro nach 24 Stunden ebenfalls eine Hochregulation von ICAM 1 beschrieben und als sterile Inflammation gewertet worden¹⁶⁶. Wohingegen Erythromycin in vitro an humanen Bronchialepithelien die Freisetzung von ICAM 1 behinderte¹⁶⁷.

ICAM 1 ist in vielen Geweben kontinuierlich exprimiert und wird in Reaktion auf einen Cytokinstimulus vermehrt produziert^{168,169}. Das Protein zählt zu den Adhäsionsmolekülen und ist an respiratorischen Epithelzellen gemeinsam mit IL-8 unter anderem für das Rekrutment von Leukozyten verantwortlich¹⁷⁰ und bei an Rhinosinusitis Erkrankten regelhaft erhöht¹⁷¹. Außerdem ist es Rezeptor für eine Vielzahl von Rhinoviren^{172, 173}. Das Nicht-Antibiotika Makrolid EM900 führte in vitro an humanen Tracheal- und Nasenepithelzellen zu einer ICAM 1 Reduktion und verminderten Sekretion von IL-6 und IL-1Beta nach Infektion mit Rhinoviren¹⁷⁴. In vivo konnte nach zweimonatiger Erythromycinbehandlung von Rhinosinuspatienten eine Verminderung von ICAM 1 und IL-8 aus gewonnenem nasalen Aspirat gezeigt werden, woraus ebenfalls ein Effekt auf das Neutrophilen- Recruitment abgeleitet wurde¹⁷⁵.

Nachgewiesen ist auch seine Rolle bei der Metastasierung und Kanzerogenese von Lungenkarzinomen, wobei eine erhöhte ICAM 1-Expression mit geringerer Tumordifferenzierung und erhöhtem Lymphknotenbefall assoziiert war^{176,177}. ICAM 1 begünstigt dabei die Angiogenese und verhindert die Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem¹⁷⁸.

Daten zur Wundheilung an der intestinalen Mukosa verdeutlichen eine ICAM 1-abhängige Migration von Neutrophilen an die apikale (verletzte) Zellseite und Induktion der Zellproliferation und Wundverschluß durch Beeinflussung des Aktin- and Beta-catenin-Signalweges¹⁷⁹. Analog konnte an einem epidermalen Wundmodell eine prolongierte Heilung unter Elimination von ICAM 1 gezeigt werden¹⁸⁰.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte des Weiteren eine zeitabhängige Induktion der Proteinmenge von PAFAH1B2 (Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta) bei niedrig dosierter Roxithromycinbehandlung (10 µg/ml) nachgewiesen werden (s. Kap.3.5, Abb.16). Dieses Molekül inaktiviert PAF (Platelet-activating factor), einen starken Lipid- und Entzündungsmediator, der in Reaktion auf Inflammation etc. entweder enzymatisch de novo oder durch Remodeling in vielen Zelltypen synthetisiert wird¹⁸¹⁻¹⁸³. PAFAH scheint durch einen Feedbackmechanismus überschießende Inflammation zu verhindern und durch den Abbau der Phospholipide oxidativen Streß zu reduzieren¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. In Studien konnte gezeigt werden, dass Makrolide die membrandestabilisierende Wirkung von Phospholipasen (wie z.Bsp. PAF) abschwächen^{187,188}.

Nachgewiesen werden konnte, dass die orale Gabe von Roxithromycin zu einer signifikanten Verbesserung der durch PAF induzierten ziliären Dysfunktion und erhöhten epithelialen Permeabilität an der Hasentrachea führt¹⁸⁹.

In vitro und in vivo wurde an Alveolarmakrophagen eine dosisabhängige Hemmung der LPS-induzierten inflammatorischen Zytokinproduktion (TNF, IL-8, PGE, PCA) nach Inkubation mit rekombinanten PAFAH nachgewiesen^{190,191}.

Lokale Applikation von rekombinatem PAFAH führte in vivo am Hasen- und Rattenmodell unter anderem zu einer reduzierten Inflammation und geringeren Neointimabildung 7 Tage nach standardisierter Carotisverletzung. Die Autoren fanden zudem eine verminderte Expression des proinflammatorischen Zytokins ICAM 1 und inhibierte Makrophageninfiltration in den PAFAH-behandelten Tieren, sodass in Zusammenschau ein dämpfender Einfluss auf verletzungsinduzierte Inflammation beschrieben wurde¹⁹².

Zusammenfassend ergeben sich Hinweise, dass Roxithromycin die Wundheilung an S9-Epithelzellen in vitro durch Einwirkung auf Mediatorproteine für Zelladhäsion, Zellmigration und Zell-Matrix-ontakte beeinflusst. Vertiefende Analysen zur Validierung des Roxithromycineffektes bieten sich an.

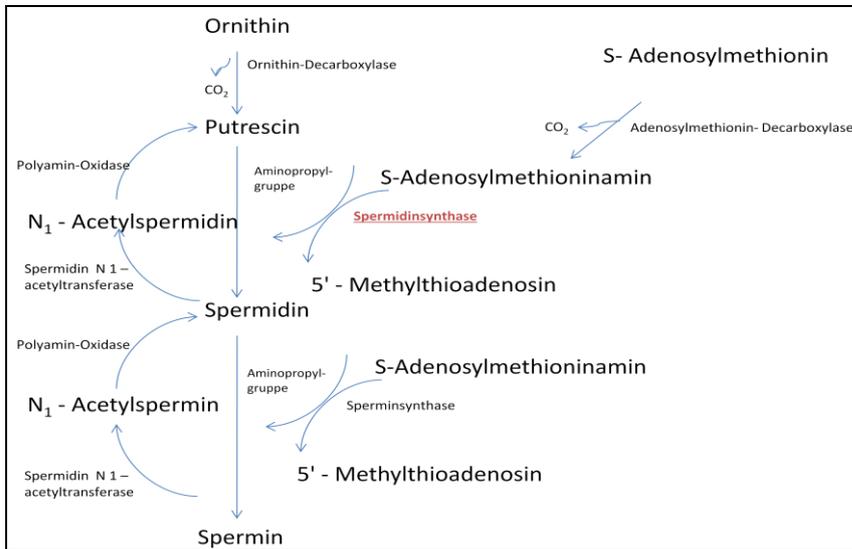
4.8. Proteinmodifikation und Induktion von Spermidin-Synthase durch niedrig-dosierte Roxithromycinbehandlung

Einzig für die Roxithromycinkonzentration 10 µg/ml wurde im DIGE- Experiment in den medikamentenabhängigen Bedingungen eine signifikante Induktion des Enzyms Spermidin-Synthase über den gesamten Experimentverlauf gefunden (s. Abb.15).

Dieser Effekt konnte zunächst durch 1D-Westernblots nicht bestätigt werden (s. Abb.19). Die Möglichkeit eines Färbeartefarktes oder einer massenunabhängigen Modifikation innerhalb des Proteins wurde diskutiert. Es folgte ein 2D-Westernblot für die Bedingung Roxithromycin gegen Kontrolle mit Wunde zum Erntezeitpunkt 24 Stunden. In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen des DIGE-Experimentes konnte eine Hochregulation von Spermidin-Synthase um den Faktor 1,44 errechnet werden (DIGE-Experiment 1,39), (s. Abb. 20). Das DIGE-Experiment wurde in 4 technischen Replikaten durchgeführt, um eine sichere statistische Auswertung zu ermöglichen. Durch die Validierung mittels 2D-Westernblot konnte somit ein farbstoffabhängiger Bias ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde im 2D-Westernblot gezeigt, dass Spermidin-Synthase in mehreren Spots nachgewiesen wurde und eine Massen- sowie IP-Verschiebung innerhalb dieser Spots im 1D-Westernblot nicht sicher erkannt werden konnte.

Spermidin zählt zu den Polyaminen. Hierbei handelt es sich um natürlich vorkommende Polykationen, die unersetzlich für Zellwachstum und effektives Zellrecycling sind. Sie interagieren mit einer Vielzahl negativ geladener Moleküle (DNA, RNA, Lipide) und sind daher an vielen Regulationsmechanismen beteiligt ¹⁹³⁻¹⁹⁶. Folgende Grafik illustriert zunächst die Polyaminsynthese (s. Abb. 33).

Abbildung 33: Schematische Darstellung der Polyaminbiosynthese. Rot markiert ist die im Experiment induzierte Spermidinsynthese (modifiziert nach Casero und Pegg, 2009¹⁹⁷ und Minois et al, 2011¹⁹⁸).



Gut dokumentiert ist der erhöhte Polyamingehalt in proliferierendem Gewebe^{199,200}, wohingegen die Hemmung der Ornithin-Decarboxylase durch z.Bsp α -difluoromethylornithin (DFMO) zu einer Zytostase führt²⁰¹. Weitreichend publiziert ist die Rolle von Spermidin bei der Induktion von Autophagie als wichtiger Mechanismus der Zellhomöostase und Langlebigkeit von Zellen^{193,195,196}.

Studien konnten zeigen, dass durch Hemmung der Spermin- und Spermidinsynthese in vitro Apoptose induziert und die Zellproliferation gehemmt wird²⁰².

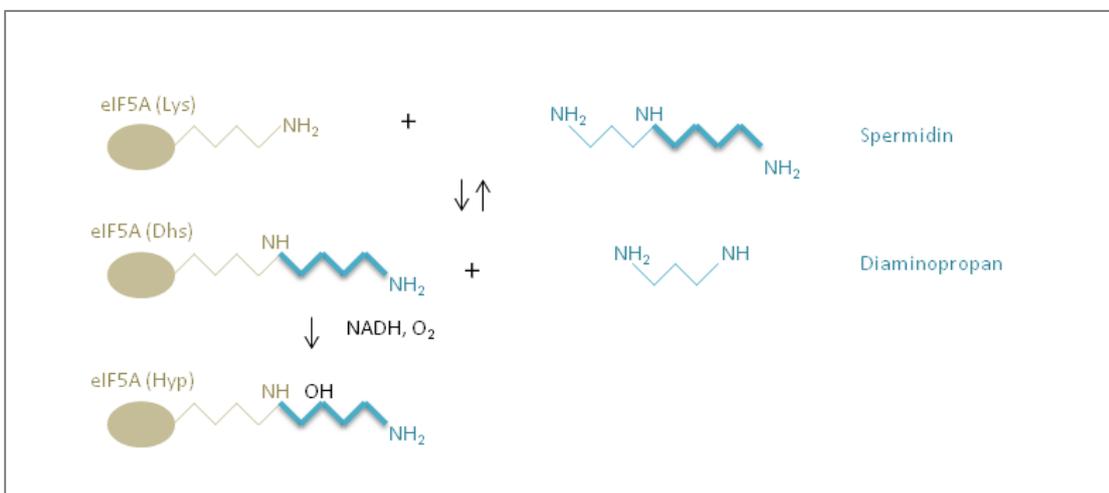
Neuere Untersuchung ergaben, dass viele dieser Effekte (Zellmigration, Zellproliferation, Autophagie und Zellzyklusregulation) über hypusiniertes EIF5A vermittelt werden und erhöhte Spiegel in Tumorzellen vorkommen²⁰³⁻²⁰⁶. Spermidin fungiert als Aminobutyl-Gruppen Spender für EIF5A. Durch diese als Hypusinierung bezeichnete (bis dato) singular in EIF5A vorkommende posttranslationale Modifikation erfolgt die Aktivierung des Moleküls^{207,208}. EIF5A ist ein wichtiger Regulator der Translationselongation²⁰⁹, die Hemmung der Hypusinierung führt zu Wachstumsarrest in proliferierenden Zellen^{210,211}.

Die Vermutung bestand daher, dass die erhöhte Spermidinsynthese auch zu einer vermehrten Produktion von hypusiniertem EIF5A führt. Mittels 2D-Westernblot wurde eine Induktion (Faktor +1.5) von EIF5A für die Roxithromycinkonzentration von 10 μ g/ml nachgewiesen. Dies unterstreicht zum Einen den in der Literatur publizierten Zusammenhang zwischen Spermidin als Aminobutyl-Gruppen Spender für EIF5A, steht in

Einklang mit der experimentell nachgewiesenen verbesserten Wundheilung an S9-Zellen unter niedrig dosierter Roxithromycinbehandlung und zeigt hierbei auch die Grenzen der angewendten Methodik^{212,213}. Erst durch Verifizierung im 2D-Westernblot konnte der Zusammenhang durch die Darstellung der Modifikationen durch Verschiebung des pI und zum Teil des Molekulargewichts dieser Proteine im 2D- Gel gezeigt werden.

Folgende Abbildung stellt die Reaktion zwischen Spermidin und EIF5A dar (s. Abb. 34).

Abbildung 34: Schematische Darstellung der Hyposinierung von EIF5A (beige). Übertrag der Aminobutylgruppe von Spermidin (türkis) auf den Lysinrest von EIF5A (modifiziert nach Park, 2006²¹⁴).



Interessanterweise liegt EIF5A bei höheren Roxithromycinkonzentrationen (40µg/ml) in erniedrigter Proteinmenge vor, kongruent dazu wurde die Spermidin-Synthase für diese Bedingung auch nicht mehr nachgewiesen.

Möglicherweise führt der Einsatz von Roxithromycin in niedriger Konzentration (10 µg/ml) zu einer Induktion von Spermidinsynthese und darüber hinaus zu einer erhöhten Verfügbarkeit von hypusiniertem EIF5A. Dies könnte eine Erklärung für die verbesserte Wundheilung beim Einsatz von niedrigeren Roxithromycinkonzentrationen sein und verdient in jedem Fall weitere Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des Makrolid-Antibiotikums Roxithromycin auf die frühe Phase der postoperativen Wundheilung am Zellkulturmodell untersucht werden. Gründe für den Einsatz des Medikamentes sind abseits der bekannten bakterios-tatischen Wirkung insbesondere die in der Langzeitanwendung beschriebenen immunmodulatorischen Effekte. Es sollte untersucht werden, ob diese bereits in der Akutsituation zu einem Benefit in der Wundheilung im HNO-Bereich führen, da Wundheilung hier sekundär verläuft und Wundheilungsstörungen durch Fibrosierungen und Restenosen nicht selten zu einer operativen Korrektur zwingen.

Gewählt wurden S9-Zellen als Modell für respiratorisches Epithel, welche einer standardisierten Wundsetzung durch Stanzung unterzogen wurden. Mittels AlamarBlue-Assay wurden zytotoxische Medikamentenkonzentrationen herausgearbeitet und im Folgenden durch Konzentrationsfindungsversuche über 120 Stunden mit kombinierter Wundsetzung bestätigt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe beschleunigt Roxithromycin in Konzentrationen von 10 µg/ml, 20 µg/ml und 40 µg/ml eher die Wundheilung, während Konzentrationen von 80 µg/ml und 160 µg/ml zu einer signifikanten ($p \leq 0.01$ bzw. $p \leq 0.05$) Hemmung der Wundheilung führen. Die Effekte waren jeweils über die ganze Beobachtungsdauer und im Ausmaß zunehmend nachweisbar. Roxithromycin in einer Konzentration von 160 µg/ml konnte die Zellproliferation 96 und 120 h nach Wundsetzung so stark hemmen, dass die residuale Wundfläche sogar anstieg.

In einem Validierungsansatz konnte zudem herausgearbeitet werden, dass die Wundsetzung konsequenterweise von nur einem Experimentierenden erfolgen sollte, um ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten, während sich kein Unterschied in der Auswertung der Wundflächen durch verschiedene Untersucher zeigte.

Zum Verständnis der molekularbiologischen Effekte des Medikamentes auf Epithelzellen wurden unter Berücksichtigung der in der Literatur beschriebenen maximalen Serumkonzentration bei systemischer Anwendung von Roxithromycin ($7,28 \pm 1,85$ mg/l), fehlenden Hinweisen auf einen zytotoxischen Effekt sowie tendenziell beschleunigter Wundheilung nachfolgend 2D-DIGE-Experimente gekoppelt mit massenspektrometrischen Proteiniden-

tifikationen für die Roxithromycinkonzentration von 10 µg/ml durchgeführt. Es ergaben sich Hinweise auf eine Förderung des Zellwachstums durch Beeinflussung des Polyaminmetabolismus über Induktion der Spermidinsynthese und darüber hinaus Spermidin-abhängige Modifikation des Translationsfaktors EIF5A. Des Weiteren wurde eine Nrf2-assoziierte Antwort auf oxidativen Streß bereits bei niedriger Roxithromycin-Konzentration von 10 µg/ml als protektiver Faktor ermittelt. Durch quantitative LC-MS/MS-Analysen wurde dieser Effekt ebenso für Konzentrationen von 20 und 40 µg/ml Roxithromycin bestätigt. Der weitläufig dokumentierte konzentrationsabhängige zytotoxische Effekt des Medikamentes bei höheren Konzentrationen konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Während apoptoseauslösende Proteine in der Konzentration von 10 µg/ml nicht nachgewiesen werden konnten, gelang in höheren Roxithromycin-Konzentrationen eine Darstellung von regulierten Proteinen des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges, bis hin zur bereits mikroskopisch erfassbaren Zelldepletion bei Konzentrationen von 80 und 160 µg/ml. Insbesondere bei der Konzentration von 20 µg/ml fanden sich Hinweise, dass eine Regulation über den ERK1/2-Pathway stattfindet, welcher umfangreiche Funktionen wie Zytokinfreisetzung, Zellmigration, Zellproliferation und auch Zelltod moderiert.

Die Behandlung mit Roxithromycin führt in niedriger Konzentration (10 µg/ml) tendenziell zu einer beschleunigten Wundheilung ohne Auftreten zytotoxischer Effekte. Grundlage könnte die Aktivierung von Translationsfaktoren (EIF5A) und Protektion vor den Schäden durch oxidativen Streß sein. Damit stellt diese Therapie eine Option in der frühen postoperativen Situation im HNO-Bereich dar, welche allerdings weiterer Untersuchung z. B. durch Testung an Fibroblasten bedarf. Attraktiver erscheint das Outcome bei einer Medikamentenkonzentration von 20 µg/ml, da die epitheliale Wundheilung signifikant schneller abläuft und somit zu einem schnelleren Wundverschluß führt. Die molekularbiologischen Hinweise auf Induktion der Apoptose werden bei dieser Konzentration offenbar noch durch protektive Mechanismen über Beeinflussung der Zellmigration, Neutralisierung von Schäden durch oxidativen Streß und Eingriff in den ERK-Pathway aufgefangen, was bei höheren Roxithromycinkonzentrationen nicht mehr gelingt und in einer Zelldepletion mündet. Daher bietet sich für die Konzentration von 20 µg/ml insbesondere die topische Applikation als Salbenstrang oder Nasenspray an, um die positiven Effekte zu

nutzen und die Limitation durch vorheriges Erreichen der maximalen Serumkonzentration zu umgehen. Empfehlenswert ist die Untersuchung des Medikamentes in weiteren Zellreihen und in vivo da Wundheilung ein multimodaler Prozeß ist. Eine topische Applikation von ggf. höheren lokalen Konzentrationen scheint hier keinen zusätzlichen Nutzen darzustellen.

6. Literaturverzeichnis

1. MCGUIRE, J. M. *et al.* [Ilotycin, a new antibiotic]. *Schweiz Med Wochenschr* **82**, 1064–1065 (1952).
2. HARRIS, D. R., MCGEACHIN, S. G. & MILLS, H. H. THE STRUCTURE AND STEREOCHEMISTRY OF ERYTHROMYCIN A. *Tetrahedron Lett* **11**, 679–685 (1965).
3. Kurath, P., Jones, P. H., Egan, R. S. & Perun, T. J. Acid degradation of erythromycin A and erythromycin B. *Experientia* **27**, 362 (1971).
4. Bryskier, A. Roxithromycin: review of its antimicrobial activity. *J. Antimicrob. Chemother* **41 Suppl B**, 1–21 (1998).
5. Gasc, J. C., d'Ambrieres, S. G., Lutz, A. & Chantot, J. F. New ether oxime derivatives of erythromycin A. A structure-activity relationship study. *J. Antibiot* **44**, 313–330 (1991).
6. Champney, W. S. & Burdine, R. Macrolide antibiotics inhibit 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* **39**, 2141–2144 (1995).
7. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920–930 (2000).
8. Green, R. & Noller, H. F. Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem* **66**, 679–716 (1997).
9. Gartner, T. K. & Orias, E. Effects of mutations to streptomycin resistance on the rate of translation of mutant genetic information. *J. Bacteriol* **91**, 1021–1028 (1966).
10. Monro, R. E. Catalysis of peptide bond formation by 50 S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol* **26**, 147–151 (1967).
11. Cundliffe, E. & McQuillen, K. Bacterial protein synthesis: the effects of antibiotics. *J. Mol. Biol* **30**, 137–146 (1967).
12. Yonath, A., Leonard, K. R. & Wittmann, H. G. A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstruction. *Science* **236**, 813–816 (1987).

-
13. Milligan, R. A. & Unwin, P. N. Location of exit channel for nascent protein in 80S ribosome. *Nature* **319**, 693–695 (1986).
 14. Cervin, A. & Wallwork, B. Macrolide therapy of chronic rhinosinusitis. *Rhinology* **45**, 259–267 (2007).
 15. Piromchai, P., Thanaviratananich, S. & Laopaiboon, M. Systemic antibiotics for chronic rhinosinusitis without nasal polyps in adults. *Cochrane Database Syst Rev* **5**, CD008233 (2011).
 16. Head, K. *et al.* Systemic and topical antibiotics for chronic rhinosinusitis. in *Cochrane Database of Systematic Reviews* (John Wiley & Sons, Ltd, 2016).
 17. Cervin, A. & Wallwork, B. Efficacy and safety of long-term antibiotics (macrolides) for the treatment of chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* **14**, 416 (2014).
 18. Li, X., Wang, M., Liu, G., Ma, J. & Li, C. Association of macrolides with overall mortality and cardiac death among patients with various infections: A meta-analysis. *Eur. J. Intern. Med.* **28**, 32–37 (2016).
 19. Lassman, H. B., Puri, S. K., Ho, I., Sabo, R. & Mezzino, M. J. Pharmacokinetics of roxithromycin (RU 965). *J Clin Pharmacol* **28**, 141–152 (1988).
 20. Puri, S. K. & Lassman, H. B. Roxithromycin: a pharmacokinetic review of a macrolide. *J. Antimicrob. Chemother* **20 Suppl B**, 89–100 (1987).
 21. Pechère, J. C. Clinical evaluation of roxithromycin 300 mg once daily as an alternative to 150 mg twice daily. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* **15**, 111S–117S (1992).
 22. Wise, R., Kirkpatrick, B., Ashby, J. & Andrews, J. M. Pharmacokinetics and tissue penetration of roxithromycin after multiple dosing. *Antimicrob. Agents Chemother* **31**, 1051–1053 (1987).
 23. Andrews, J. M., Ashby, J. P. & Wise, R. Factors affecting the in-vitro activity of roxithromycin. *J. Antimicrob. Chemother* **20 Suppl B**, 31–37 (1987).

-
24. Bergogne-Bérézin, E. Tissue distribution of roxithromycin. *J. Antimicrob. Chemother* **20 Suppl B**, 113–120 (1987).
 25. Akamatsu, H. & Horio, T. Concentration of roxithromycin in the lesions of acne vulgaris. *J. Int. Med. Res* **29**, 537–540 (2001).
 26. Kropec, A., Schmidt-Eisenlohr, E. & Daschner, F. D. Concentrations of roxithromycin (RU 28965) in serum and in sinus mucosa. *Infection* **16**, 250 (1988).
 27. Fraschini, F. *et al.* The diffusion of clarithromycin and roxithromycin into nasal mucosa, tonsil and lung in humans. *J. Antimicrob. Chemother* **27 Suppl A**, 61–65 (1991).
 28. Jehl, F., Kolbe, R., Scheimberg, A., Rosebaum, M. & Monteil, H. Penetration of roxithromycin into gingival tissue. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* **15**, 77S-79S (1992).
 29. Watelet, J.-B., Bachert, C., Gevaert, P. & Van Cauwenberge, P. Wound healing of the nasal and paranasal mucosa: a review. *Am J Rhinol* **16**, 77–84 (2002).
 30. Watelet, J.-B., Gevaert, P., Bachert, C., Holtappels, G. & van Cauwenberge, P. Secretion of TGF-beta1, TGF-beta2, EGF and PDGF into nasal fluid after sinus surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **259**, 234–238 (2002).
 31. Singer, A. J. & Clark, R. A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med* **341**, 738–746 (1999).
 32. Kurkinen, M., Vaheri, A., Roberts, P. J. & Stenman, S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab. Invest* **43**, 47–51 (1980).
 33. Robson, M. C., Steed, D. L. & Franz, M. G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* **38**, 72–140 (2001).
 34. Hosemann, W., Göde, U., Länger, F., Röckelein, G. & Wigand, M. E. [Experimental studies of wound healing in the paranasal sinuses. I. A model of respiratory wounds in the rabbit maxillary sinus]. *HNO* **39**, 8–12 (1991).
 35. Rajapaksa, S. P., Ananda, A., Cain, T. M., Oates, L. & Wormald, P. J. Frontal ostium neo-osteogenesis and restenosis after modified endoscopic Lothrop procedure in an animal model. *Clin Otolaryngol Allied Sci* **29**, 386–388 (2004).

-
36. Forsgren, K., Jung, Y. G., Stierna, P. & Rivero, C. Regeneration of nerve fibres in the maxillary sinus mucosa after experimental surgery. An immunocytochemical double-labelling study in the rabbit. *Acta Otolaryngol* **119**, 486–491 (1999).
 37. Stammberger, H. Endoscopic endonasal surgery--concepts in treatment of recurring rhinosinusitis. Part I. Anatomic and pathophysiologic considerations. *Otolaryngol Head Neck Surg* **94**, 143–147 (1986).
 38. Fokkens, W. J. *et al.* EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* **50**, 1–12 (2012).
 39. Meltzer, E. O. *et al.* Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 155–212 (2004).
 40. Bachert, C. & Holtappels, G. Pathophysiology of chronic rhinosinusitis, pharmaceutical therapy options. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg* **14**, Doc09 (2015).
 41. Bachert, C. & Akdis, C. A. Phenotypes and Emerging Endotypes of Chronic Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Pract* **4**, 621–628 (2016).
 42. Van Bruaene, N. & Bachert, C. Tissue remodeling in chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **11**, 8–11 (2011).
 43. Van Bruaene, N. *et al.* TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 253–259, 259.e1–2 (2009).
 44. Cao, P.-P. *et al.* Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 478–484, 484.e1–2 (2009).
 45. Watelet, J.-B., Dogne, J.-M. & Mullier, F. Remodeling and Repair in Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* **15**, 34 (2015).
 46. Poetker, D. M. & Smith, T. L. Adult chronic rhinosinusitis: surgical outcomes and the role of endoscopic sinus surgery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **15**, 6–9 (2007).
 47. Messerklinger, W. [Endoscopy of the nose]. *Monatsschr Ohrenheilkd Laryngorhinol* **104**, 451–456 (1970).

-
48. Wigand, M. E., Steiner, W. & Jaumann, M. P. Endonasal sinus surgery with endoscopic control: from radical operation to rehabilitation of the mucosa. *Endoscopy* **10**, 255–260 (1978).
 49. Ghogomu, N. & Kern, R. Chronic rhinosinusitis: the rationale for current treatments. *Expert Rev Clin Immunol* **13**, 259–270 (2017).
 50. Snidvongs, K. *et al.* Corticosteroid nasal irrigations after endoscopic sinus surgery in the management of chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* **2**, 415–421 (2012).
 51. Beule, A. G. *et al.* Effects of a dexamethasone-releasing stent on osteoneogenesis in a rabbit model. *Am J Rhinol Allergy* **23**, 433–436 (2009).
 52. Weber, R. K. [Nasal packing after FESS--time is over?]. *Laryngorhinootologie* **88**, 379–384 (2009).
 53. Jameson, M., Gross, C. W. & Kountakis, S. E. FloSeal use in endoscopic sinus surgery: effect on postoperative bleeding and synechiae formation. *Am J Otolaryngol* **27**, 86–90 (2006).
 54. Wang, Y.-P. *et al.* The effects of Vaseline gauze strip, Merocel, and Nasopore on the formation of synechiae and excessive granulation tissue in the middle meatus and the incidence of major postoperative bleeding after endoscopic sinus surgery. *J Chin Med Assoc* **74**, 16–21 (2011).
 55. Wallwork, B., Coman, W., Mackay-Sim, A., Greiff, L. & Cervin, A. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of macrolide in the treatment of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* **116**, 189–193 (2006).
 56. Wallace, D. V. Treatment options for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy Asthma Proc* **42**, 450–460 (2021).
 57. Watelet, J. B. *et al.* Wound healing after paranasal sinus surgery: neutrophilic inflammation influences the outcome. *Histopathology* **48**, 174–181 (2006).
 58. Smith, T. L. *et al.* Long-term outcomes of endoscopic sinus surgery in the management of adult chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* **9**, 831–841 (2019).

-
59. Lavigne, P. & Lee, S. E. Immunomodulators in chronic rhinosinusitis. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg* **4**, 186–192 (2018).
 60. Eschenbacher, W., Straesser, M., Knoedler, A., Li, R.-C. & Borish, L. Biologics for the Treatment of Allergic Rhinitis, Chronic Rhinosinusitis, and Nasal Polyposis. *Immunol Allergy Clin North Am* **40**, 539–547 (2020).
 61. C Morse, J., Miller, C. & Senior, B. Management of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis in the Era of Biologics. *J Asthma Allergy* **14**, 873–882 (2021).
 62. Wu, S.-H., Hsu, S.-H., Liang, K.-L. & Jiang, R.-S. The effects of erythromycin towards the treatment of persistent rhinosinusitis after functional endoscopic sinus surgery: A randomized, active comparator-controlled study. *J Chin Med Assoc* **82**, 322–327 (2019).
 63. Varvyanskaya, A. & Lopatin, A. Efficacy of long-term low-dose macrolide therapy in preventing early recurrence of nasal polyps after endoscopic sinus surgery. *Int Forum Allergy Rhinol* **4**, 533–541 (2014).
 64. Oyama, T. *et al.* Effects of roxithromycin on tumor necrosis factor-alpha-induced vascular endothelial growth factor expression in human periodontal ligament cells in culture. *J. Periodontol.* **71**, 1546–1553 (2000).
 65. Matsune, S. *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor by macrolides in cultured fibroblasts from nasal polyps. *Laryngoscope* **115**, 1953–1956 (2005).
 66. Sun, D. *et al.* TNF-alpha and endotoxin increase hypoxia-induced VEGF production by cultured human nasal fibroblasts in synergistic fashion. *Auris Nasus Larynx* **32**, 243–249 (2005).
 67. Takizawa, H. *et al.* Erythromycin suppresses interleukin 6 expression by human bronchial epithelial cells: a potential mechanism of its anti-inflammatory action. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **210**, 781–786 (1995).
 68. Suzuki, H. *et al.* Inhibitory effect of macrolides on interleukin-8 secretion from cultured human nasal epithelial cells. *Laryngoscope* **107**, 1661–1666 (1997).

-
69. Hodge, S. *et al.* Azithromycin increases phagocytosis of apoptotic bronchial epithelial cells by alveolar macrophages. *Eur. Respir. J* **28**, 486–495 (2006).
 70. Yamaryo, T. *et al.* Fourteen-member macrolides promote the phosphatidylserine receptor-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother* **47**, 48–53 (2003).
 71. Gong, Y., Lu, J., Ding, X. & Yu, Y. Effect of adjunctive roxithromycin therapy on interleukin-1 β , transforming growth factor- β 1 and vascular endothelial growth factor in gingival crevicular fluid of cyclosporine A-treated patients with gingival overgrowth. *J. Periodont. Res.* **49**, 448–457 (2014).
 72. Zimmermann, P., Ziesenitz, V. C., Curtis, N. & Ritz, N. The Immunomodulatory Effects of Macrolides-A Systematic Review of the Underlying Mechanisms. *Front Immunol* **9**, 302 (2018).
 73. Zeitlin, P. L. *et al.* A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* **4**, 313–319 (1991).
 74. Flotte, T. R. *et al.* Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J. Biol. Chem* **268**, 3781–3790 (1993).
 75. Beule, A. G. *et al.* Effects of simulated bleeding in an in vitro nasal fibroblast wound healing model. *Am J Rhinol Allergy* **24**, 186–191 (2010).
 76. Roth, C. *et al.* Response analysis of stimulating efficacy of polihexanide in an in vitro wound model with respiratory ciliary epithelial cells. *Skin Pharmacol Physiol* **23 Suppl**, 35–40 (2010).
 77. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**, 248–254 (1976).
 78. Klose, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231–243 (1975).

-
79. O'Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem* **250**, 4007–4021 (1975).
 80. Switzer, R. C., 3rd, Merril, C. R. & Shifrin, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem* **98**, 231–237 (1979).
 81. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255–262 (1988).
 82. Unlü, M., Morgan, M. E. & Minden, J. S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071–2077 (1997).
 83. Gao, X., Ray, R., Xiao, Y. & Ray, P. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by macrolide antibiotics in sulfur mustard-exposed airway epithelial cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **103**, 255–261 (2008).
 84. Gao, X., Ray, R., Xiao, Y., Ishida, K. & Ray, P. Macrolide antibiotics improve chemotactic and phagocytic capacity as well as reduce inflammation in sulfur mustard-exposed monocytes. *Pulm Pharmacol Ther* **23**, 97–106 (2010).
 85. Gao, X. *et al.* Pathological studies on the protective effect of a macrolide antibiotic, roxithromycin, against sulfur mustard inhalation toxicity in a rat model. *Toxicol Pathol* **39**, 1056–1064 (2011).
 86. Choi, Y. *et al.* Roxithromycin inhibits nuclear factor kappaB signaling and endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells and ameliorates experimental colitis in mice. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **240**, 1664–1671 (2015).
 87. Ci, X., Chu, X., Xu, X., Li, H. & Deng, X. Short-term roxithromycin treatment attenuates airway inflammation via MAPK/NF- κ B activation in a mouse model of allergic asthma. *Inflamm. Res.* **61**, 749–758 (2012).

-
88. Tamagawa, H. *et al.* Therapeutic effects of roxithromycin in interleukin-10-deficient colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 547–556 (2007).
 89. Aoki, D. *et al.* Roxithromycin inhibits angiogenesis of human hepatoma cells in vivo by suppressing VEGF production. *Anticancer Res* **25**, 133–138 (2005).
 90. Oyama, T. *et al.* Effects of roxithromycin on tumor necrosis factor-alpha-induced vascular endothelial growth factor expression in human periodontal ligament cells in culture. *J. Periodontol* **71**, 1546–1553 (2000).
 91. Pei, Q.-M. *et al.* Roxithromycin inhibits VEGF-induced human airway smooth muscle cell proliferation: Opportunities for the treatment of asthma. *Exp. Cell Res.* **347**, 378–384 (2016).
 92. Dai, Y. *et al.* Roxithromycin treatment inhibits TGF- β 1-induced activation of ERK and AKT and down-regulation of Caveolin-1 in rat airway smooth muscle cells. *Respir Res* **15**, (2014).
 93. Suzuki, H., Shimomura, A., Ikeda, K., Oshima, T. & Takasaka, T. Effects of long-term low-dose macrolide administration on neutrophil recruitment and IL-8 in the nasal discharge of chronic sinusitis patients. *Tohoku J. Exp. Med.* **182**, 115–124 (1997).
 94. Wallwork, B., Coman, W., Mackay-Sim, A., Greiff, L. & Cervin, A. A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Macrolide in the Treatment of Chronic Rhinosinusitis. *The Laryngoscope* **116**, 189–193 (2006).
 95. Kamoi, H., Kurihara, N., Fujiwara, H., Hirata, K. & Takeda, T. The Macrolide Antibacterial Roxithromycin Reduces Bronchial Hyperresponsiveness and Superoxide Anion Production by Polymorphonuclear Leukocytes in Patients with Asthma. *Journal of Asthma* **32**, 191–197 (1995).
 96. Shoji, T. *et al.* Anti-inflammatory effect of roxithromycin in patients with aspirin-intolerant asthma. *Clin. Exp. Allergy* **29**, 950–956 (1999).
 97. Liu, J. *et al.* Effect of Low-Dose, Long-Term Roxithromycin on Airway Inflammation and Remodeling of Stable Noncystic Fibrosis Bronchiectasis. *Mediators of Inflammation* <https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/708608/> (2014) doi:10.1155/2014/708608.

-
98. Sakito, O. *et al.* Interleukin 1 β , Tumor Necrosis Factor Alpha, and Interleukin 8 in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Diffuse Panbronchiolitis: A Potential Mechanism of Macrolide Therapy. *RES* **63**, 42–48 (1996).
 99. Lendeckel, D. *et al.* Proteomic Changes of Tissue-Tolerable Plasma Treated Airway Epithelial Cells and Their Relation to Wound Healing. *Biomed Res Int* **2015**, 506059 (2015).
 100. Selvarajah, J., Saim, A. B., Bt Hj Idrus, R. & Lokanathan, Y. Current and Alternative Therapies for Nasal Mucosa Injury: A Review. *Int J Mol Sci* **21**, E480 (2020).
 101. Tomita, H. *et al.* Roxithromycin is an inhibitor of human coronary artery smooth muscle cells proliferation: a potential ability to prevent coronary heart disease. *Atherosclerosis* **182**, 87–95 (2005).
 102. Yatsunami, J., Tsuruta, N., Hara, N. & Hayashi, S. Inhibition of tumor angiogenesis by roxithromycin, a 14-membered ring macrolide antibiotic. *Cancer Lett.* **131**, 137–143 (1998).
 103. Yamabe, H. *et al.* Roxithromycin inhibits transforming growth factor-beta production by cultured human mesangial cells. *Nephrology (Carlton)* **11**, 524–530 (2006).
 104. Inamura, K., Ohta, N., Fukase, S., Kasajima, N. & Aoyagi, M. The effects of erythromycin on human peripheral neutrophil apoptosis. *Rhinology* **38**, 124–129 (2000).
 105. Reubold, T. F. & Eschenburg, S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cell. Signal.* **24**, 1420–1425 (2012).
 106. Dai, Y.-R. *et al.* Roxithromycin reduces the viability of cultured airway smooth muscle cells from a rat model of asthma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **18**, 3564–3572 (2014).
 107. Jun, Y.-T. *et al.* In Vitro Effects of Ciprofloxacin and Roxithromycin on Apoptosis of Jurkat T Lymphocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1161–1164 (2003).
 108. Ogawa, N., Sugawara, Y., Fujiwara, Y. & Noma, T. Roxithromycin promotes lymphocyte apoptosis in Dermatophagoides-sensitive asthma patients. *Eur. J. Pharmacol.* **474**, 273–281 (2003).

-
109. Croft, S. N., Walker, E. J. & Ghildyal, R. Picornaviruses and Apoptosis: Subversion of Cell Death. *mBio* **8**, e01009-17 (2017).
 110. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. & D’Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* **8**, 603–619 (2016).
 111. Xu, G. & Shi, Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res* **17**, 759–771 (2007).
 112. Tuyt, L. M. L. *et al.* Extracellular-Regulated Kinase 1/2, Jun N-Terminal Kinase, and c-Jun Are Involved in NF- κ B-Dependent IL-6 Expression in Human Monocytes. *The Journal of Immunology* **162**, 4893–4902 (1999).
 113. Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H. & Kracht, M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 847–855 (2002).
 114. Zhang, Y. L. & Dong, C. MAP kinases in immune responses. *Cell. Mol. Immunol.* **2**, 20–27 (2005).
 115. Johnson, G. L. & Lapadat, R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science* **298**, 1911–1912 (2002).
 116. Zhang, W. & Liu, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **12**, 9–18 (2002).
 117. Li, J. *et al.* Regulation of human airway epithelial cell IL-8 expression by MAP kinases. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **283**, L690-699 (2002).
 118. Beinke, S., Robinson, M. J., Hugunin, M. & Ley, S. C. Lipopolysaccharide Activation of the TPL-2/MEK/Extracellular Signal-Regulated Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Is Regulated by I κ B Kinase-Induced Proteolysis of NF- κ B1 p105. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 9658–9667 (2004).

-
119. Chen, B.-C. *et al.* Bradykinin B2 Receptor Mediates NF- κ B Activation and Cyclooxygenase-2 Expression via the Ras/Raf-1/ERK Pathway in Human Airway Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* **173**, 5219–5228 (2004).
120. Tamemoto, H. *et al.* Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 20293–20297 (1992).
121. Imamura, Y. *et al.* Azithromycin Inhibits MUC5AC Production Induced by the *Pseudomonas aeruginosa* Autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) Homoserine Lactone in NCI-H292 Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3457–3461 (2004).
122. Shinkai, M. *et al.* Clarithromycin Delays Progression of Bronchial Epithelial Cells from G1 Phase to S Phase and Delays Cell Growth via Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Suppression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 1738–1744 (2006).
123. Shinkai, M., Foster, G. H. & Rubin, B. K. Macrolide antibiotics modulate ERK phosphorylation and IL-8 and GM-CSF production by human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290**, L75-85 (2006).
124. Morimura, S. *et al.* Depsipeptide and roxithromycin induce apoptosis of lymphoma cells by blocking extracellular signal-regulated kinase activation. *The Journal of Dermatology* **41**, 57–62 (2014).
125. Liu, X., Wang, X., Chen, L., Shi, Y. & Wei, Y. Effects of Erythromycin on the Proliferation and Apoptosis of Cultured Nasal Polyp-Derived Cells and the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaling Pathway. *Med Sci Monit* **24**, 8048–8055 (2018).
126. Shaul, Y. D. & Seger, R. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1773**, 1213–1226 (2007).
127. Wu, P.-K., Becker, A. & Park, J.-I. Growth Inhibitory Signaling of the Raf/MEK/ERK Pathway. *Int J Mol Sci* **21**, E5436 (2020).

-
128. Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E. & Pelicci, P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 722–728 (2007).
 129. Poljsak, B., Šuput, D. & Milisav, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 956792 (2013).
 130. Rahman, I. & MacNee, W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am. J. Physiol.* **277**, L1067-1088 (1999).
 131. Rahman, I. & MacNee, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J.* **16**, 534–554 (2000).
 132. Yamada, K. *et al.* Impaired nuclear factor erythroid 2-related factor 2 expression increases apoptosis of airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease due to cigarette smoking. *BMC Pulm Med* **16**, 27 (2016).
 133. Itoh, K. *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76–86 (1999).
 134. Zhang, H., Court, N. & Forman, H. J. Submicromolar concentrations of 4-hydroxynonenal induce glutamate cysteine ligase expression in HBE1 cells. *Redox Rep.* **12**, 101–106 (2007).
 135. Rangasamy, T. *et al.* Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J. Exp. Med.* **202**, 47–59 (2005).
 136. Zhu, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Zweier, J. L. & Li, Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett.* **579**, 3029–3036 (2005).
 137. Hasegawa, G. *et al.* Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, prevents the development of diabetes in male Spontaneously Diabetic Torii rats. *Eur. J. Pharmacol.* **605**, 164–169 (2009).

-
138. Thimmulappa, R. K. *et al.* Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* **62**, 5196–5203 (2002).
139. Chen, Z.-H. *et al.* 4-Hydroxynonenal induces adaptive response and enhances PC12 cell tolerance primarily through induction of thioredoxin reductase 1 via activation of Nrf2. *J. Biol. Chem.* **280**, 41921–41927 (2005).
140. Zhao, H., Eguchi, S., Alam, A. & Ma, D. The role of nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf-2) in the protection against lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **312**, L155–L162 (2017).
141. Ueno, S. *et al.* Roxithromycin inhibits constitutive activation of nuclear factor κ B by diminishing oxidative stress in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5645–5650 (2005).
142. Arslan, M., Timocin, T. & Ila, H. B. In vitro potential cytogenetic and oxidative stress effects of roxithromycin. *Drug Chem Toxicol* **40**, 463–469 (2017).
143. He, Z. *et al.* Suppression of oxidant-induced glutathione synthesis by erythromycin in human bronchial epithelial cells. *Respiration* **75**, 202–209 (2008).
144. Iwayama, K. *et al.* Long-term treatment of clarithromycin at a low concentration improves hydrogen peroxide-induced oxidant/antioxidant imbalance in human small airway epithelial cells by increasing Nrf2 mRNA expression. *BMC Pharmacol Toxicol* **18**, 15 (2017).
145. Iwayama, K. *et al.* Low concentrations of clarithromycin upregulate cellular antioxidant enzymes and phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in human small airway epithelial cells. *J Pharm Health Care Sci* **4**, 23 (2018).
146. Gouzos, M. *et al.* Antibiotics Affect ROS Production and Fibroblast Migration in an In-vitro Model of Sinonasal Wound Healing. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 110 (2020).

-
147. Boutten, A., Goven, D., Artaud-Macari, E., Boczkowski, J. & Bonay, M. NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Mol Med* **17**, 363–371 (2011).
148. Cameron, E. J., McSharry, C., Chaudhuri, R., Farrow, S. & Thomson, N. C. Long-term macrolide treatment of chronic inflammatory airway diseases: risks, benefits and future developments. *Clin. Exp. Allergy* **42**, 1302–1312 (2012).
149. Qiu, S. & Zhong, X. Macrolides: a promising pharmacologic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Respir Dis* **11**, 147–155 (2017).
150. Sun, X., Chen, L. & He, Z. PI3K/Akt-Nrf2 and Anti-Inflammation Effect of Macrolides in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Curr. Drug Metab.* (2019) doi:10.2174/1389200220666190227224748.
151. Gagliano, N. *et al.* Differential effect of Cyclosporin A and FK506 on SPARC mRNA expression by human gingival fibroblasts. *Biomed. Pharmacother.* **59**, 249–252 (2005).
152. Fan, J. *et al.* SPARC knockdown attenuated TGF- β 1-induced fibrotic effects through Smad2/3 pathways in human pterygium fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **713**, 109049 (2021).
153. Zhu, J. *et al.* SPARC promotes self-renewal of limbal epithelial stem cells and ocular surface restoration through JNK and p38-MAPK signaling pathways. *Stem Cells* **38**, 134–145 (2020).
154. Wang, L.-Y., Zhang, Y.-T., Du, L.-Q., Wu, X.-Y. & Zhu, J. The Effect of SPARC on the Proliferation and Migration of Limbal Epithelial Stem Cells During the Corneal Epithelial Wound Healing. *Stem Cells Dev* **30**, 301–308 (2021).
155. Conforti, F. *et al.* Paracrine SPARC signaling dysregulates alveolar epithelial barrier integrity and function in lung fibrosis. *Cell Death Discov* **6**, 54 (2020).
156. Liu, A., Mosher, D. F., Murphy-Ullrich, J. E. & Goldblum, S. E. The counteradhesive proteins, thrombospondin 1 and SPARC/osteonectin, open the tyrosine phosphorylation-responsive paracellular pathway in pulmonary vascular endothelia. *Microvasc. Res.* **77**, 13–20 (2009).

-
157. Crawford, S. E. *et al.* Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* **93**, 1159–1170 (1998).
 158. Sweetwyne, M. T. & Murphy-Ullrich, J. E. Thrombospondin1 in tissue repair and fibrosis: TGF- β -dependent and independent mechanisms. *Matrix Biol* **31**, 178–186 (2012).
 159. Uno, K. *et al.* Thrombospondin-1 accelerates wound healing of corneal epithelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 928–934 (2004).
 160. Blanco-Mezquita, J. T., Hutcheon, A. E. K. & Zieske, J. D. Role of Thrombospondin-1 in Repair of Penetrating Corneal Wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**, 6262–6268 (2013).
 161. Streit, M. *et al.* Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. *EMBO J* **19**, 3272–3282 (2000).
 162. Morandi, V., Petrik, J. & Lawler, J. Endothelial Cell Behavior Is Determined by Receptor Clustering Induced by Thrombospondin-1. *Front Cell Dev Biol* **9**, 664696 (2021).
 163. Colombo, G. *et al.* Non-peptidic Thrombospondin-1 Mimics as Fibroblast Growth Factor-2 Inhibitors. *J Biol Chem* **285**, 8733–8742 (2010).
 164. Isenberg, J. S. & Roberts, D. D. Thrombospondin-1 in maladaptive aging responses: a concept whose time has come. *Am J Physiol Cell Physiol* **319**, C45–C63 (2020).
 165. Kawasaki, S. *et al.* Roxithromycin Inhibits Cytokine Production by and Neutrophil Attachment to Human Bronchial Epithelial Cells In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1499–1502 (1998).
 166. Lanbeck, P., Odenholt, I. & Riesbeck, K. Dicloxacillin and erythromycin at high concentrations increase ICAM-1 expression by endothelial cells: a possible factor in the pathogenesis of infusion phlebitis. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 174–179 (2004).
 167. Khair, O. A., Devalia, J. L., Abdelaziz, M. M., Sapsford, R. J. & Davies, R. J. Effect of erythromycin on Haemophilus influenzae endotoxin-induced release of IL-6, IL-8 and sICAM-1 by cultured human bronchial epithelial cells. *European Respiratory Journal* **8**, 1451–1457 (1995).

-
168. Chen, C., Chou, C., Sun, Y. & Huang, W. Tumor necrosis factor alpha-induced activation of downstream NF-kappaB site of the promoter mediates epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of PKCalpha, tyrosine kinase, and IKK2, but not MAPKs, pathway. *Cell. Signal.* **13**, 543–553 (2001).
169. Chang, Y.-J., Holtzman, M. J. & Chen, C.-C. Interferon-gamma-induced Epithelial ICAM-1 Expression and Monocyte Adhesion INVOLVEMENT OF PROTEIN KINASE C-DEPENDENT c-Src TYROSINE KINASE ACTIVATION PATHWAY. *J. Biol. Chem.* **277**, 7118–7126 (2002).
170. Tosi, M. F. *et al.* Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effects on neutrophil-epithelial cell adhesion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **7**, 214–221 (1992).
171. Nonoyama, T., Harada, T., Shinogi, J., Yoshimura, E. & Sakakura, Y. Immunohistochemical localization of cytokines and cell adhesion molecules in maxillary sinus mucosa in chronic sinusitis. *Auris Nasus Larynx* **27**, 51–58 (2000).
172. Greve, J. M. *et al.* The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* **56**, 839–847 (1989).
173. Morgene, M. F. *et al.* HaCaT epithelial cells as an innovative novel model of rhinovirus infection and impact of clarithromycin treatment on infection kinetics. *Virology* **523**, 27–34 (2018).
174. Lusamba Kalonji, N. *et al.* The non-antibiotic macrolide EM900 inhibits rhinovirus infection and cytokine production in human airway epithelial cells. *Physiol Rep* **3**, (2015).
175. Elmorsy, S., El-Naggar, M. M., Abdel aal, S. M. & Abou-elela, M. A. Sinus aspirates in chronic rhinosinusitis: fungal colonization of paranasal sinuses, evaluation of ICAM-1 and IL-8 and studying of immunological effect of long-term macrolide therapy. *Rhinology* **48**, 312–317 (2010).
176. Lin, Y.-C., Shun, C.-T., Wu, M.-S. & Chen, C.-C. A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-kappaB. *Clin. Cancer Res.* **12**, 7165–7173 (2006).

-
177. Yu, J. A. *et al.* Lung cancer cell invasion and expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) are attenuated by secretory phospholipase A₂ inhibition. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **143**, 405–411 (2012).
178. Kotteas, E. A. *et al.* The intercellular cell adhesion molecule-1 (icam-1) in lung cancer: implications for disease progression and prognosis. *Anticancer Res.* **34**, 4665–4672 (2014).
179. Sumagin, R. *et al.* Neutrophil Interactions with Epithelial Expressed ICAM-1 Enhances Intestinal Mucosal Wound Healing. *Mucosal Immunol* **9**, 1151–1162 (2016).
180. Nagaoka, T. *et al.* Delayed Wound Healing in the Absence of Intercellular Adhesion Molecule-1 or L-Selectin Expression. *Am J Pathol* **157**, 237–247 (2000).
181. Snyder, F., Fitzgerald, V. & Blank, M. L. Biosynthesis of platelet-activating factor and enzyme inhibitors. *Adv Exp Med Biol* **416**, 5–10 (1996).
182. Travers, J. B. Oxidative stress can activate the epidermal platelet-activating factor receptor. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 279–283 (1999).
183. Yao, Y. *et al.* Ultraviolet B radiation generated platelet-activating factor receptor agonist formation involves EGF-R-mediated reactive oxygen species. *J. Immunol.* **182**, 2842–2848 (2009).
184. Cao, Y., Stafforini, D. M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. & Prescott, S. M. Expression of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is transcriptionally regulated by mediators of inflammation. *J Biol Chem* **273**, 4012–4020 (1998).
185. Stafforini, D. M. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A₂). *Cardiovasc Drugs Ther* **23**, 73–83 (2009).
186. Dong, L., Li, Y. & Wu, H. Platelet activating-factor acetylhydrolase II: A member of phospholipase A₂ family that hydrolyzes oxidized phospholipids. *Chem Phys Lipids* **239**, 105103 (2021).
187. Anderson, R., Theron, A. J. & Feldman, C. Membrane-stabilizing, anti-inflammatory interactions of macrolides with human neutrophils. *Inflammation* **20**, 693–705 (1996).

-
188. Feldman, C. *et al.* Roxithromycin, clarithromycin, and azithromycin attenuate the injurious effects of bioactive phospholipids on human respiratory epithelium in vitro. *Inflammation* **21**, 655–665 (1997).
 189. Nakano, T. Roxithromycin reinforces epithelial defence function in rabbit trachea. *Acta Oto-Laryngologica* **118**, 233–238 (1998).
 190. Bulger, E. M., Arbabi, S., Garcia, I. & Maier, R. V. The Macrophage Response to Endotoxin Requires Platelet Activating Factor. *Shock* **17**, 173–179 (2002).
 191. Bulger, E. M. *et al.* Platelet-activating factor acetylhydrolase inhibits alveolar macrophage activation in vivo. *Shock* **20**, 17–22 (2003).
 192. Arakawa, H. *et al.* Local expression of platelet-activating factor-acetylhydrolase reduces accumulation of oxidized lipoproteins and inhibits inflammation, shear stress-induced thrombosis, and neointima formation in balloon-injured carotid arteries in nonhyperlipidemic rabbits. *Circulation* **111**, 3302–3309 (2005).
 193. Eisenberg, T. *et al.* Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1305–1314 (2009).
 194. Igarashi, K. & Kashiwagi, K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 39–51 (2010).
 195. Bhukel, A., Madeo, F. & Sigrist, S. J. Spermidine boosts autophagy to protect from synapse aging. *Autophagy* **13**, 444–445 (2017).
 196. Madeo, F., Eisenberg, T., Pietrocola, F. & Kroemer, G. Spermidine in health and disease. *Science* **359**, (2018).
 197. CASERO, R. A. & PEGG, A. E. Polyamine catabolism and disease. *Biochem J* **421**, 323–338 (2009).
 198. Minois, N., Carmona-Gutierrez, D. & Madeo, F. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)* **3**, 716–732 (2011).

-
199. Russell, D. & Snyder, S. H. Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **60**, 1420–1427 (1968).
200. Pegg, A. E., Lockwood, D. H. & Williams-Ashman, H. G. Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymic synthesis during androgen-induced prostatic growth. *Biochem. J.* **117**, 17–31 (1970).
201. Mamont, P. S. *et al.* Alpha-methyl ornithine, a potent competitive inhibitor of ornithine decarboxylase, blocks proliferation of rat hepatoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 1626–1630 (1976).
202. Mandal, S., Mandal, A. & Park, M. H. Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian cells. *Biochem. J.* **468**, 435–447 (2015).
203. Mathews, M. B. & Hershey, J. W. B. The translation factor eIF5A and human cancer. *Biochim Biophys Acta* **1849**, 836–844 (2015).
204. Lubas, M. *et al.* eIF5A is required for autophagy by mediating ATG3 translation. *EMBO Rep* **19**, e46072 (2018).
205. Zhang, H. *et al.* Polyamines Control eIF5A Hypusination, TFEB Translation, and Autophagy to Reverse B Cell Senescence. *Mol Cell* **76**, 110-125.e9 (2019).
206. Coni, S. *et al.* Blockade of EIF5A hypusination limits colorectal cancer growth by inhibiting MYC elongation. *Cell Death Dis* **11**, 1045 (2020).
207. Park, M. H., Cooper, H. L. & Folk, J. E. Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 2869–2873 (1981).
208. Park, M. H. & Wolff, E. C. Hypusine, a polyamine-derived amino acid critical for eukaryotic translation. *J. Biol. Chem.* **293**, 18710–18718 (2018).

-
209. Landau, G., Bercovich, Z., Park, M. H. & Kahana, C. The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation. *J. Biol. Chem.* **285**, 12474–12481 (2010).
210. Park, M. H., Lee, Y. B. & Joe, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signals* **6**, 115–123 (1997).
211. Templin, A. T., Maier, B., Nishiki, Y., Tersey, S. A. & Mirmira, R. G. Deoxyhypusine synthase haploinsufficiency attenuates acute cytokine signaling. *Cell Cycle* **10**, 1043–1049 (2011).
212. Balabanov, S. *et al.* Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach. *Blood* **109**, 1701–1711 (2007).
213. Dyshlovoy, S. A. *et al.* Proteomic profiling of germ cell cancer cells treated with aaptamine, a marine alkaloid with antiproliferative activity. *J. Proteome Res.* **11**, 2316–2330 (2012).
214. Park, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J. Biochem.* **139**, 161–169 (2006).

7. Abkürzungsverzeichnis

2D- DIGE	2D- Difference gel electrophoresis
2D-PAGE	zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese
APAF-1	apoptotic protease-activating factor 1
ATCC	American Type Culture Collection
BAX	BCL2 Associated X
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Konzentration
Co	Kontrolle
d	Tage
Da	Dalton
DIGE	Difference in gel electrophoresis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii / aliae
FADD	FAS-associated death domain protein
FCS	Fetales Kälberserum
FESS	funktionelle endoskopische Sinus Chirurgie
h	Stunden
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IL	Interleukin (z.Bsp 1 β , 6, 8)
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IPG	Immobilisierter pH- Gradient
kDa	Kilodalton
L	Liter

LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
mA	Milliampere
MALDI-TOF-MS	Matrix- unterstützte Laser- Desorptions- Ionisations- Flugzeit- Massenspektrometrie
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
MEK2	Mitogen activated protein kinase kinase 2
min	Minuten
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
Nrf2	Nuclear erythroid-related factor 2
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	phosphate- buffered saline
RL	Rehydratisierungslösung
RMS	mass error = Root Mean Square mass error
Rx	Roxithromycin
SAB	Standardabweichung
sec	Sekunden
SRM	Spermidin-Synthase
TGF-Beta	Transforming growth Factor- Beta
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
TOF	Time of flight
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen

Anhang

Materialien

a.) Chemikalien und Reagenzien

<u>Hersteller</u>	<u>Chemikalien und Reagenzien</u>
<i>Airlíquide</i>	Flüssigstickstoff
<i>Applichem</i>	Acrylamid
	Silbernitrat (AgNO ₃)
<i>Biochrom AG</i>	FCS
	PBS
<i>GE-Healthcare</i>	CyDye DIGE Flours (Cy2, Cy 3, Cy5)
	DeStreak
	Dry strip cover fluid
	DTT (Dithiothreitol)
	Glycerol 87 %
	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)
	Pharmalyte pH 3-10
<i>Invitrogen</i>	Agarose
	Alamar Blue
<i>J.T. Baker</i>	Aceton
	MALDI- Wasser
	Methanol
<i>Merck</i>	Coomassie Brilliant Blau G-250
	Ethanol
	Iodacetamid (IAA) Thiourea
	Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)
	Natriumthiosulfat-Pentahydrat (Na ₂ S ₂ O ₃ *5H ₂ O)
	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan
	Urea
	2-Propanol/ Isopropanol
<i>Oxford Glycosystems</i>	Bromphenolblau (BPB)
<i>PAA</i>	L- Glutamin (200mmol; in NaCL)
	Nicht- essentielle Aminosäuren

	Trypsin 1:250
<i>Promega</i>	Lysin
<i>Promo Cell</i>	MEM Earl w/o L-Glutamin
<i>Riedel-de Haën</i>	Ammoniumsulfat
<i>Roth</i>	Ammoniumperoxodisulfat (APS)
	Essigsäure
	Glycin
	Phosphorsäure
	Sodiumdodecylsulfat (SDS)
<i>SIGMA- Aldrich</i>	Acetonitril
	Ammoniumcarbonat
	BSA
	DMF (N,N-Dimethylformamid
	Formaldehyd
	Lysin
	(3[(3Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat) CHAPS
	Thiourea

b.) Kits

<u>Hersteller</u>	<u>Kit</u>
<i>BIORAD</i>	Bradford Reagenz

c.) Roxithromycin

Roxithromycin (R4393) wurde von der Firma Sigma- Aldrich bezogen. (Chargennummer 80214-83-1)

d.) Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
<i>2D- Kammer</i>	Protean® plus Dodeca Cell von Bio-Rad inkl. Power Supply (Electrophoresis Power Supply Consort 300V – 1000mA E831) und Kühlung

	(Thermo Haake K20 / DC 10)
<i>Gefrierschrank</i>	Kryotec Hans S. Schröder GmbH
<i>IEF-Kammer</i>	Pharmacia Biotech Multiphor II inkl. Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL von Amersham Biosciences und Kühlung (Julabo EC F12)
<i>Kühlschrank</i>	Privileg Öko energiesparer
<i>Laminiergerät</i>	Severin Folio
<i>Magnetrühr Tisch</i>	Stirrer SB 161-3 von Stuart
<i>Massenspektrometer</i>	AB Sciex, 4800 MALDI TOF/TOF
<i>Mikroskop</i>	Zeiss
<i>Mikrowelle</i>	Privileg 8020
<i>Multipette</i>	Eppendorf <i>research</i> 10- 100µl
<i>pH-Meter</i>	Microprocessor pH-Meter pH 537 WTW
<i>Photometer</i>	GE Healthcare Ultrospec2100
<i>Pipetten</i>	Eppendorf <i>research</i> 0,1- 2,5µl; 0,5- 10µl; 10- 100µl; 20- 200µl; 100- 1000µl Eppendorf <i>Reference</i> 5µl; 10l; 20µl; 50µl Gilson pipetman 500 µl- 5000µl
<i>Pipettierhilfe</i>	Hirschmann- Laborgeräte
<i>Rüttler</i>	GFL 3015; GFL 3005
<i>Scanner</i>	EPSON PerfectionV750 Pro Typhoon 9400 GE Healthcare
<i>Spülmaschine</i>	Miele Professional G 7883
<i>Sterilwerkbank</i>	Heraeus
<i>Vortexer</i>	Vortex Genie 2 von Scientific Industries
<i>Waagen</i>	Navigator OHAUS Feinwaage Sartorius BL120S
<i>Wärmeschüttler</i>	Thermomixer comfort von Eppendorf
<i>Zellinkubator</i>	Thermo Scientific
<i>Zellzähler</i>	Invitrogen

Zentrifugen

Biofuge pico von Heraeus Instruments

Kühlzentrifuge Centrifuge 5402 von Eppendorf

e.) Verbrauchsmaterial

Material

Hersteller

2D- Werkzeug (Pinzette, Spatel)

GE Healthcare

Bechergläser

RASOTHERM 100ml/Schott DURAN 400ml;
600ml

Einwegküvetten

Sarstedt

Elektrodenstreifen

GE Healthcare

Equilibration tube set 24cm

GE Healthcare

Färbeschalen

Nalgene

Fusselfreie Tücher

Kimberly- Clark Professional

Gelgießkammer

Amersham Biosciences; Ettan Dalt gel caster

Gelkassetten

GE Healthcare

Gelständer

GE Healthcare

Immobiline DryStrips

GE Healthcare

Laminierfolien

Veloflex 4334

Meßbehälter

Vitlab

Mikrotiterplatten

Greiner bio one

Pipettenspitzen

Eppendorf, Gilson

Reaktionsgefäße

Eppendorf Safe- Lock Reaktionsgefäß 1,5ml;
2,0ml

Becton Dickinson Labware Falconröhrchen
50ml

Sarstedt 15ml Röhrchen

Reswelling tray

GE Healthcare

Spot picker

Bio Rad

Spülmittel

August Wencke OHG

Stabpipetten

Sarstedt (5ml, 10ml)

Stanze Biopsy Punch

Stiefel

Wasserspritzflasche

neoLab

Whatman-Papier

Millipore

Zellkulturschalen

Sarstedt

Zellschaber

Greiner bio one

f.) Software und Datenbanken

Software

Hersteller

Delta 2D

Decodon GmbH

Genespring

Agilent Technologies USA

IPA

Qiagen

Microsoft Office 2007

Microsoft

Photometer

SWIFT II (GE-Healthcare) und Excel

Photoshop CS4

Adobe

Typhoon Scanner Control 4.0

GE Healthcare

Datenbank

Anbieter

Uniprot human K 51.5

Uniprot/ swissprot

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der Proben, die während der Experimente mittels Bradford-Reaktion gemessen wurden, lagen zwischen 1,1 - 3,3 µg/µl. Die Bestimmung erfolgte in Du-Triplikaten. Dargestellt ist der Mittelwert der Einzelmessungen.

Tabelle S-1

Nummer	Bedingung	Proteinkonzentration in µg/µl	
		<u>1. Replikat</u>	<u>2. Replikat</u>
1	Co – 0 h	0,91	1,02
2	Co – 24 h	2,00	1,20
3	Co – 48 h	1,57	1,23
4	Co – 72 h	2,25	1,12
5	Co – 96 h	2,01	2,81
6	Co – 120 h	2,03	2,60
7	Rx – 0 h	1,24	1,79
8	Rx – 24 h	1,67	1,35
9	Rx – 48 h	2,82	1,96
10	Rx – 72 h	1,61	1,71
11	Rx – 96 h	1,84	0,98
12	Rx – 120 h	1,59	2,16
13	Rx + 0 h	1,02	1,79
14	Rx + 24 h	2,08	0,89
15	Rx + 48 h	1,88	2,21
16	Rx + 72 h	2,00	2,70
17	Rx + 96 h	1,91	1,67
18	Rx + 120 h	0,95	2,75
19	Co + 0 h	0,97	1,72
20	Co + 24 h	2,02	1,21
21	Co + 48 h	1,72	2,07
22	Co + 72 h	1,58	1,81
23	Co + 96 h	1,80	3,33
24	Co + 120 h	1,80	2,72

Abbildung S-1

Diagramme zur Abnahme der Wundfläche inklusive Standardabweichung und Signifikanzniveau

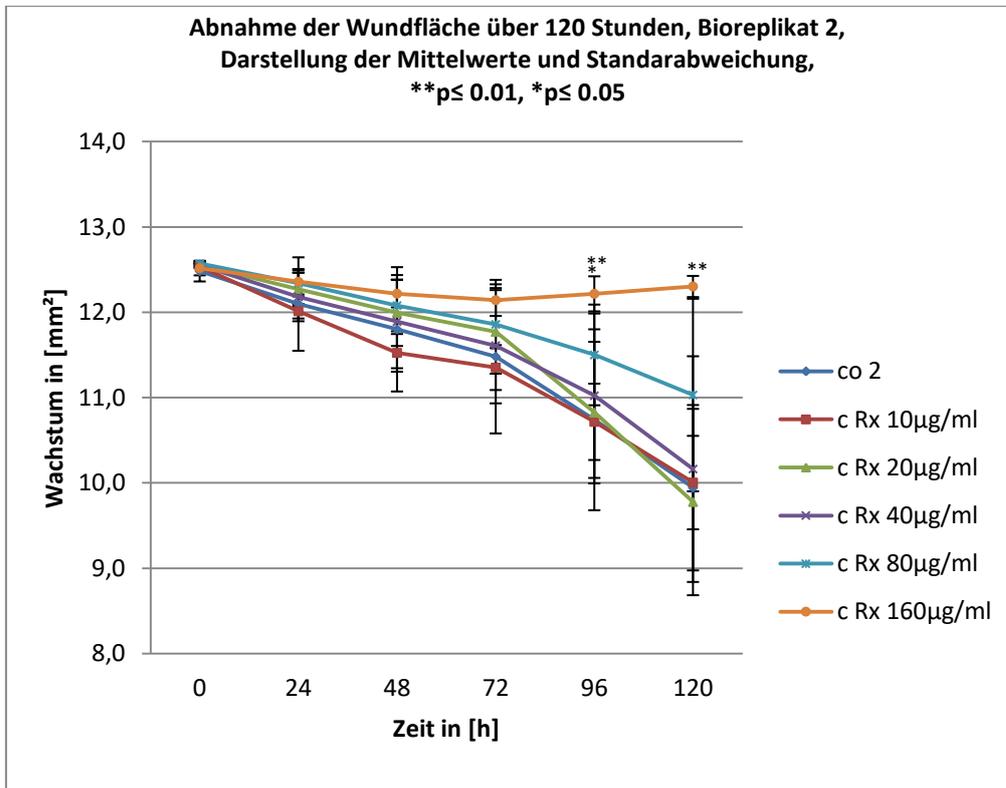
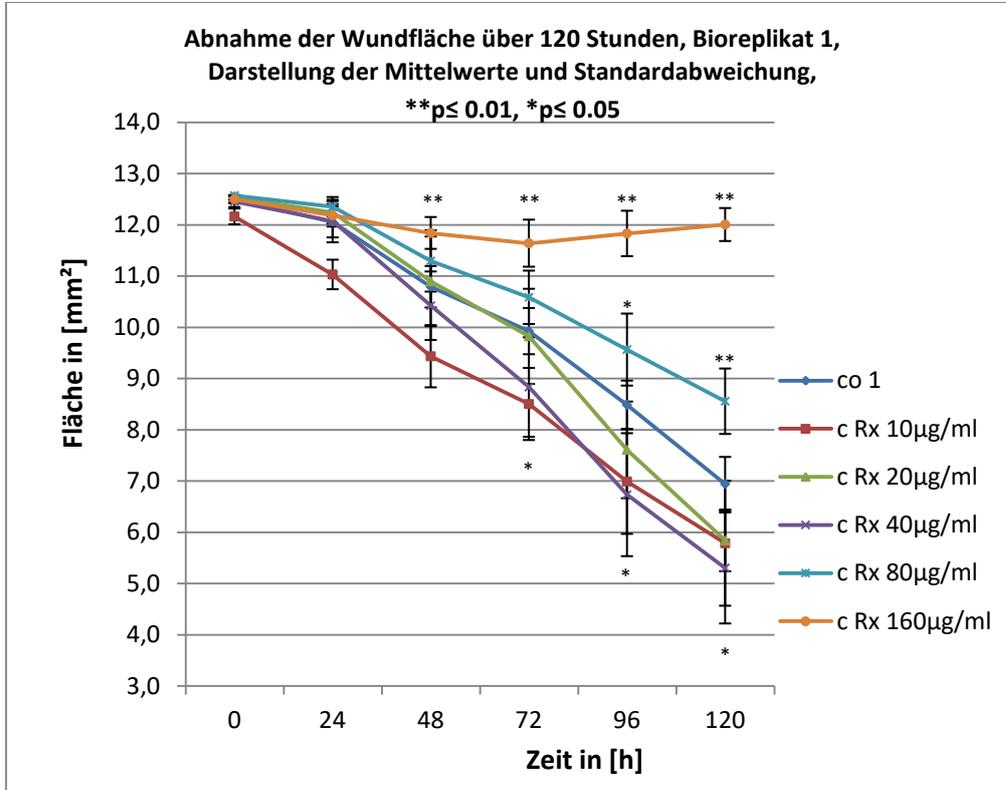


Tabelle S-2

Auswertung Mann-Whitney U-Test für Bioreplikat 1. Darstellung der Signifikanzniveaus $p \leq 0.01$ oder $p \leq 0.05$, z-scores und U-values an den Zeitpunkten 48, 72, 96 und 120 Stunden für die Roxithromyckonzentrationen 40 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$ und 160 $\mu\text{g/ml}$.

48 h	z-score	p- value, er- rechnet	U- Value	p-value, ge- testet	signifikant
40 $\mu\text{g/ml}$	1,04	0,14917	7,0	$p \leq 0,01$	Nein
80 $\mu\text{g/ml}$	-1,36	0,08692	5,5	$p \leq 0,01$	Nein
160 $\mu\text{g/ml}$	-2,51	0,00604	0,0	$p \leq 0,01$	Ja
72 h	z-score	p- value, er- rechnet	U- Value	p-value, ge- testet	signifikant
40 $\mu\text{g/ml}$	2,09	0,01831	2,0	$p \leq 0,05$	Ja
80 $\mu\text{g/ml}$	-1,78	0,03754	3,5	$p \leq 0,05$	Ja
160 $\mu\text{g/ml}$	-2,51	0,00604	0,0	$p \leq 0,01$	Ja
96 h	z-score	p- value, er- rechnet	U- Value	p-value, ge- testet	signifikant
40 $\mu\text{g/ml}$	2,30	0,01072	1,0	$p \leq 0,05$	Ja
80 $\mu\text{g/ml}$	-2,09	0, 01831	2,0	$p \leq 0,05$	Ja
160 $\mu\text{g/ml}$	-2,51	0,00604	0,0	$p \leq 0,01$	Ja
120 h	z-score	p- value, er- rechnet	U- Value	p-value, ge- testet	signifikant
40 $\mu\text{g/ml}$	2,30	0,01072	1,0	$p \leq 0,05$	Ja
80 $\mu\text{g/ml}$	-2,51	0,00604	0,0	$p \leq 0,01$	Ja
160 $\mu\text{g/ml}$	-2,51	0,00604	0,0	$p \leq 0,01$	Ja

Tabelle S-3

Auswertung Mann-Whitney U-Test für Bioreplik 2. Darstellung der Signifikanzniveaus $p \leq 0.01$ oder $p \leq 0.05$, z-scores und U-values an den Zeitpunkten 48, 72, 96 und 120 Stunden für die Roxithromycinkonzentrationen 40 µg/ml, 80 µg/ml und 160 µg/ml.

48 h	z-score	p- value, errechnet	U- Value	p-value, getestet	Signifikant
40 µg/ml	0,0	0,5	12,0	$p \leq 0,01$	Nein
80 µg/ml	0,0	0,5	12,0	$p \leq 0,01$	Nein
160 µg/ml	-0,42	0,33724	10,0	$p \leq 0,01$	Nein
72 h	z-score	p- value, errechnet	U- Value	p-value, getestet	Signifikant
40 µg/ml	-0,42	0,33724	10,0	$p \leq 0,01$	Nein
80 µg/ml	0,31	0,37828	22,0	$p \leq 0,01$	Nein
160 µg/ml	-1,04	0,14917	7,0	$p \leq 0,01$	Nein
96 h	z-score	p- value, errechnet	U- Value	p-value, getestet	Signifikant
40 µg/ml	-0,84	0,20045	8,0	$p \leq 0,01$	Nein
80 µg/ml	-1,04	0,14917	7,0	$p \leq 0,01$	Nein
160 µg/ml	-2,51	0,00604	0,0	$p \leq 0,01$	Ja
120 h	z-score	p- value, errechnet	U- Value	p-value, getestet	Signifikant
40 µg/ml	-0,42	0,33724	10,0	$p \leq 0,01$	Nein
80 µg/ml	-1,78	0,03754	3,5	$p \leq 0,05$	Ja
160 µg/ml	-2,51	0,00604	0,0	$p \leq 0,01$	Ja

Tabelle S-4

Effekt der Wunde auf die Proteinexpression von S9- Zellen. DIGE-Experiment über 96 Stunden. Roxithromycinkonzentration 10 µg/ml

Signifikant regulierte Proteine (mindestens Faktor 1,5) für die Bedingung Roxithromycin mit und ohne Wunde (rx +/ rx-) über 96 Stunden.						
Protein/ Zeit	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Protein Name
ARHGAP1	-1,16	-1,23	-1,37	1,06	3,86	Rho GTPase activating protein 1
BASP1	1,19	-1,06	1,46	-1,03	-1,84	brain abundant, membrane attached signal protein 1
C20orf3	1,22	-1,69	-1,18	-1,41	-2,33	chromosome 20 open reading frame 3
CALR	-1,46	-1,48	-1,68	1,27	4,44	calreticulin
CD2BP2	1,17	1,12	1,38	-1,01	-1,91	CD2 (cytoplasmic tail) binding protein 2
CORO1B	-1,39	-1,28	-1,71	1,27	1,79	coronin, actin binding protein, 1B
CWC27	-1,08	-1,00	-1,50	1,09	1,37	CWC27 spliceosome-associated protein homolog
DPYSL2	-1,44	-1,50	-2,14	1,29	5,32	Dihydropyrimidinase-like 2
GSPT1	2,70	1,16	1,19	-1,02	-1,17	G1 to S phase transition 1
HSP90AA1	-1,60	1,08	-1,07	-1,04	-1,16	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1
HSP90AB1	-1,22	-1,59	-1,42	1,10	1,08	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
<i>HSPA5</i>		<i>-1,54</i>	<i>-1,67</i>	<i>2,08</i>	<i>3,58</i>	<i>heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)</i>
HYOU1	1,23	1,22	1,51	1,25	-1,47	hypoxia up-regulated 1
LMNB1	1,01	1,21	1,02	-1,04	-2,20	lamin B1
LTA4H	1,10	1,50	1,20	-1,12	1,06	leukotriene A4 hydrolase
MCM6	-1,54	-1,32	-1,88	1,20	4,80	minichromosome maintenance complex component 6
NAP1L4	-1,17	-1,19	-1,36	1,23	3,76	nucleosome assembly protein 1-like 4
NPM1	1,13	1,04	1,05	-1,06	-2,17	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23,

P4HB	-1,09	-1,34	-1,30	-1,03	-2,19	numatrin)
PCNA	-1,13	1,21	-1,07	-1,05	-1,89	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide
PGM3	-1,03	-1,04	-1,04	-1,10	-1,96	proliferating cell nuclear antigen
PSMD5	1,16	-1,20	1,22	-1,27	-1,65	phosphoglucomutase 3
PTGES3	1,73	1,01	1,09	-1,09	-1,47	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5
RAD23A	1,14	1,22	1,42	-1,02	-2,15	prostaglandin E synthase 3
RANBP3	-1,47	-1,22	-1,36	1,22	3,52	RAD23 homolog A
RCN1	-1,05	-3,44	1,01	-1,03	-1,43	RAN binding protein 3
RPLP0	1,46	1,61	1,21	-1,16	-1,45	reticulocalbin 1, EF- hand calcium binding domain
SGTA	2,63	1,39	1,37	1,03	-1,31	ribosomal protein, lar- ge, P0
SH3GL	1,14	1,06	1,61	-1,14	-1,24	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, alpha
STAMBP	-1,43	-1,28	-1,30	1,16	4,04	SH3-domain GRB2-like 1
SWAP70	-1,17	1,03	-1,72	1,18	1,75	STAM binding protein
TMOD3	1,07	-1,38	1,18	-1,51	-1,11	SWAP switching B-cell complex 70kDa subunit
TUBA1B	-1,00	-1,62	1,18	-1,01	-1,07	tropomodulin 3
TXNRD1	-1,63	-1,18	-1,44	1,11	3,81	tubulin, alpha 1b
UBA5	1,03	1,20	-1,07	-1,04	-56,59	thioredoxin reductase 1
UBQLN1	-1,45	-1,22	-1,59	1,15	4,14	ubiquitin-like modifier activating enzyme 5
UQCRC1	-1,03	-1,24	1,50	-1,10	-1,13	ubiquilin 1
VIM	1,43	-1,06	1,26	-1,05	-3,91	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I

Signifikant regulierte Proteine (mindestens Faktor 1,5) Kontrolle mit und ohne Wunde (co+ /co-) über 96 Stunden.

Protein/ Zeit	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	Protein Name
ARHGAP1	-1,05	-1,15	-1,05	-1,14	3,94	Rho GTPase activating protein 1
BASP1	1,08	-1,49	1,27	-1,02	-2,10	brain abundant, mem- brane attached signal protein 1
C20orf3	1,17	-2,25	-2,57	-1,19	-2,59	chromosome 20 open reading frame 3
CALR	-1,28	-1,32	1,02	-1,16	4,91	calreticulin

CBX1	-1,24	-1,59	1,01	1,27	-1,10	chromobox homolog 1
CTNNA1	-1,08	-1,65	-1,14	1,06	-1,29	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa
DPYSL2	-1,26	-1,34	1,10	-1,24	5,50	Dihydropyrimidinase-like 2
EEF1D	1,04	1,01	-1,18	-1,12	-2,07	eukaryotic translation elongation factor 1 delta
GSPT1	2,64	1,16	1,04	1,03	-1,28	G1 to S phase transition 1
HNRNPK	1,21	1,11	1,03	1,03	-1,93	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
HSP90AA1	-1,87	1,33	-1,01	-2,06	-2,04	heat shock protein 90kDa alpha
HSPA5	-1,01	1,11	0,88	1,63	-1,23	<i>heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)</i>
HSPA5	-1,10	-1,63	-1,02	-1,10	-1,09	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)
HSPB1	1,62	1,01	-1,08	1,04	-1,15	heat shock 27kDa protein 1
HYOU1	1,41	1,35	1,15	1,07	-1,90	hypoxia up-regulated 1
KARS	-1,03	-1,00	1,06	-1,03	3,47	lysyl-tRNA synthetase
MCM6	-1,19	-1,24	-1,02	-1,19	4,73	minichromosome maintenance complex component 6
NAP1L4	-1,05	-1,21	-1,03	-1,01	3,81	nucleosome assembly protein 1-like 4
NASP	1,03	-1,68	-1,18	1,03	-1,31	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)
P4HB	1,06	-1,37	-1,58	-1,08	-2,01	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide
PCNA	-1,39	-3,26	-1,25	1,33	-1,86	proliferating cell nuclear antigen
PPP1CA	-1,07	-1,25	-1,66	-1,45	-1,28	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isozyme
PPP2R1A	-1,26	-1,04	1,16	-1,04	2,48	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha
PREP	-1,08	-1,04	-1,31	1,01	1,64	prolyl endopeptidase
PSMB7	-1,03	-1,10	-1,03	1,03	-2,06	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7
PSMD5	1,24	2,00	1,57	-1,22	-1,82	proteasome (prosome,

RANBP3	-1,20	-1,45	-1,06	1,01	3,41	macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5
RCN1	-1,01	-4,43	-1,09	1,02	-1,43	RAN binding protein 3
RPLP0	1,29	1,65	1,26	1,10	-1,61	reticulocalbin 1, EF- hand calcium binding domain
RPSA	1,08	-1,30	1,54	1,05	1,00	ribosomal protein, lar- ge, P0
STAMBP	-1,23	-1,25	1,11	-1,08	4,08	ribosomal protein SA
TMOD3	1,12	-1,56	1,51	-1,56	1,11	STAM binding protein
TRIM28	-1,22	-3,22	1,12	1,04	-1,12	tropomodulin 3
TUBA1B	1,06	-1,61	1,38	-1,20	-1,02	tripartite motif containing 28
TXNRD1	-1,37	-1,19	-1,45	-1,03	3,71	tubulin, alpha 1b
UBA5	1,01	-1,50	-1,13	1,18	-7,44	thioredoxin reductase 1
UBQLN1	-1,16	-1,20	-1,03	-1,11	4,09	ubiquitin-like modifier activating enzyme 5
VIM	1,08	1,03	-1,08	-1,14	-4,78	ubiquilin 1
						Vimentin

Tabelle S-5

Signifikant regulierte Proteine (Faktor 1,5) bei einer Roxithromycinkonzentration von 40 µg/ml im LCMS-Versuch

Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name	UniProt/Swiss-Prot Accession	Location
2,527	RPL37	--	RL37_HUMAN	Cytoplasm
2,043	LRRFIP1	--	LRRF1_HUMAN	Cytoplasm
1,746	RAB1B	--	RAB1B_HUMAN	Cytoplasm
-1,608	HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	HIBCH_HUMAN	Cytoplasm
1,690	ADI1	acireductone dioxygenase 1	MTND_HUMAN	Nucleus
1,696	AP3B1	adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit	AP3B1_HUMAN	Cytoplasm
1,561	APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	APAF_HUMAN	Cytoplasm
15,586	ATXN7L1	ataxin 7-like 1	AT7L1_HUMAN	unknown
-1,866	ATP5D	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit	ATPD_HUMAN	Cytoplasm
-1,500	AMBRA1	autophagy/beclin-1 regulator 1	AM- RA1_HUMAN	Cytoplasm
-1,842	BAG2	BCL2-associated athanogene 2	BAG2_HUMAN	Cytoplasm
2,589	BAX	BCL2-associated X protein	BAX_HUMAN	Cytoplasm
-1,515	CARHSP1	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	CHSP1_HUMAN	Cytoplasm
-1,615	CAMK1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I	KCC1A_HUMAN	Cytoplasm
-1,756	COMT	catechol-O-methyltransferase	COMT_HUMAN	Cytoplasm
2,120	CTNBL1	catenin, beta like 1	CTBL1_HUMAN	Nucleus
2,568	CD99	CD99 molecule	CD99_HUMAN	Plasma Membrane
2,356	C11orf67	chromosome 11 open reading frame 67	CK067_HUMAN	unknown
-1,604	C11orf84	chromosome 11 open reading frame 84	CK084_HUMAN	unknown
1,604	CCDC124	coiled-coil domain containing 124	CC124_HUMAN	unknown
2,858	CCDC50	coiled-coil domain containing 50	CCD50_HUMAN	Cytoplasm
-2,019	CSDA	cold shock domain protein A	DBPA_HUMAN	Nucleus
2,157	COL4A2	collagen, type IV, alpha 2	CO4A2_HUMAN	Extracellular Space
1,683	COL5A1	collagen, type V, alpha 1	CO5A1_HUMAN	Extracellular Space
1,632	COL5A2	collagen, type V, alpha 2	CO5A2_HUMAN	Extracellular Space
1,527	COL12A1	collagen, type XII, alpha 1	COCA1_HUMAN	Extracellular Space
-1,721	COPS7B	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7B (Arabidopsis)	CSN7B_HUMAN	Cytoplasm
6,622	CTDNBP1	CTD nuclear envelope phosphatase 1	CNEP1_HUMAN	Extracellular Space
1,862	GAK	cyclin G associated kinase	GAK_HUMAN	Nucleus
1,946	CDK13	cyclin-dependent kinase 13	CDK13_HUMAN	Nucleus
1,535	CRLF3	cytokine receptor-like factor 3	CRLF3_HUMAN	Cytoplasm
2,075	DTX3L	deltex 3-like (Drosophila)	DTX3L_HUMAN	Cytoplasm
1,762	DCXR	dicarbonyl/L-xylulose reductase	DCXR_HUMAN	Cytoplasm
-1,533	DNAJB6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	DNJB6_HUMAN	Nucleus
-1,626	DPY30	dpy-30 homolog (C. elegans)	DPY30_HUMAN	Nucleus

1,657	EFHD2	EF-hand domain family, member D2	EFHD2_HUMAN	unknown
-2,028	ERH	enhancer of rudimentary homolog (Drosophila)	ERH_HUMAN	Nucleus
-1,540	EIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A	IF5A1_HUMAN	Cytoplasm
1,535	FAM192A	family with sequence similarity 192, member A	F192A_HUMAN	Nucleus
-1,553	FTO	fat mass and obesity associated	FTO_HUMAN	Nucleus
-1,505	GRK7	G protein-coupled receptor kinase 7	GRK7_HUMAN	unknown
-2,443	GTF2A1	general transcription factor IIA, 1, 19/37kDa	TF2AA_HUMAN	Cytoplasm
-1,658	GMFB	glia maturation factor, beta	GMFB_HUMAN	Cytoplasm
2,420	GFPT1	glutamine--fructose-6-phosphate transaminase 1	GFPT1_HUMAN	Cytoplasm
1,643	GSTK1	glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1_HUMAN	Cytoplasm
-1,501	GSTM3	glutathione S-transferase mu 3 (brain)	GSTM3_HUMAN	Cytoplasm
1,788	GRPEL1	GrpE-like 1, mitochondrial (E. coli)	GRPE1_HUMAN	Cytoplasm
-1,663	G3BP2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	G3BP2_HUMAN	Nucleus
1,524	HMCN1	hemicentin 1	HMCN1_HUMAN	Extracellular Space
1,919	HTRA1	HtrA serine peptidase 1	HTRA1_HUMAN	Extracellular Space
-2,287	IKBKAP	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein	ELP1_HUMAN	Cytoplasm
1,611	LAMB3	laminin, beta 3	LAMB3_HUMAN	Extracellular Space
2,040	LTBP3	latent transforming growth factor beta binding protein 3	LTBP3_HUMAN	Extracellular Space
2,878	LRFN2	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 2	LRFN2_HUMAN	unknown
3,751	LTN1	listerin E3 ubiquitin protein ligase 1	LTN1_HUMAN	Nucleus
3,317	MAD1L1	MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	MD1L1_HUMAN	Nucleus
-3,082	MRM1	mitochondrial rRNA methyltransferase 1 homolog (S. cerevisiae)	MRM1_HUMAN	Cytoplasm
-1,558	MTPN	myotrophin	MTPN_HUMAN	Nucleus
4,677	NUCKS1	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1	NUCKS_HUMAN	Nucleus
3,404	NUCB1	nucleobindin 1	NUCB1_HUMAN	Cytoplasm
1,585	OAT	ornithine aminotransferase	OAT_HUMAN	Cytoplasm
-2,003	PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1_HUMAN	Cytoplasm
1,515	PMPCA	peptidase (mitochondrial processing) alpha	MPPA_HUMAN	Cytoplasm
4,039	PXDN	peroxidasin homolog (Drosophila)	PXDN_HUMAN	Extracellular Space
-1,647	PIGS	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S	PIGS_HUMAN	Cytoplasm
1,570	PIK3R5	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5	PI3R5_HUMAN	Cytoplasm
1,515	PLD3	phospholipase D family, member 3	PLD3_HUMAN	Cytoplasm
-2,019	POLD2	polymerase (DNA directed), delta 2, accessory subunit	DPOD2_HUMAN	Nucleus
-1,507	POLR2I	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I, 14.5kDa	RPB9_HUMAN	Nucleus
1,555	PSMD3	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3	PSMD3_HUMAN	Cytoplasm
-2,309	PSMD6	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit,	PSMD6_HUMAN	Cytoplasm

		non-ATPase, 6	N	
1,539	PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme	PP1G_HUMAN	Cytoplasm
-1,767	PPP2R2D	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, delta	2ABD_HUMAN	Nucleus
1,500	PTPN4	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4 (megakaryocyte)	PTN4_HUMAN	Cytoplasm
-1,566	PRPF31	PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	PRP31_HUMAN	Nucleus
1,544	PDXDC1	pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 1	PDXD1_HUMAN	unknown
1,643	PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1	P5CR1_HUMAN	Cytoplasm
1,530	QSOX1	quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1	QSOX1_HUMAN	Cytoplasm
1,742	RAB10	RAB10, member RAS oncogene family	RAB10_HUMAN	Cytoplasm
-1,555	RAB32	RAB32, member RAS oncogene family	RAB32_HUMAN	Cytoplasm
-1,665	RAB35	RAB35, member RAS oncogene family	RAB35_HUMAN	Cytoplasm
1,520	RHOC	ras homolog family member C	RHOC_HUMAN	Plasma Membrane
1,654	RTDR1	rhabdoid tumor deletion region gene 1	RTDR1_HUMAN	unknown
1,502	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	ARHG7_HUMAN	Cytoplasm
2,040	RPL19	ribosomal protein L19	RL19_HUMAN	Cytoplasm
1,778	RPL28	ribosomal protein L28	RL28_HUMAN	Cytoplasm
1,525	RPL35	ribosomal protein L35	RL35_HUMAN	Cytoplasm
-2,508	RPS26	ribosomal protein S26	RS26_HUMAN	Cytoplasm
-1,786	ROBO4	roundabout, axon guidance receptor, homolog 4 (<i>Drosophila</i>)	ROBO4_HUMAN	Plasma Membrane
1,548	RTF1	Rtf1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	RTF1_HUMAN	Nucleus
1,633	SAR1B	SAR1 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	SAR1B_HUMAN	Cytoplasm
1,506	SCRN1	secernin 1	SCRN1_HUMAN	Cytoplasm
2,084	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPRC_HUMAN	Extracellular Space
2,024	SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	GTR1_HUMAN	Plasma Membrane
-1,887	SLC25A1	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1	TXTP_HUMAN	Plasma Membrane
1,574	SOWAHC	soosondowah ankyrin repeat domain family member C	ANR57_HUMAN	Nucleus
-1,965	SPC24	SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	SPC24_HUMAN	Cytoplasm
1,781	SYNE1	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	SYNE1_HUMAN	Nucleus
11,588	SPATS2L	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like	SPS2L_HUMAN	unknown
1,651	SDF2	stromal cell-derived factor 2	SDF2_HUMAN	Extracellular Space
-1,779	TIA1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	TIA1_HUMAN	Nucleus
1,812	TIPIN	TIMELESS interacting protein	TIPIN_HUMAN	Nucleus
2,446	TSTA3	tissue specific transplantation antigen P35B	FCL_HUMAN	Plasma Membrane

-1,547	TOMM70A	translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	TOM70_HUMAN	Cytoplasm
3,462	TMPRSS7	transmembrane protease, serine 7	TMPS7_HUMAN	Plasma Membrane
1,515	UGP2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	UGPA_HUMAN	Cytoplasm
1,528	VPS29	vacuolar protein sorting 29 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	VPS29_HUMAN	Cytoplasm
-1,873	VTN	vitronectin	VTNC_HUMAN	Extracellular Space
1,586	WDR18	WD repeat domain 18	WDR18_HUMAN	Nucleus
1,616	WBP11	WW domain binding protein 11	WBP11_HUMAN	Nucleus
-1,919	ZNF827	zinc finger protein 827	ZN827_HUMAN	unknown

Tabelle S-6

LCMS-Analyse der Roxithromycinkonzentrationen 10µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml und 80 µg/ml, Untersuchungspunkt 24 Stunden, ohne Wunde, an der Nrf2-vermittelten Antwort auf oxidativen Streß beteiligte Proteine

Rx 10 µg/ml	Rx 20 µg/ml	Rx 40 µg/ml	Rx 80 µg/ml	Name	
1,43	-1,36		-1,32	actin, gamma 1	ACTG1
	1,231			ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha 1	ATP1A1
		1,23		calpain 1, (mu/I) large subunit	CAPN1
	1,29	1,301		caspase 3	CASP3
		1,28		catalase	CAT
		1,22		carbonyl reductase 1	CBR1
	1,23	2,157		collagen type IV alpha 2 chain	COL4A2
	-1,346	-1,305		dynactin subunit 3	DCTN3
1,09	-1,33			DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	DNAJA2
	1,80	-1,53		DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	DNAJB6
		1,33	1,392	destrin, actin depolymerizing factor	DSTN
		1,248		eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	EIF3C
		-1,278		eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	EIF4G2
			1,33	fibronectin 1	FN1
	-1,764			G1 to S phase transition 1	GSPT1
	-2,03	-1,25		glutathione reductase	GSR
1,37	1,34	1,64	1,48	glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1
	-1,52	-1,50		glutathione S-transferase mu 3 (brain)	GSTM3
	-1,21			glutathione S-transferase omega 1	GSTO1
	-1,375			HCLS1 associated protein X-1	HAX1
	-1,99	-1,346		histone deacetylase 1	HDAC1
		-1,257		histone deacetylase 2	HDAC2
1,6 und 3,9	-1,24			heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	HSP90AA1
	-2,92	1,26		intercellular adhesion molecule 1	ICAM1
		1,28		insulin degrading enzyme	IDE
	2,292			karyopherin subunit alpha 3	KPNA3
	-1,248			KRAS proto-oncogene, GTPase	KRAS
	-1,37			mitogen-activated protein kinase kinase 2	MAP2K2
	-1,288			mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1
	3,51	-1,2		mannosyl-oligosaccharide glucosidase	MOGS
		1,332		nucleobindin 2	NUCB2
	1,33	1,585		ornithine aminotransferase	OAT
	-1,741			poly(ADP-ribose) polymerase 1	PARP1

		1,26	1,459	phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH
	3,89	1,57		phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5	PIK3R5
	1,37	1,27		peptidylprolyl isomerase B	PPIB
-1,05	-1,25			peroxiredoxin 2	PRDX2
	-1,393			prolyl endopeptidase	PREP
	-1,201			protein arginine methyltransferase 1	PRMT1
			1,381	phosphoserine aminotransferase 1	PSAT1
		1,279		proteasome subunit alpha 1	PSMA1
	-1,295			proteasome subunit alpha 4	PSMA4
		-1,211		proteasome subunit alpha 7	PSMA7
	-1,25	-1,219		proteasome subunit beta 3	PSMB3
	-1,251			proteasome subunit beta 4	PSMB4
		-1,207		proteasome 26S subunit, non-ATPase 12	PSMD12
	-1,256			proteasome 26S subunit, non-ATPase 14	PSMD14
		1,555		proteasome 26S subunit, non-ATPase 3	PSMD3
		1,231		RAN, member RAS oncogene family	RAN
	1,26	1,37	1,577	arginyl-tRNA synthetase	RARS
	1,48			v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	RELA
	-1,297			S100 calcium binding protein A13	S100A13
		1,477		Sec23 homolog A, coat complex II component	SEC23A
	2,06	2,024		solute carrier family 2 member 1	SLC2A1
	-1,57	-1,418		SMAD family member 4	SMAD4
	-1,262			structural maintenance of chromosomes 4	SMC4
1,10	-1,21	-1,24		superoxide dismutase 1, soluble	SOD1
	-1,49	-1,25		superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2
			1,643	sequestosome 1	SQSTM1
	-1,47			signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	STAT3
		1,296		transcription factor A, mitochondrial	TFAM
	-1,46			transmembrane p24 trafficking protein 2	TMED2
		1,241		tumor protein p53	TP53
		1,291		UDP-glucose 6-dehydrogenase	UGDH
1,00	-1,23			ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase)	USP14

Tabelle S-7

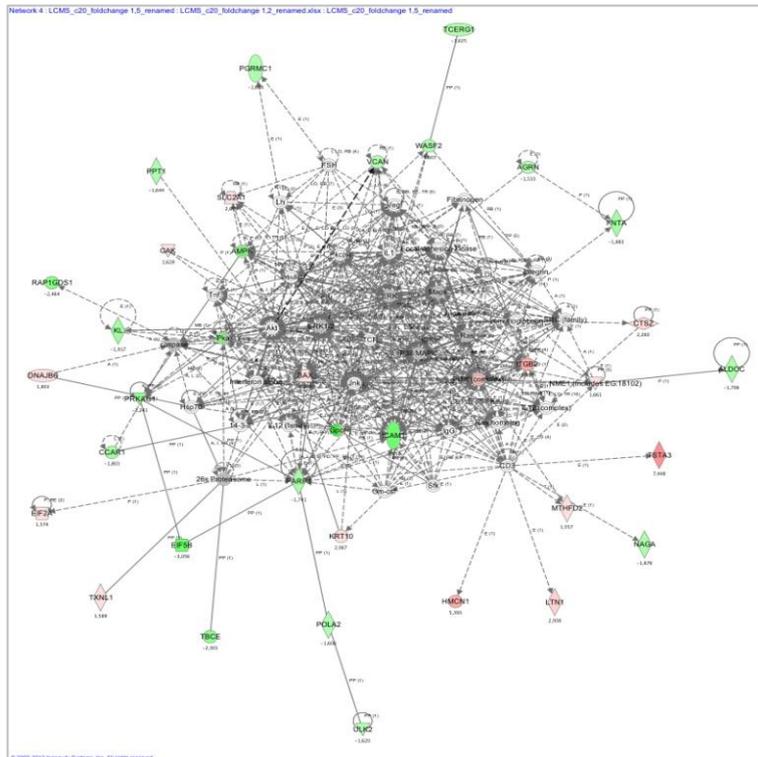
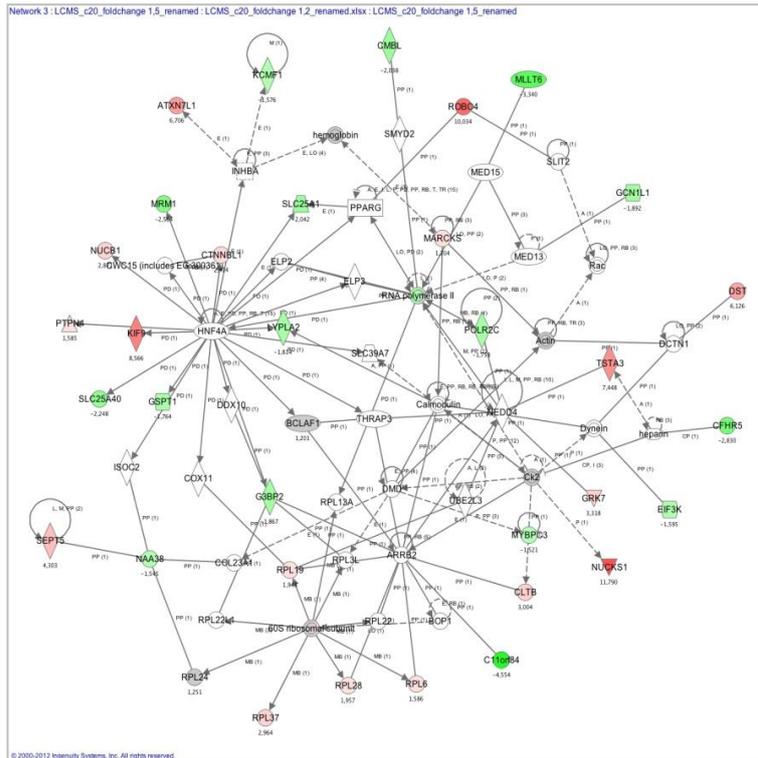
Auflistung der im VENN- Diagramm dargestellten NRF2-vermittelten Proteine. Gegenüberstellung von LCMS 10 µg/ml und DIGE 10 µg/ml.

3 common elements in "LCMS 10 µg/ml" and "DIGE 10 µg/ml":	3 elements included exclusively in "LCMS 10 µg/ml":	37 elements included exclusively in "DIGE 10 µg/ml":
ACTG1_HUMAN HSP90AA1_HUMAN SOD1_HUMAN	DNAJA2_HUMAN GSTK1_HUMAN PRDX2_HUMAN	IKBKG_HUMAN CCT3_HUMAN CTSD_HUMAN DNAJB11_HUMAN EIF3G_HUMAN ERP29_HUMAN GSPT1_HUMAN GSS_HUMAN GSTP1_HUMAN HPRT1_HUMAN HSP90AB1_HUMAN HSP90B1_HUMAN HSPA9_HUMAN HYOU1_HUMAN KEAP1_HUMAN LMNA_HUMAN MAP2K1_HUMAN PDIA3_HUMAN PDIA6_HUMAN PREP_HUMAN PSMA5_HUMAN PSMB4_HUMAN PSMC1_HUMAN PSMC3_HUMAN PSMD13_HUMAN PSMD4_HUMAN PSMD5_HUMAN RBBP7_HUMAN RPLP0_HUMAN STIP1_HUMAN TALDO1_HUMAN TPI1_HUMAN TRIM28_HUMAN TXNRD1_HUMAN UBQLN2_HUMAN USP14_HUMAN VCP_HUMAN

Tabelle S-8

Auflistung der im VENN- Diagramm dargestellten NRF2-vermittelten Proteine. Gegenüberstellung von LCMS 20 µg/ml und LCMS 40 µg/ml

14 common elements in "LCMS 20 µg/ml" and "LCMS 40 µg/ml":	21 elements included exclusively in "LCMS 20 µg/ml":	18 elements included exclusively in "LCMS 40 µg/ml":
CASP3_HUMAN CO4A2_HUMAN DCTN3_HUMAN GSHR_HUMAN HDAC1_HUMAN MOGS_HUMAN OAT_HUMAN PPIB_HUMAN PSB3_HUMAN SYRC_HUMAN GTR1_HUMAN SMAD4_HUMAN SODC_HUMAN SODM_HUMAN	ACTG_HUMAN AT1A1_HUMAN ERF3A_HUMAN GSTO1_HUMAN HAX1_HUMAN HS90A_HUMAN IMA4_HUMAN RASK_HUMAN MP2K2_HUMAN MK01_HUMAN PARP1_HUMAN PPCE_HUMAN ANM1_HUMAN PSA4_HUMAN PSB4_HUMAN PSDE_HUMAN TF65_HUMAN S10AD_HUMAN SMC4_HUMAN TMED2_HUMAN UBP14_HUMAN	CATA_HUMAN CBR1_HUMAN DEST_HUMAN EIF3C_HUMAN IF4G2_HUMAN HDAC2_HUMAN IDE_HUMAN NUCB2_HUMAN SERA_HUMAN PSA1_HUMAN PSA7_HUMAN PSD12_HUMAN PSMD3_HUMAN RAN_HUMAN SC23A_HUMAN TFAM_HUMAN P53_HUMAN UGDH_HUMAN



Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Berlin, den 04.02.2023

Katrin Scholten

Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es nun an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben. Ich möchte mich hiermit bei Herrn PD Dr.med. Achim Beule bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Herrn Dr. rer. nat. Christian Scharf danke ich besonders für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonders danke ich der gesamten Arbeitsgruppe mit Frau Wolter, Frau Darm, Charlotte, Anja, Johannes, Martin, Phillip und Derick für diese besondere Zeit, für viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte und vielseitige Unterstützung, ohne die diese Arbeit so nicht geglückt wäre.