

**Der Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-3:  
ein zentrales Schlüsselprotein im Verständnis der Ätiologie  
entzündlicher Wundheilungsstörungen der Haut?**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Andreas Linke  
aus Hoyerswerda

Frankfurt am Main 2008

(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als  
Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. V. Müller

Gutachter: Prof. Dr. E. Boles

Prof. Dr. S. Frank

Datum der Disputation: 04.11.2008

mānen Eitēn

# INHALT

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Anatomische und funktionelle Grundlagen der Haut</b>	<b>1</b>
1.1	Die Epidermis	2
1.2	Dermis und Subkutis	4
<b>2</b>	<b>Die kutane Wundheilung</b>	<b>5</b>
2.1	Hämostase und Entzündung: provisorische Matrix, Infektionsabwehr und Initiierung des Regenerationsprozesses	6
2.2	Migration, Proliferation und Matrixaufbau: essentielle Prozesse einer erfolgreichen Reepithelialisierung und Bildung des Granulationsgewebes	9
2.3	Remodellierung: Neuordnung der Matrix und Vernarbung	12
<b>3</b>	<b>Die Pathophysiologie chronischer Wunden</b>	<b>13</b>
3.1	Gemeinsamkeiten in der Pathogenese chronischer Wundheilungsstörungen	13
3.2	Der diabetische Fußulkus	16
<b>4</b>	<b>Mechanismen zur Kontrolle der Entzündungsreaktion im Wundheilungsprozess</b>	<b>18</b>
4.1	Das JAK-STAT-Paradigma und die Familie der <i>Suppressor of cytokine signaling</i> (SOCS)	19
4.2	SOCS-Proteine und deren Rolle in pathophysiologischen Veränderungen	21
4.3	TGF- $\beta$ als prototypisches antiinflammatorisches Zytokin im Kontext der Wundheilung	22
<b>5</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>II</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>1</b>	<b>Material</b>	<b>27</b>
1.1	Chemikalien	27
1.2	Puffer und Lösungen	28
1.2.1	Allgemeine Puffer und Stammlösungen	28
1.2.2	DEPC Wasser	29
1.3	Kits und sonstige Materialien	29
1.4	Enzyme	30
1.4.1	Übersicht verwendeter Enzyme	30
1.4.2	Lösen und Vorinkubation lyophilisierter Enzyme	30
1.5	Rekombinante und aufgereinigte Proteine	31

---

1.6	Antikörper	31
1.6.1	Primärantikörper	31
1.6.2	Sekundärantikörper	31
1.7	Oligonukleotide	31
1.7.1	Keratin-10 RT-PCR Primer	32
1.7.2	Klonierungsprimer für <i>pBKS(+)</i> <i>K5-SOCS3</i>	32
1.7.3	Genotypisierungsprimer	32
1.8	Vektoren	32
1.8.1	Ausgangsvektoren	32
1.8.2	Rekombinante Plasmide	32
1.9	Bakterienstämme	33
1.10	Primärzellen und Zelllinien	33
1.11	Mauslinien	33
1.11.1	Knock-out Linien	33
1.11.2	Nicht-transgene Mauslinien	33
1.11.3	Transgene (TgN-SOCS3) Mauslinien	34
1.12	Geräte	34
1.13	Computersoftware	34
<b>2</b>	<b>Bakterien</b>	<b>35</b>
2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.2	Transformation	36
<b>3</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>36</b>
3.1	HaCaT Keratinozyten	37
3.1.1	Zellkulturmedien und Lösungen	37
3.1.2	Stimulation	37
3.1.3	Subkultivierung	38
3.1.4	Kryokonservierung	38
3.2	Primäre Keratinozyten	38
3.2.1	Zellkulturmedien und Lösungen	39
3.2.2	Beschichtung von Zellkulturgefäßen	39
3.2.3	Isolation primärer Keratinozyten	40
3.2.4	Stimulation	40
3.2.5	Untersuchungen der Zellmigration	41
3.2.6	Untersuchungen der Zellproliferation	41
3.2.7	Bestimmung des Nitrit-Gehaltes nach Griess	41

---

<b>4</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>42</b>
4.1	Extraktion von Proteinen	42
4.1.1	Lysate aus eukaryontischen Zellen	42
4.1.2	Lysate aus murinem Gewebe	43
4.1.3	Wundlysate zur Bestimmung von TGF- $\beta$ 1 mittels ELISA	43
4.2	Quantifizierung von Proteinlysaten	43
4.3	Western Blot Analyse	43
4.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
4.3.2	Transfer (Blotting) und Immundetektion	44
4.4	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	45
4.5	Immunhistochemie (IHC)	46
4.5.1	Herstellung von Kryoschnitten	46
4.5.2	Peroxidasefärbung und Kerngegenfärbung	46
4.5.3	Vorinkubation zur Detektion 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) -positiver Zellen	47
<b>5</b>	<b>Nukleinsäuretechniken</b>	<b>47</b>
5.1	Isolation von RNA	47
5.1.1	Präparation aus eukaryontischen Zellen	47
5.1.2	Präparation aus murinem Gewebe	48
5.2	Isolation von DNA	48
5.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	48
5.2.2	Präparation genomischer DNA aus murinem Gewebe	49
5.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	50
5.4	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	50
5.5	Reverse Transkription (RT)	51
5.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
5.6.1	PCR von RT Produkten	52
5.6.2	PCR zur Genotypisierung der TgN-SOCS3 Linien	52
5.7	Modifizierung von DNA	53
5.7.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)	53
5.7.2	Ligation von DNA-Fragmenten	53
5.8	Klonierung	53
5.8.1	Klonierung von RNA-Sonden	53
5.8.2	Klonierung von pBKS(+)-K5-SOCS3	54
5.9	Sequenzierung	54
5.10	RNase-Verdau Schutzanalyse (RPA)	55
5.10.1	Generierung und präparative Aufreinigung der <i>antisense</i> -Transkripte	55
5.10.2	Hybridisierung und RNase-Verdau	56
5.10.3	Analytische Gelelektrophorese und Auswertung	56

<b>INHALT</b>	<b>IV</b>
5.11 Southern Blotting zur Genotypisierung der TgN-SOCS3 Linien	56
5.11.1 Restriktionsverdau und elektrophoretische Auftrennung der Fragmente	57
5.11.2 Transfer auf eine Nylonmembran (Blotting)	57
5.11.3 Hybridisierung und Auswertung	57
<b>6 Genotypisierung der TgN-SOCS3 Mauslinien</b>	<b>58</b>
<b>7 Tierexperimentelle Methoden</b>	<b>58</b>
7.1 Haltung und Zucht	58
7.2 Glukosetoleranztest	59
7.3 Wundheilungsstudien	59
7.3.1 Studien nach Applikation von 5-Bromo-2'-desoxyuridin	60
7.3.2 Studien mit neutralisierendem Antikörper ( $\alpha$ TGF- $\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 3)	60
7.3.3 Studien nach Leptinsubstitution in <i>ob/ob</i> -Mäusen	60
7.4 Präparation von Dermis und Epidermis	60
<b>III ERGEBNISSE</b>	<b>61</b>
<b>1 SOCS3 im Prozess der Wundheilung</b>	<b>61</b>
1.1 SOCS3 ist in der akuten Entzündungsphase eines normalen Heilungsprozesses induziert	61
1.2 Lokalisierung der SOCS3-Expression im Wundgewebe	63
1.3 Verstärkte und verlängerte SOCS3-Expression bei diabetisch-gestörtem Heilungsverlauf	66
<b>2 SOCS3-Überexpression im transgenen Mausmodell</b>	<b>68</b>
2.1 Generierung der Founder-Generation	68
2.2 Genotypisierung potenziell-transgener Tiere der Founder-Generation	70
2.3 Etablierung und Phänotypisierung der transgenen Mauslinien	71
2.3.1 Expression des Transgens in der F1-Generation	71
2.3.2 Organspezifität der Transgenexpression	74
2.3.3 Immunhistochemische Lokalisierung der Transgenexpression	75
2.3.4 Glukosetoleranztest	78
<b>3 Primäre Keratinozyten</b>	<b>79</b>
3.1 Keratinozyten aus transgenen Tieren zeigen eine hohe SOCS3-Expression und eine vollständige Blockierung der IL-6 vermittelten STAT3 Phosphorylierung	79
3.2 <i>In vitro</i> -Wundheilung: Hohe SOCS3-Expression ist assoziiert mit verminderter Keratinozytenproliferation und gestörter Zellmigration	80
3.3 Hinweise auf eine funktionelle Verbindung zwischen SOCS3 und verfrühter Keratinozytendifferenzierung	83

<b>INHALT</b>	v
<b>4 Wundheilungsstudien</b>	<b>86</b>
4.1 Wunden transgener Tiere heilen mit deutlicher Verzögerung	86
4.1.1 Die hyperproliferierenden Epithelien in Wunden transgener Tiere sind deutlich reduziert	88
4.1.2 Neoepitheliale Wundränder transgener Tiere sind durch eine verminderte Zahl teilungsaktiver Zellen charakterisiert	92
4.2 Die verzögerte Wundheilung in der transgenen Maus ist charakterisiert durch eine verstärkte und verlängerte Entzündung	93
4.2.1 Verstärkte und lang anhaltende Expression klassischer proinflammatorischer Zytokine in Wunden transgener Tiere	94
4.2.2 Expression und Lokalisierung chemotaktischer Zytokine	96
4.2.3 Die verzögerte Wundheilung in der transgenen Maus wird von einer anhaltenden Präsenz infiltrierender Immunzellen begleitet	101
4.2.4 Verstärkte und lang anhaltende Expression entzündungsrelevanter Enzyme in Wunden transgener Tiere: Cyclooxygenase (COX)-2 und induzierbare NO-Synthase (iNOS)	105
4.3 Die Rolle des Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ in der Wundheilung transgener Tiere	110
4.3.1 Die Expression des klassischen antiinflammatorischen Zytokins TGF- $\beta$ 1 ist in Wunden transgener Tiere deutlich hochreguliert und folgt der veränderten Kinetik der Entzündungsreaktion	111
4.3.2 Die Expression von TGF- $\beta$ 1-mRNA in der Spätphase der diabetisch-gestörten Wundheilung Leptin-defizienter <i>ob/ob</i> -Mäuse	113
4.3.3 Isolierte primäre Keratinozyten aus transgenen und nicht-transgenen Tieren reagieren auf externes TGF- $\beta$ 1	114
4.3.4 Die Applikation eines neutralisierenden anti-TGF- $\beta$ Antikörpers führt makroskopisch zu einer deutlich verbesserten Wundheilungssituation im transgenen Tier fünf Tage nach Verwundung	117
4.3.5 Die Wunden Antikörper-behandelter transgener Tiere zeigen einen geringeren Wunddurchmesser bei unverändert atrophischen epithelialen Wundrändern	119
4.3.6 Im Gegensatz zu nicht-transgenen Tieren bleibt die Entzündungssituation in Wunden transgener Tiere trotz TGF- $\beta$ -Neutralisierung unverändert	122
 <b>IV DISKUSSION</b>	 <b>125</b>
<b>1 SOCS3 im Wundheilungsprozess stoffwechselgesunder und diabetischer Mäuse</b>	<b>125</b>
<b>2 Das transgene Mausmodell: organspezifische SOCS3-Expression in basalen Keratinozyten</b>	<b>127</b>

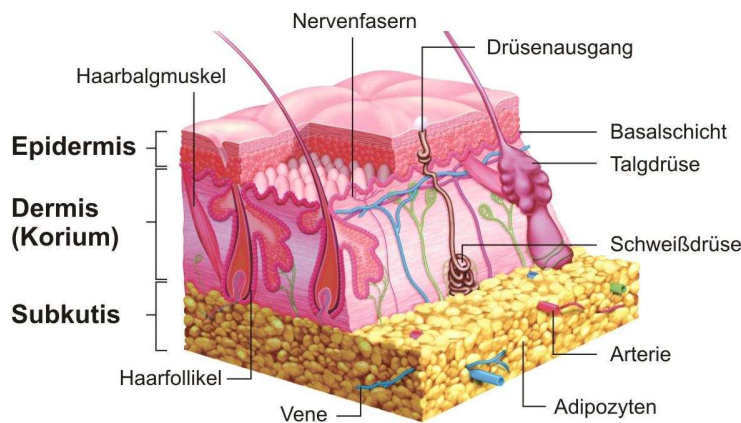


<b>INHALT</b>	<b>VI</b>
2.1 Transgene Mäuse als Modellsysteme der biomedizinischen Forschung	127
2.2 Geno- und Phänotypisierung	129
2.2.1 Genotypisierung der transgenen Linien	129
2.2.2 Charakterisierung der Transgenexpression	129
<b>3 Eine persistente Entzündungsreaktion als Merkmal einer gestörten Wundheilung:     kausal, sekundär oder epiphänomenal?</b>	<b>131</b>
3.1 Die Wundheilungssituation im transgenen Mausmodell: Parallelen zu Merkmalen heilungsdefizienter diabetischer Wunden	133
3.2 Die Entzündung als direkte Folge eines modifizierten Keratinozytenphänotyps?	135
3.3 Defizite in der Wundreepithelialisierung als Ursache einer potenzierten Entzündung?	136
3.4 Entzündung: ein Epiphänomen verzögert heilender Wunden?	139
<b>V ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>144</b>
<b>VI LITERATUR</b>	<b>147</b>
<b>VII ANHANG</b>	<b>168</b>
<b>1 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>168</b>
<b>2 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>169</b>
<b>3 Tabellenverzeichnis</b>	<b>170</b>
<b>4 Genkarte und Sequenz des transgenen Konstruktes</b>	<b>171</b>
4.1 Genkarte	171
4.2 Sequenz	171
<b>5 Publikationen</b>	<b>175</b>
5.1.1 Publikationen	175
5.1.2 Posterbeiträge	175
5.1.3 Vorträge	175
<b>6 Danksagung</b>	<b>176</b>
<b>7 Currilculum vitae</b>	<b>177</b>

# I EINLEITUNG

## 1 Anatomische und funktionelle Grundlagen der Haut

Mit einer durchschnittlichen Oberfläche von etwa  $2\text{m}^2$  ist die Haut das größte Organ des menschlichen Körpers und aufgrund ihrer Multifunktionalität von pivotaler Bedeutung für die Vitalität des gesamten Organismus. Aus diesem Grund sind akute oder chronische Verletzungen der Haut, die einen Integritätsverlust größerer Areale zur Folge haben, oft lebensbedrohlich - primär begründet durch den unkontrollierten Austritt von



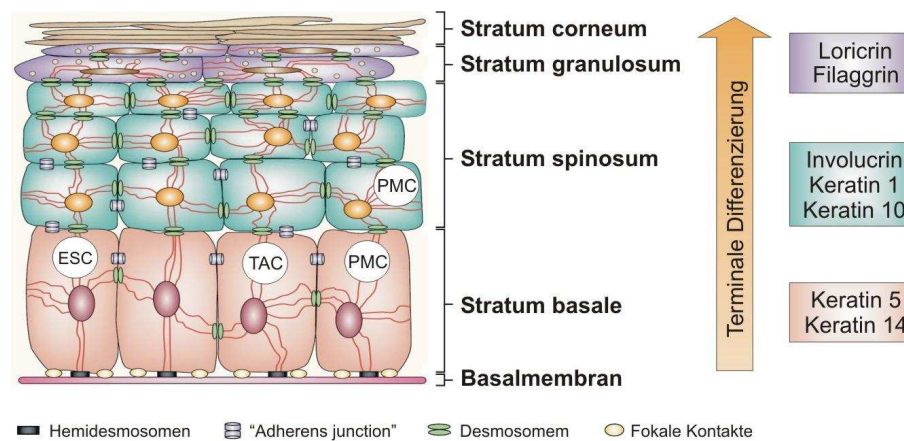
**Abb. I.1: Schematischer Aufbau der Haut**  
(modifiziert nach <http://www.br-online.de/wissensbildung/collegeradio/medien/biologie/haut/bildarchiv/>)

Wasser und Elektrolyten (Schockgefahr), einer massiven Kontamination mit Mikroorganismen und der Gefahr einer systemischen Infektion (Sepsis). Darüber hinaus schützt die Haut durch ihre Melaninpigmentierung vor destruktiver UV-Strahlung und gewährleistet durch ihre komplexe

Anatomie eine wirkungsvolle Protektion der darunter liegenden Gewebe vor chemischen und physikalischen Noxen. Sie ist zudem integraler Bestandteil der Thermoregulation sowie der Immunabwehr, vermittelt als Sinnesorgan über zahlreiche Sensoren Druck-, Temperatur- und nozizeptive Reize und ist letztlich essentiell für die Biosynthese von Colecalciferol (Vitamin  $D_3$ ) aus der Vorstufe 7-Dehydrocholesterol. Um dem Anspruch von Schutz- und Sinnesfunktion gerecht zu werden, ist die Haut in epidermale, dermale und subkutane Schichten gegliedert, die durch strukturelle und funktionelle Besonderheiten charakterisiert sind (Abb. I.1).

## 1.1 Die Epidermis

Die Epidermis repräsentiert als äußerste Hautschicht das Kompartiment, das maßgeblich für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion verantwortlich ist. Sie stellt ein gefäßloses, horizontal geschichtetes Plattenepithel ektodermaler Genese dar und beherbergt neben Keratinozyten, die mit einem ca. 90%igen Anteil den dominierenden Zelltyp bilden, antigenpräsentierende *Langerhans*-Zellen, mechanosensorische *Merkel*-Zellen und melaninproduzierende Melanozyten. Obwohl Haarfollikel und Drüsen sehr tief in die Subkutis hineinreichen, sind sie integraler Bestandteil der Epidermis und von epidermaler Abkunft.



**Abb. I.2: Schematische Darstellung der epidermalen Schichtung**

Die in der rechten Hälfte aufgeführten Substanzen sind spezifisch für den jeweiligen Differenzierungsstatus der Zellen und werden daher als Differenzierungsmarker bezeichnet. ESC: Epidermale Stammzelle; TAC: *transient amplifying cell*; PMC: *post mitotic cell* (modifiziert nach Fuchs und Raghavan 2002)

Eine herausragende Eigenschaft der Epidermis ist ihre faszinierende Fähigkeit zur kontinuierlichen Reproduktion und Regeneration [Khavari und Rinn 2007]. Zelluläre Basis dieser Eigenschaft sind Keratinozyten der innersten epidermalen Schicht, die als Basalschicht bezeichnet wird (Abb. I.2). Interfollikuläre Areale dieser Basalschicht und Bereiche der Haarbalgregion sowie der germinalen Haarfollikelmatrix beherbergen Cluster aus adulten Stammzellklonen, die sich durch eine unbegrenzte Reproduktionskapazität auszeichnen [Mackenzie 1997; Taylor *et al.* 2000; Mack *et al.* 2005]. Es gibt Studien, die darauf verweisen, dass eine einzige epidermale Stammzelle (ESC) genügt, um die gesamte Körperoberfläche eines Menschen mit einer neuen Epidermis zu bedecken [Rochat *et al.* 1994]. Tochterzellen der ESC, die als *transient amplifying cells* (TAC) bezeichnet werden, besitzen mit ca. 3-5 Teilungszyklen ein begrenzteres

Teilungsvermögen [Potten 1981; Jones und Watt 1993; Jones *et al.* 1995]. Als weitere Subpopulation basaler Keratinozyten gelten so genannte *post-mitotic cells* (PMC), die wiederum als Tochterzellen der TAC kurz vor dem Eintritt in suprabasale Schichten und der damit verbundenen terminalen Differenzierung stehen (Abb. I.2) [Jones und Watt 1993; Rzepka *et al.* 2005].

Ein weiteres Charakteristikum basaler Keratinozyten ist ihr spezifisches Expressionsmuster an Zytokeratinen und Adhäsionsproteinen (Integrinen). In Keratinfilamenten assoziierte Zytokeratine sind essentiell für die Konstruktion des Zytoskeletts, das über interzelluläre Ankerproteine (Desmosomen) mit dem Keratinskelett der Nachbarzelle in Konjugation steht und neben dem Aktinskelett maßgeblich für die hohe Belastungsstabilität des epidermalen Zellverbandes verantwortlich ist [Green und Jones 1996; Green und Gaudry 2000]. Ausschließlich in basalen Keratinozyten bestehen diese Keratinfilamente aus den Zytokeratinen 5 und 14 (Abb. I.2) [Nelson und Sun 1983]. Als Integrine werden transmembranäre, heterodimere Adhäsionsproteine bezeichnet, die beispielsweise als Bestandteile der Hemidesmosomen der Verankerung der Zelle in der Basalmembran dienen, aber auch als Rezeptoren auf extrazelluläre Reize fungieren [Katz und Yamada 1997; Miyamoto *et al.* 1998; Danen und Yamada 2001; Hynes 2002]. Typisch für epidermale Stammzellen ist eine hohe Expressionsdichte von  $\beta$ 1-Integrinen, die in enger Assoziation zur Stabilisierung der Stammzellkompartimente steht [Jones und Watt 1993].

Aus ihrer hohen Reproduktionskapazität ergibt sich die zentrale Funktion der Basalschicht. Sie stellt das zelluläre Reservoir dar, aus dem Keratinozyten kontinuierlich passiv in das suprabasale *Stratum spinosum* und später in das *Stratum granulosum* „abwandern“, um letztlich als tote Korneozyten im *Stratum corneum* die äußere Barriere zu definieren. Mit dem Lösen des Keratinozyten von der Basalmembran wird der irreversible Prozess der terminalen Differenzierung eingeleitet, der mit dem absoluten Verlust der Teilungsfähigkeit einhergeht [Watt 1989; Jensen *et al.* 1999]. Terminale Differenzierung und Teilungsaktivität schließen sich somit gegenseitig aus. Während des Differenzierungsprozesses durchläuft die Zelle auf ihrem Weg zum *Stratum corneum* charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen, die anhand der Expression spezifischer Differenzierungsmarker genau definierbar sind und im programmierten Zelltod enden (Abb. I.2) [Maruoka *et al.* 1997]. Typisch für Keratinozyten des *Stratum*

*spinosum* ist die beginnende horizontale Umorientierung ihrer Zellachse. Einen beträchtlichen Teil ihrer Synthesekapazität widmen spinale Zellen der Produktion der Zytokeratine 1 und 10, der Verstärkung interzellulärer desmosomaler Verankerungen und der Synthese von Hüllproteinen wie Involucrin [Eckert *et al.* 1993; Green und Simpson 2007]. Mit dem Übergang ins *Stratum granulosum* stoppen sie die Keratinsynthese zugunsten der Produktion basischer Proteine wie zum Beispiel Filaggrin und sezernieren die in zahlreichen Granula eingeschlossenen lipophilen Proteine und Lipide in den Interzellularraum. Sie beginnen mit dem Aufbau des so genannten *cornified envelope*, einer hochresistenten Hüllstruktur aggregierter, quervernetzter Keratinfilamente und hydrophober Proteine wie Loricrin und Periplakin, an deren Polymerisierung eine Vielzahl verschiedener Transglutaminasen beteiligt ist [Eckert *et al.* 2005]. Diese Tatsache und der parallel einsetzende proteolytische Abbau der Zellorganellen bedingen den Verlust der Zellvitalität. Das *Stratum corneum* stellt letztlich eine lipidversiegelte Barriere aus final ausdifferenzierten und stark abgeflachten Zellfragmenten (Korneozyten) dar. Die Abgrenzung des epidermalen Kompartiments von der darunterliegenden Dermis wird durch die Basalmembran definiert, auf der basale Keratinozyten über Calcium-abhängige Hemidesmosomen fest verankert sind (Abb. I.2) [Green und Jones 1996; Borradori und Sonneberg 1999]. Diese Membran besteht aus einer dünnen Schicht spezieller Laminin V- und Kollagen IV-reicher Matrixbestandteile [Timpl 1996; Burgeson und Christiano 1997].

## 1.2 Dermis und Subkutis

Das dermale Kompartiment, das auch als *Korium* bezeichnet wird, begründet als fibroelastisches Gewebe die hohe Reißfestigkeit und Elastizität der Haut und dient der Nährstoffversorgung der aufliegenden Epidermis. Es ist zugleich Träger des neuronalen Netzwerks und diverser sensorischer Rezeptoren. Entsprechend der morphologischen Charakteristika lässt sich die Dermis in das distale *Stratum papillare* und das proximale *Stratum reticulare* gliedern. Namensgebend für das *Stratum papillare* ist eine Vielzahl papillarer Strukturen, durch die eine intensive Verzahnung mit der aufliegenden Epidermis bei größtmöglicher Kontaktfläche geschaffen wird (Abb. I.1). Prädominierender Zelltyp dieser Schicht sind Fibroblasten, die nicht nur wegen ihrer Fähigkeit zur Synthese und Organisation der extrazellulären Matrix (ECM) von essentieller Bedeu-

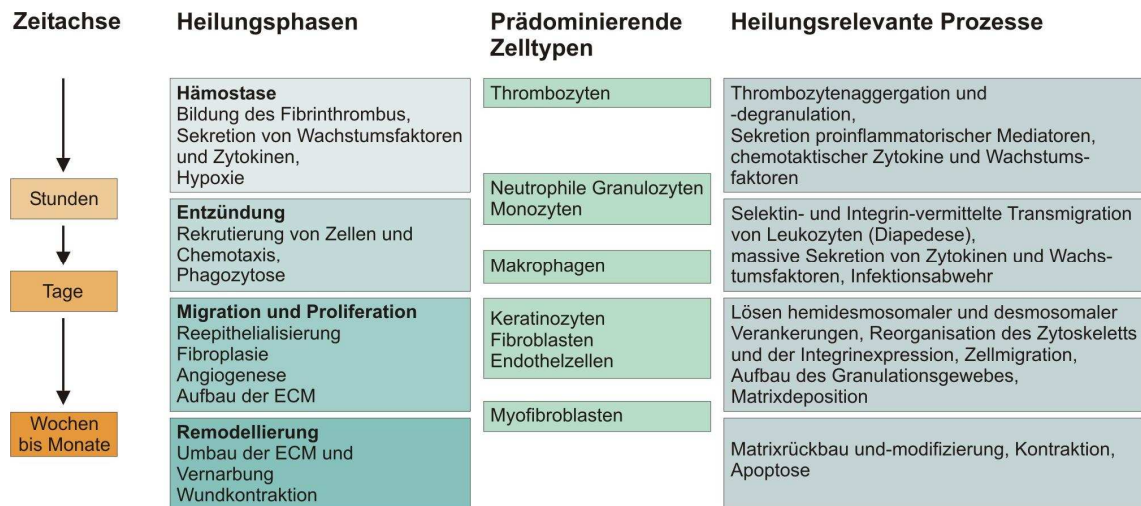
tung sind. Sie besitzen zudem aufgrund ihrer auto- und parakrinen Interaktionen mit anderen Zelltypen der Haut eine entscheidende Funktion in der Regulation physiologischer und pathophysiologischer Ereignisse [Werner und Smola 2001; Werner *et al.* 2007]. Neben Fibroblasten sind in diesem Zellverband residente dendritische Zellen, aber auch Makrophagen, neutrophile Granulozyten (Neutrophile) und Lymphozyten existent [Nestle und Nickoloff 1995; Gonzales-Ramos *et al.* 1996; Lugovic *et al.* 2001]. Im *Stratum papillare* besteht die umgebende Matrix aus tendenziell parallel ausgerichteten Kollagenfaserbündeln (Kollagen I und III). Wesentlich dichter und mit Proteoglykanen und Glukosaminoglykanen angereichert ist das Fasernetz des *Stratum reticulare*, in das nur noch wenige Zellen eingebettet sind. Ohne scharfen Übergang schließt sich die subkutane Gewebeschicht an, deren zelluläre Basis sich primär aus Adipozyten zusammensetzt. Sie wird durchzogen von Nervenfasern, Lymphkanälen und Blutgefäßen und dient als Energiespeicher, Wärmebarriere und dämpft wirkungsvoll destruktive Impulse traumatischer Ereignisse.

## 2 Die kutane Wundheilung

Ein optimaler Heilungserfolg, definiert durch eine rasche und möglichst originalgetreue Regeneration der Integrität und Funktionalität verletzter Hautareale, hängt maßgeblich von der Fähigkeit des Organismus ab, komplexe biologische und molekulare Prozesse zum richtigen Zeitpunkt zu initiieren, mit hoher Präzision zu regulieren, in ihrer Abfolge zu synchronisieren und zu terminieren. Von zentraler Bedeutung für die Heilung kutaner Wunden sind dabei Proliferations- und Migrationsvorgänge sowie Prozesse zum Wiederaufbau der extrazellulären Matrix - kommuniziert und eng reguliert durch ein multifokales Netzwerk aus Entzündungsmediatoren, Wachstumsfaktoren und Zytokinen. In Abhängigkeit von der Art und Größe der Verletzung können die Anteile jedes Teilprozesses in ihrer Intensität und Dauer variieren. Basiert der Wundschluss kleinerer, oberflächlicher Schürfwunden hauptsächlich auf epidermaler Migration, sind Proliferationsvorgänge für die Abheilung von Wunden, die bis in das dermale Kompartiment reichen, von äquivalenter Bedeutung [Falanga 2005]. Reste von Haarfollikeln und Drüsengängen im Wundbett unterstützen dabei den Heilungsfortschritt, da sie ein Reservoir epidermaler Stammzellen darstellen. Im Gegensatz zu so genannten Vollhautwunden, die ausschließlich von den Wundrändern aus reepithelialisiert werden, ver-

heilen weniger tiefe Wunden zusätzlich ausgehend von epidermalen „hot spots“ im Wundinneren [Martin 1997; Falanga 2005; Li *et al.* 2007].

Nach dem heutigen Wissensstand, der zum großen Teil auf den Erkenntnissen tierexperimenteller Studien basiert, hat es sich als sinnvoll herausgestellt, den Prozess der kutanen Wundheilung in vier sich überschneidende, interaktive Phasen zu gliedern, auf die im Folgenden näher eingegangen wird (Abb. I.3) [Falanga 2005].



**Abb. I.3: Die vier Phasen der Wundheilung und die jeweils prädominierenden Zelltypen sowie eine Auswahl heilungsrelevanter Prozesse in Relation zur Zeit** (modifiziert nach Falanga 2005)

## 2.1 Hämostase und Entzündung: provisorische Matrix, Infektionsabwehr und Initiierung des Regenerationsprozesses

In Abhängigkeit von der Intensität des traumatischen Ereignisses ist eine kutane Verletzung in der Regel von einer Schädigung des Gefäßsystems und einer resultierenden Extravasation begleitet. Die im gesunden Organismus sofort einsetzende Hämostase führt zu einem temporären Wundverschluss unter Ausbildung eines Gerinnungsthrombus, der sich primär aus Thrombozyten zusammensetzt, die in ein dichtes Netzwerk aus Fibrin-, Fibronectin-, Vitronectin- und Thrombospondinfasern eingebettet sind [Grinnell *et al.* 1981; Clark *et al.* 1982 und 1985; Martin 1997; Bornstein und Sage 2002]. Dieses Netzwerk stellt gleichzeitig die provisorische Matrix für in das Wundareal infiltrierende Immunzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und endotheliale Progenitorzellen dar [Clark *et al.* 1982; Singer und Clark 1999].

Als auslösendes chemotaktisches Moment gilt die massive Degranulation aktivierter Wundthrombozyten, die zur Freisetzung potenter chemotaktischer Zytokine und Wachstumsfaktoren wie dem *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2, dem *platelet-derived growth factor* (PDGF) und dem *epidermal growth factor* (EGF) führt [Singer und Clark 1999; Martin und Parkhurst 2004]. Begleitet und potenziert wird dieser immunzellrekrutive Effekt durch ein wahres „Feuerwerk“ verschiedenster Mediatoren und Quellen. Dazu zählen beispielsweise bakterielle Antigene (Lipopolysaccharide (LPS), Formylmethionylpeptide) und Abbauprodukte diverser Matrixbestandteile wie die Fibrinopeptide A und B, die bei der Polymerisation von Fibrinogen entstehen [Falanga 2005; Laurens *et al.* 2006; Eming *et al.* 2007]. Auch Mastzellen repräsentieren durch die Freisetzung von Substanzen wie dem *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$ , Histamin, Proteasen, Leukotrienen und Interleukinen additive Quellen chemotaktischer Signale für die Rekrutierung von Leukozyten [Noli und Miolo 2001; Weller *et al.* 2006]. Die Expression endothelialer Adhäsionsproteine (P-, und E-Selektine, *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 und -2, *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)) und diverser Integrine der  $\beta$ 2-Klasse vermittelt zudem die Transmigration von Neutrophilen aus dem Gefäßsystem in das Wundareal (Diapedesis) [Springer 1994; Muller 2003]. Auch Keratinozyten des Wundrandes sind zur Population chemotaktisch-aktiver Zellen zu zählen und somit in der Lage, die Präsenz immunologischer Zellen im Wundareal zu beeinflussen [Wetzler *et al.* 2000; Gillitzer und Goebler 2001; Goren *et al.* 2003a; Tokura *et al.* 2008].

Als Konsequenz treffen bereits innerhalb weniger Minuten nach Verletzung Neutrophile im Wundgewebe ein und kommen ihrer Funktion als erste Barriere in der Abwehr infiltrierender Bakterien sowie der Phagozytose von Zelltrümmern und Matrixfragmenten nach [Simpson und Ross 1972; Eming *et al.* 2007; Kim *et al.* 2008]. Von äquivalenter Relevanz ist deren Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , Interleukin (IL)-1 $\alpha$  und -1 $\beta$ , IL-6), Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Chemokinen wie IL-8 (Maus: *macrophage inflammatory protein* (MIP)-2), *interferon-inducible protein* (IP)-10 und MIP-1 $\alpha$ , die an der Initiierung weiterer heilungsrelevanter Ereignisse beteiligt sind [Martin 1997; Eming *et al.* 2007]. Es wurde sogar vermutet, dass IL-1 und TNF- $\alpha$  maßgeblich für die initiale Aktivierung lokaler Keratinozyten und Fibroblasten verantwortlich sind [Hubner *et al.* 1996]. So konnte anhand der Keratinozytenzelllinie HaCaT gezeigt werden, dass



eine temporäre Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine deutliche Steigerung der Glukoseaufnahme zur Folge hatte [Goren *et al.* 2006c].

Dennoch stellten mehrere Studien eine essentielle Funktion neutrophiler Granulozyten für den kutanen Wundheilungsprozess in Frage, da nach Neutralisierung der Neutrophilen keine negative Beeinflussung des Heilungsprozesses in nicht infizierten Wunden festgestellt werden konnte und sogar von einer Beschleunigung der Reepithelialisierung berichtet wurde [Dovi *et al.* 2003]. Dies bestätigt wiederum die enorme Komplexität des regulatorischen Netzwerks mit einer Vielzahl partiell redundanter und auf den ersten Blick widersprüchlicher Ereignisse, die ein umfassendes Verständnis des Gesamtprozesses erschweren. Unumstritten ist jedoch, dass Thrombozyten und Leukozyten sowie residente Zellen (Mastzellen, Keratinozyten, Fibroblasten) in dieser frühen Phase einen Cocktail verschiedener Schlüsselfaktoren bereitstellen, der als „Kickstarter“ des Heilungsprozesses gilt [Martin 1997].

Die Infiltration neutrophiler Granulozyten endet bei Abwesenheit einer Wundinfektion in der Regel nach 2-3 Tagen. Monozyten emigrieren in das Wundareal, transformieren in Abhängigkeit zu den in ihrer Mikroumgebung existierenden Stimuli zu aktivierten Makrophagen und stellen bald den prädominierenden Zelltyp in der finalen Phase des Entzündungsprozesses dar. Rekrutiert werden sie zum Teil von denselben Substanzen, die auch auf Neutrophile chemotaktisch wirkten. Hinzu kommen spezifische Mediatoren aus der Klasse der CC-Chemokine wie das *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1, MIP-1 $\alpha$  und RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*), aber auch Fibronektinfragmente und Thrombin [Postlethwaite und Kang 1976; Sherry *et al.* 1988; Kunkel *et al.* 1991; DiPietro *et al.* 1995b; Frank *et al.* 2000; Wetzler 2000b]. Zu den Hauptquellen zählen neben Leukozyten selbst die bereits erwähnten Thrombozyten, aber auch Fibroblasten und Keratinozyten der hyperproliferierenden Epithelränder. Mehrere Arbeiten beschreiben Makrophagen als die wahrscheinlich wichtigsten Zellen in der Regulation der Entzündungsreaktion, die zudem während des Übergangs von der Entzündungs- zur Reparaturphase eine zentrale Position einnehmen [Leibovich und Ross 1975; Singer und Clark 1999; Li *et al.* 2007] - wenngleich sie auch in der Diskussion stehen, maßgeblich in die Pathophysiologie diabetischer Wundheilungsstörungen involviert zu sein [Goren *et al.* 2007]. Ihr Beitrag zum erfolgreichen Heilungsverlauf im stoffwechselgesunden Organismus ist dennoch gesichert und beruht

neben der Phagozytose und Neutralisierung pathogener Mikroorganismen, nekrotischen Gewebes und apoptotischer Neutrophilen [Newman *et al.* 1982] auf der Sekretion wichtiger Mediatoren und Wachstumsfaktoren, die den Aufbau des Granulationsgewebes maßgeblich begründen. Zu nennen sind hier beispielsweise VEGF, PDGF, TGF- $\alpha$ , der *basic fibroblast growth factor* (bFGF), der *insulin-like growth factor* (IGF), chemotaktische Matrixbausteine wie Fibronectin, proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  [DiPietro 1995; Martin 1997; Singer und Clark 1999; Falanga 1993 und 2005].

## **2.2 Migration, Proliferation und Matrixaufbau: essentielle Prozesse einer erfolgreichen Reepithelialisierung und Bildung des Granulationsgewebes**

Parallel zum Abklingen der Entzündungsreaktion erfolgt der fließende Übergang in die nächste Heilungsphase, deren primäres Ziel in der Fortführung der Substitution der provisorischen Wundmatrix durch ein strukturiertes Gewebe besteht. Tragender Teilprozess ist daher zunächst die Migration relevanter Zellen in das Wundareal, wobei diese maßgeblich von der Fähigkeit der Zelle abhängt, sich unter Modifizierung ihres Phänotyps aus ihrem bisherigen Zellverband zu lösen, Matrixbestandteile zu degradieren und letztlich aktiv entlang eines chemotaktischen Gradienten zu migrieren. Des Weiteren sind Proliferationsprozesse von großer Bedeutung, da es gilt, einen Gewebedefekt aufzufüllen und ein entsprechendes Reservoir migrationsfähiger Zellen bereitzustellen. Dermalen Fibroblasten kommt in dieser Heilungsphase die wichtige Aufgabe zu, die extrazelluläre Matrix neu aufzubauen und das Einwachsen der Zellen zu unterstützen. Dirigiert werden diese Prozesse durch verschiedene Mediatoren, bei deren Bereitstellung Wundmakrophagen eine zentrale Position einnehmen (vgl. Kap 2.1).

Besonders faszinierend und von hoher Relevanz für einen raschen Heilungserfolg sind Vorgänge, die zur Reepithelialisierung führen. Das Schließen der Wunde durch ein starkes Neoepithel ist dabei ausschlaggebend für die Keimfreiheit des Wundbetts und wirkt somit entscheidend einer Chronifizierung der Entzündungssituation entgegen. Bereits innerhalb weniger Stunden nach Verwundung erfahren basale Wundrandkeratinozyten eine drastische Änderung ihrer Zellform und ihres Grundmetabolismus. Als Trigger stehen verschiedene Faktoren zur Diskussion, wie zum Beispiel der Kontakt zu

dermalen Matrixproteinen (Kollagen I und III), der Abriss von Zell-Zell-Kontakten oder das Binden verschiedener Mediatoren an Rezeptoren der Zelloberfläche [Kirfel und Herzog 2004]. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Zytokine und Mitogene wie IL-6, EGF, TGF- $\alpha$ , *keratinocyte growth factor* (KGF, syn: FGF-7), TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 3, *macrophage-stimulating protein* (MSP) und *hepatocyte growth factor* (HGF) an der Induktion der Keratinozytenmigration potenziell beteiligt sind [Nishida *et al.* 1992; Werner 1998; Sano *et al.* 1999; Decline *et al.* 2003; Santoro *et al.* 2003; Bandyopadhyay *et al.* 2006; Li *et al.* 2006]. Dabei scheinen auf transkriptioneller Ebene insbesondere die Faktoren *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-3, *activator protein* (AP)-1, *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) $\beta/\delta$  und *small mothers against decapentaplegic* (SMAD)-3 eine zentrale Rolle in der Initiierung, aber auch Hemmung der Regulation migrationsrelevanter Gene einzunehmen [Sano *et al.* 1999; Ashcroft *et al.* 1999; Li *et al.* 2003; Tan *et al.* 2005; Tokumaru *et al.* 2005a; Nagai *et al.* 2007]. Als Konsequenz verlagert sich der Phänotyp des Keratinozyten vom stationären, residenten Typus hin zur aktiv migrierenden Zelle [Ortonne *et al.* 1981]. Dieser Übergang wird definiert durch die Reorganisation des Zytoskeletts, die Auflösung zahlreicher interzellulärer Desmosomen sowie hemidesmosomaler Verankerungen in der Basalmembran, die Änderung der Zellpolarität mit der Ausbildung so genannter Lamellipodia und die Synthese eines komplexen, multifunktionellen Integrinensembles auf der Zelloberfläche, das die Zelle befähigt, sowohl mit dermalen Matrixproteinen der Wundrandbereiche (Kollagen I) als auch mit Fasern des Fibrinthrombus (Fibrin, Fibronectin, Vitronectin) zu interagieren [Krawczyk und Wilgram 1973; Gabbiani *et al.* 1978; Larjava *et al.* 1993; Clark *et al.* 1996; Paladini *et al.* 1996; Kirfel und Herzog 2004; Santoro und Gaudino 2005]. Dabei separiert der migrierende Keratinozyt den trockenen Wundschorf von dem darunterliegenden Gewebe und wandert, geführt durch das spezifische Spektrum transmembranärer Integrine, auf vitalem Granulationsgewebe in Richtung Wundmitte [Singer und Clark 1999]. In diesem Kontext ist es wichtig zu erwähnen, dass migrierende Keratinozyten nicht nach bekanntem Muster ausdifferenzieren, sondern Keratine synthetisieren, die für basale Zellen typisch sind (Zytokeratin 5 und 14) [Hertle *et al.* 1992; Patel *et al.* 2006].

Es gibt Studien, aus denen hervorgeht, dass neben basalen Keratinozyten auch suprabasale Zellen am Migrationsprozess partizipieren, indem sie nach Herunterregulation

ihrer Desmosomen über adhärenente basale Zellen hinweg migrieren („leap-frogging“-Theorie) [Garlick und Taichman 1994]. Andere Gruppen favorisieren die „tractor tread“- Variante, bei der davon ausgegangen wird, dass der aktiv migrierende, führende basale Keratinozyt, einer Zugmaschine gleich, basale Nachbarzellen unter Aufrechterhaltung interzellulärer Verankerungen nach sich zieht [Patel *et al.* 2006]. Unumstritten bleibt jedoch die Tatsache, dass sich migrierende Zellen dazu eines Systems proteolytischer Enzyme bedienen müssen, mit dessen Hilfe Bestandteile der provisorischen Wundmatrix in Migrationsrichtung degradiert werden. Dazu zählen diverse Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, -9 und 10) und die Plasmin-aktivierenden Serinproteasen t-PA und u-PA, deren Expression in Wundrandkeratinozyten hochreguliert ist [Martin 1997; Parks 1999].

Nur wenige Stunden nach dem Migrationsstart durchlaufen epidermale Zellen, die knapp hinter der führenden neopithelialen Zunge lokalisiert sind, einen massiven Proliferationsschub und sichern somit unter Ausbildung des so genannten *hyperproliferierenden Epithels* (HE) die kontinuierliche Verfügbarkeit des für einen raschen Wundschluss essentiellen Zelltyps [Matoltsy und Viziám 1970; Garlick und Taichman 1994]. Als potenzielle Stimuli kommen primär potente Wachstumsfaktoren wie KGF, TGF- $\alpha$ , EGF, *heparin-binding* EGF (HB-EGF) aber auch inflammatorische Zytokine wie IL-6 in Frage [Greenhalgh 1996; Martin 1997; Werner 1998; Sato, M. *et al.* 1999; Kim *et al.* 2001]. Durch den Wiederaufbau der Basalmembran sowie der Reorganisation der epithelialen Schichtung differenzierender Keratinozyten wird der Reepithelialisierungsprozess nach erfolgtem Wundschluss terminiert.

In etwa vier Tage nach Verwundung beginnt der Aufbau des Granulationsgewebes - das zunehmend die provisorische Wundmatrix ersetzt und sein granuläres Erscheinungsbild einer Vielzahl neuer Blutkapillaren verdankt - mit der Einwanderung dermalen Fibroblasten und Endothelzellen aus dem angrenzenden Parenchym (Abb. I.3) [Martin 1997; Singer und Clark 1999]. Dabei war die Ursache dieser viertägigen Latenz lange Zeit unklar, zumal bereits wenige Stunden nach Verwundung ein deutlicher Proliferationsschub in subkutanen Schichten zu beobachten ist. Offensichtlich bedarf es einer Aktivierung epidermaler und mesenchymaler Zellen der Wundrandbereiche und einer initialen, perivaskulären Ablagerung von Fibronectin durch hypertrophe Endothelzellen [Clark *et al.* 1982b; McClain *et al.* 1996; Greiling und Clark 1997; Werner *et al.* 2007].

Prädominierender Zelltyp dieses Heilungsabschnitts sind neben endothelialen Zellen dermale Fibroblasten, die aufgrund ihres profibrotischen Phänotyps maßgeblich für die Synthese und Remodellierung der ECM verantwortlich sind [Li *et al.* 2007]. Voraussetzung für die Migration in das Wundgewebe sowie die Substitution der provisorischen Matrix ist erneut ein System proteolytischer Enzyme, das neben Plasmin vor allem Kollagenase 1, Gelatinase A und B, Stromelysin 1 und Kollagenase 3 (MMP-1, -2, -3, -9; -13) einschließt [Vaalamo *et al.* 1997; Madlener 1998]. Neben Wachstumsfaktoren wie EGF, FGF-1, -2, -4, IGF-1 zählen TGF- $\beta$ 1 und PDGF zu den potentesten und wichtigsten Mediatoren der Fibroblastenproliferation, -migration, -differenzierung sowie der ECM-Synthese im Granulationsgewebe. Dabei repräsentieren aktivierte Wundmakrophagen zusätzlich zu Keratinozyten, Endothelzellen und Fibroblasten selbst die zentrale Quelle eines Großteils der genannten Faktoren [Martin *et al.* 1997]. Initiator der Wundangiogenese sind in erster Linie hypoxische Verhältnisse im Wundareal, die eine Sekretionskaskade proangiogener Substanzen auslösen. Erneut treten aktivierte Makrophagen und auch Epithelzellen neben Endothelzellen als potenteste Quellen der Mediatoren VEGF und *acidic* und *basic* FGF (aFGF, bFGF) in Aktion. Darüber hinaus kennt man inzwischen eine Vielzahl weiterer Substanzen wie Angiogenin oder Thrombospondin, deren Wirkspektrum in der Synthese von bFGF und VEGF zu münden scheint [Singer und Clark 1999]. Mit dem Ziel einer effizienten Nährstoffversorgung des metabolisch hochaktiven Wundgewebes kommt es dabei zur Generierung einer übernormalen Kapillardichte, die sich in Folge des Wundschlusses durch den programmierten Zelltod (Apoptose) einiger Endothelzellen wieder normalisiert [Singer und Clark 1999]. Dieser Vorgang ist bereits Bestandteil der finalen Remodellierungsphase.

### **2.3 Remodellierung: Neuordnung der Matrix und Vernarbung**

Die abschließende Heilungsphase, die bis zu ihrer Vollendung durchaus mehrere Monate beanspruchen kann, hat zum Ziel, die in vorangegangenen Phasen überproportional aufgebaute Kapillar- und Zelldichte mittels Apoptose zu normalisieren, die Wunde zu kontrahieren und dem Gewebe unter Remodellierung der ECM eine maximale mechanische Belastbarkeit zu verschaffen (Substitution eines Großteils der Kollagen III-Fasern durch massive Kollagen I-Fibrillen). Im Gegensatz zu embryonaler Wundheilung resultiert diese Phase im adulten Organismus dennoch in einer Vernarbung des

ursprünglichen Wundareals [Sullivan *et al.* 1995]. Verantwortlich dafür ist offensichtlich die Balance zwischen den Isoformen TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 [Shah *et al.* 1995; O’Kane und Ferguson 1997]. Im Mittelpunkt dieser Heilungsphase stehen erneut Fibroblasten, von denen eine Subpopulation unter dem regulatorischen Einfluss von TGF- $\beta$  und anderen Faktoren zu kontraktilen Myofibroblasten differenziert [Hinz 2007]. Die Tatsache, dass, verglichen mit Myofibroblasten, nur wenige Zellen des gesamten Säugetierorganismus eine höhere Konzentration an Actinomyosin aufweisen [Li *et al.* 2007], deutet eindrucksvoll auf ihre Aufgabe hin, die primär in einer effizienten Kontraktion der Wunde besteht.

Wie bereits erwähnt stellen Vorgänge, die zur Remodellierung des Wundareals dienen, einen langsamen, aber kontinuierlichen Gesamtprozess dar, der selbst nach mehreren Monaten noch fortbestehen kann, im adulten Organismus aber dennoch nie zur vollständigen Regeneration des Ursprungszustands führt.

### **3 Die Pathophysiologie chronischer Wunden**

#### **3.1 Gemeinsamkeiten in der Pathogenese chronischer Wundheilungsstörungen**

Das vorangegangene Kapitel hatte das Ziel, die enorme Dynamik und Komplexität des Wundheilungsprozesses unter Einteilung in interagierende Heilungsphasen vereinfacht darzustellen und dabei die Relevanz eines jeden Teilprozesses herauszuarbeiten. Betrachtet man allein die Vielzahl der beteiligten Zelltypen und die Variabilität regulatorischer Mechanismen, deren Zusammenspiel nur dann zu einem Heilungserfolg führt, wenn es gelingt, jeden Teilschritt präzise zu koordinieren und über das gesamte Wundareal zu synchronisieren, wird klar, dass ein solch komplexes System äußerst sensibel auf störende Faktoren reagieren kann. Aus diesem Grund existieren auf molekularer Ebene vielfach „Absicherungen“ in Form redundanter Mechanismen. So konnte gezeigt werden, dass beispielsweise der Knockout des Wachstumsfaktors TGF- $\alpha$  im Mausmodell zwar zu Abnormalitäten des Phänotyps führt, jedoch keinen signifikant negativen Einfluss auf die Abheilung von Vollhautexzisionswunden und Schwanzamputationen besitzt [Luetkeke *et al.* 1993]. Ein kompensatorischer Effekt durch andere EGF-Rezeptorliganden wurde in Folge postuliert. Dieselbe Hypothese kann zur Erklärung der

komplikationsfreien Abheilung von Inzisionswunden in KGF-Knockout-Mäusen herangezogen werden [Guo *et al.* 1996], denn erst die Neutralisierung des KGF-Rezeptors führt zu gravierenden Störungen der Reepithelialisierung [Werner *et al.* 1994]. Offensichtlich kann das Fehlen eines einzelnen Faktors häufig durch die Kreuzreaktivität/Ligandenredundanz anderer Mediatoren zumindest partiell kompensiert werden [Grose und Werner 2004]. Wunden heilen daher in vielen Fällen ohne größeren Zeitverzug ab.

**Tab. I.1: Übersicht verschiedener pathogener Faktoren, deren Zusammentreffen häufig zur Entstehung chronischer Wundheilungsstörungen führt**

Pathogene Faktoren	Ursachen und Folgen	Literatur
Ischämie	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ verursacht durch Mikro- und Makroangiopathien sowie wiederholte Drucktraumata</li> <li>■ führt zur Mangelversorgung und Hypoxie im entsprechenden Gewebe, Gewebnekrosen und insuffizienter Erregerabwehr</li> </ul>	McMahon & Grigg 1995 Kalani <i>et al.</i> 1999 Dinh & Veves 2005a/b
Ischämie-Reperfusionstraumata	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Membranschädigung, Expression endothelialer Adhäsionsproteine und Synthese proinflammatorischer Zytokine während der ischämischen Phase</li> <li>■ Leukozytenadhäsion, -aktivierung und -transmigration sowie Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies nach Reperfusion</li> </ul>	Peirce <i>et al.</i> 2000 Anaya-Prado <i>et al.</i> 2002 Toledo-Pereyra <i>et al.</i> 2004a/b
Wundinfektion	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ begünstigt durch Minderperfusion des Wundareals und defizitärer Reepithelialisierung</li> <li>■ kausaler Zusammenhang zu chronischem Entzündungsstatus mit möglicherweise gestörter Funktionalität leukozytärer Zellen</li> <li>■ Autokatalyse des Entzündungsgeschehens durch Prädominanz proinflammatorischer Zytokine</li> <li>■ exzessive Sekretion degenerativer MMP durch PMN</li> </ul>	Bessman <i>et al.</i> 1986 Lipsky und Berendt 2000 Mustoe 2004 Edwards und Harding 2004 Falanga 2004 und 2005 Mustoe <i>et al.</i> 2006 Bjarnsholt <i>et al.</i> 2007
Imbalance zwischen Proteinasen und Proteinaseinhibitoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Prädominanz degenerativer MMP gegenüber physiologischen Inhibitoren wie <math>\alpha</math>1-Antiprotease, <math>\alpha</math>2-Macroglobulin und TIMP</li> <li>■ dadurch massive Degradation neuer Matrix, proteinogener Wachstumsfaktoren (TGF-<math>\beta</math>, PDGF) und Fibronektin</li> </ul>	Bullen <i>et al.</i> 1995 Grinnell & Zhu 1996 Lobmann <i>et al.</i> 2002 & 2005
Wachstumsfaktor-"trapping"	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ mögliches Zurückhalten von Wachstumsfaktoren durch Binden an Makromoleküle aus dem Blutplasma</li> </ul>	Falanga & Eaglstein 1993 Higley <i>et al.</i> 1995
verfrühte Seneszenz von Fibroblasten und Keratinozyten	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ vorzeitiges Altern relevanter Zelltypen mit nachteiliger Veränderung ihres Phänotyps (Desensibilisierung gegenüber Wachstumsfaktoren und Verlust der Fähigkeit zur Zellmigration)</li> </ul>	Loot <i>et al.</i> 2002 Stojadinovic <i>et al.</i> 2005

MMP: Matrixmetalloproteinase; TIMP: *tissue inhibitors of MMP*; PMN: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Analysiert man nun die Ätiologie chronischer Wunden, die zu über 90% den 3 Hauptformen *Ulcus cruris*, *Dekubitus* und *diabetische Fußulzeration* zuzuordnen sind, fällt auf, dass es zur Chronifizierung der Heilungssituation in der Realität vielmehr des Zusammentreffens mehrerer intrinsischer und extrinsischer Faktoren bedarf, die zudem oft in Assoziation zu einer Grunderkrankung stehen. Diskutiert werden vor allem die in Tab. I.1 aufgeführten Faktoren, deren Relevanz für die Pathogenese der genannten Hauptformen chronischer Wundheilungsstörungen bestätigt werden konnte [Falanga 2005; Mustoe *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Menke *et al.* 2007].

Interessanterweise scheint eine massive Entzündungsreaktion, die durch die Persistenz von Neutrophilen und mononukleären Zellen begleitet wird, eine zentrale Komponente in der Kausalkette eines gestörten Heilungsgeschehens darzustellen [Rosner *et al.* 1995;

Loots *et al.* 1998; Wetzler *et al.* 2000a; Goren *et al.* 2003a; Diegelmann 2003]. Als mögliche Ursachen einer kontinuierlichen Rekrutierung und Aktivierung dieser Zellen gelten unter anderem wiederholte Drucktraumata, Ischämie-Reperfusionsschäden sowie eine progressive bakterielle Kontamination des Wundareals (vgl. Tab. I.1) [Robson 1997; Wall *et al.* 2002; Edmonds *et al.* 2004; Menke *et al.* 2007; Bjarnsholt *et al.* 2008]. Mehrere Gruppen berichten von einer positiven Korrelation zwischen einer Keimzahlreduktion, dem Rückgang der Entzündungsreaktion und einer deutlich verbesserten Heilungsprognose [Tregrove *et al.* 1999 und 2000; Mustoe 2004]. In anderen Arbeiten wird auf potente antiangiogene Eigenschaften bakterieller Adhäsionsproteine aus *Staphylococcus aureus* und deren Fähigkeit verwiesen, die humane Immunabwehr zu inhibieren und somit das weitere Vordringen bakterieller Erreger zu unterstützen [Chavakis *et al.* 2002; Athanasopoulos *et al.* 2006]. In der Konsequenz scheitern letztlich viele Wunden oder Wundteilbereiche im Übergang zur nächsten Heilungsphase und verfallen in einen abnormalen chronisch-entzündlichen Status [Loots *et al.* 1998]. Die enorme Zahl aktivierter Neutrophilen führt zu einem massiven Anstieg proteolytischer MMPs (vorwiegend MMP-8 und neutrophile Elastase), reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) und proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 im Wundareal [Weiss 1989; Wetzler *et al.* 2000a; Diegelmann 2003; Lobmann *et al.* 2002 und 2005; Wlaschek und Scharffetter-Kochanek 2005]. Letztere induzieren einen weiteren Syntheseschub degenerativer Proteinasen, involvieren und aktivieren Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen und verantworten die Herunterregulation verschiedener Proteinaseinhibitoren (TIMP). Neben dem überproportionalen Abbau provisorischer und neuer Matrixbestandteile äußert sich das Übergewicht destruktiver Enzymsysteme zusätzlich in der Degradation pivotaler Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF und VEGF [Grinnell *et al.* 1992; Frank *et al.* 1995; Wlaschek *et al.* 1997; Lauer *et al.* 2000 und 2002; Roth *et al.* 2006]. Mit hoher Wahrscheinlichkeit liegt darin auch die Ursache für das Scheitern klinischer Studien mit topisch applizierten rekombinanten Wachstumsfaktoren, von denen nur rhPDGF-BB (Becaplermin, Regranex<sup>®</sup>) eine Zulassung mit eingeschränkter Indikationsstellung erlangen konnte. Dennoch bleibt anzumerken, dass Becaplermin noch weit von einem routinemäßigen Einsatz in Standardtherapieprotokollen entfernt ist [Bennett *et al.* 2003; Brem *et al.* 2006].



Zusammenfassend kann postuliert werden, dass ein Großteil der beschriebenen pathogenen Entgleisungen physiologischer Mechanismen letztlich in einen proinflammatorischen *circulus vitiosus* münden, der sich autokatalytisch selbst unterhält.

### 3.2 Der diabetische Fußulkus

Diabetische Ulzerationen sind ein exzellentes Beispiel, um aufzuzeigen, wie rasch multiple physiologische und biochemische Defekte zu einem insuffizienten Heilungsverlauf führen können. Sie verdeutlichen gleichzeitig, welche enormen gesundheitlichen Risiken von chronischen Wunden ausgehen, in welchem Maße selbst die Gesundheitssysteme der westlichen Staaten belastet werden und wie wichtig es ist, frühzeitig präventiv zu agieren. Offensichtlich scheinen vor allem Maßnahmen zur Prävention unterschätzt zu werden, wenn man bedenkt, dass ca. 2/3 der erwachsenen US-Bürger übergewichtig bis adipös sind [Yosipovitch *et al.* 2007], obwohl ein klarer kausaler Zusammenhang zwischen einer Adipositas, dem metabolischen Syndrom und der Entstehung eines Typ II-Diabetes seit Jahren bekannt ist [Eckel *et al.* 2005]. Dennoch verdeutlichen mehrere Studien, in denen die weltweite Progredienz diabetischer Ulzerationen untersucht wird, dass es sich nicht ausschließlich um ein Problem der „Überfluggesellschaft“ hochentwickelter Industriestaaten handelt und verweisen auf eine stark zunehmende Zahl an Typ II-Diabetikern in Entwicklungsländern [Wild *et al.* 2004; Boulton 2004; Boulton *et al.* 2005].

Das weitaus größte Gesundheitsrisiko geht von einer Amputation der unteren Extremitäten aus. Dabei stellen diabetische Ulzerationen mit bis zu 85% die häufigste Ursache dieser finalen therapeutischen Maßnahme dar [Boulton 2004]. Hochrechnungen ergeben sogar, dass zwei der innerhalb einer Minute weltweit durchgeführten Amputationen auf diabetische Ulzerationen zurückzuführen sind und verdeutlichen die klinische Relevanz der Erkrankung [Boulton *et al.* 2005]. Nicht selten existiert aufgrund massiver Infektionen (Cellulitis, Osteomyelitis) keine alternative Therapieoption, wengleich die postoperative 3-Jahresüberlebenschance selbst bei intensiver medizinischer Betreuung bei nur rund 55% liegt [Jeffcoate und Harding 2003].

Es wurde bereits angedeutet, dass dem diabetischen Fußsyndrom eine multifaktorielle Pathogenese zu Grunde liegt. Mittlerweile kennt man über 100 physiologische Faktoren, die in die Pathophysiologie diabetischer Ulzera involviert sind [Brem und Tomic-

Canic 2007]. Zum besseren Verständnis der Kausalkette kann man diese zunächst in prädisponierende Faktoren einteilen, die eine Verletzung begünstigen und solche, die die Abheilung der bereits existenten Wunde kompromittieren. Von zentraler Relevanz für die Entstehung diabetischer Wunden sind periphere sensorische, aber auch motorische und vasomotorische Neuropathien, deren Ursache im abnormalen Metabolismus (Hyperglykämie) der diabetischen Grunderkrankung liegt [Greene *et al.* 1999]. In der Folge kommt es zu rezidivierenden traumatischen Ereignissen begründet durch sensorische Desensibilisierung der unteren Extremitäten, zu gestörter Regulation der Blutzirkulation sowie motorisch bedingten Fehlstellungen und Fehlbelastungen der Füße, die zur Kallusbildung und dem typischen Wundbild führen [Jeffcoate und Harding 2003; Boulton 2004]. Hinzu kommen atherosklerotische Makroangiopathien und Störungen der Mikrozirkulation struktureller und funktioneller Genese, die in ischämischer, trockener und rissiger Haut resultieren, deren Verletzungs- und Infektionsrisiko in der Konsequenz enorm steigt [Schramm *et al.* 2006; Korzon-Burakowska und Edmonds 2006]. Nach Verletzung tragen mehrere sekundäre, aber auch die eben aufgeführten prädisponierenden Faktoren zur Chronifizierung der Heilungsverzögerung bei. Neben dem bereits erwähnten hohen Infektionsrisiko, der fehlregulierten Entzündungssituation [Loots *et al.* 1998; Wetzler *et al.* 2000a; Kämpfer *et al.* 2005; Goren *et al.* 2003a und 2006b; Ochoa *et al.* 2007] sowie der daraus abzuleitenden Konsequenzen (vgl. Kap. 3.1) stehen mittlerweile unzählige lokale und systemische, biochemische und zelluläre Veränderungen im Verdacht, den Heilungsfortschritt zu blockieren. So konnte durch die systemische Neutralisierung von TNF- $\alpha$  unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (V1q) die Wundheilungssituation in diabetischen *ob/ob*-Mäusen deutlich verbessert werden [Goren *et al.* 2006c und 2007]. Interessanterweise war dies mit hoher Wahrscheinlichkeit primär auf eine Depletierung zirkulierender Monozyten und lokaler Wundmakrophagen zurückzuführen, die TNF- $\alpha$  membrangebunden exponierten [Goren *et al.* 2007]. Neben der deutlichen Reduktion der Entzündungsantwort konnte in diesen Versuchen auch eine markante, lokale Hochregulation der Insulinrezeptorexpression im Wundgewebe bei unveränderter Persistenz des diabetischen Phänotyps nachgewiesen werden [Goren *et al.* 2006c und 2007]. Die Relevanz einer adäquaten, vitalen Insulinsensitivität vor allem für Zellproliferation und Zelldifferenzierung ist spätestens seit dem Knockout des Insulinrezeptors bekannt [Wertheimer *et al.* 2001; Spravchikov

*et al.* 2001; Thrash *et al.* 2006]. In diesem Kontext sind auch Vertreter der intrazellulären *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-Familie interessant. So konnte für die Proteine SOCS1, 3, 6 und 7 gezeigt werden, dass sie in Adipo- und Hepatozyten in die Entstehung einer Insulinresistenz funktionell involviert sind [Emanuelli *et al.* 2001; Rui *et al.* 2002; Howard und Flier 2006; Liu *et al.* 2008]. Letztlich konnten mehrere Studien aufzeigen, dass diabetische Wunden häufig durch eine gestörte Verfügbarkeit und insuffiziente Verteilung relevanter Wachstumsfaktoren wie VEGF, TGF- $\beta$  und IGF-1 gekennzeichnet sind, was in einer unzureichenden mitotischen, migratorischen und angiogenen Aktivität entsprechender responsiver Zellen resultiert [Frank *et al.* 1995; Bitar und Labbad 1996; Blakytyn *et al.* 2000; Lauer *et al.* 2000; Stallmeyer *et al.* 2001].

#### **4 Mechanismen zur Kontrolle der Entzündungsreaktion im Wundheilungsprozess**

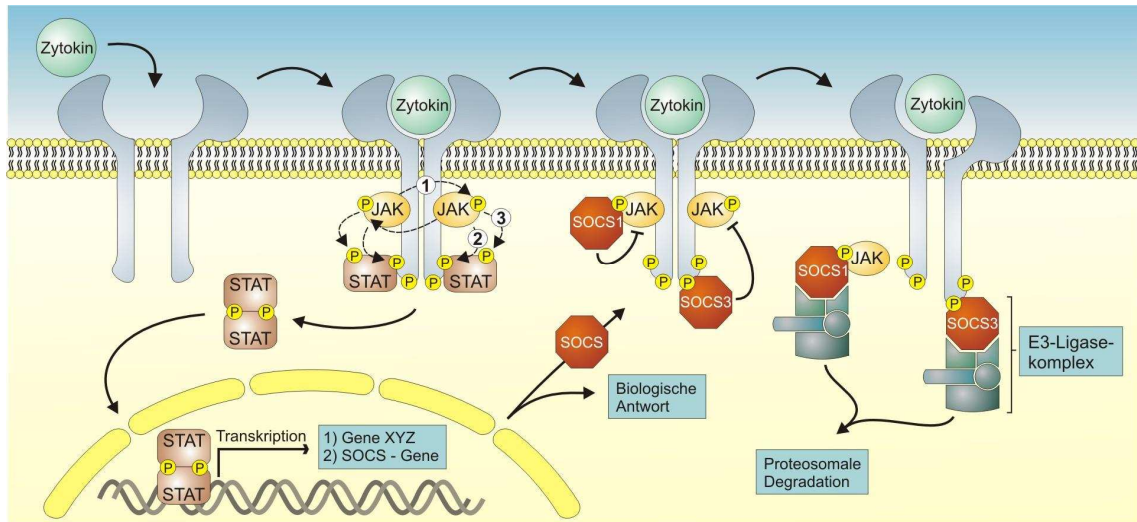
Obwohl das Phänomen der Entzündung bereits vor über 3000 Jahren erstmals Erwähnung fand und das Wissen über zu Grunde liegende Mechanismen unter anderem durch die fundamentalen Arbeiten von Rudolf Virchow oder Ilja Metchnikoff ständig gestiegen ist, war lange unklar, welche Vorgänge zur Auflösung einer Entzündungsantwort führen [Henson 2005]. Erst innerhalb der letzten 30 Jahre gelangte man zu der Erkenntnis, dass es sich dabei um ein Netzwerk aktiver Prozesse handelt, dessen Startsequenz bereits wenige Stunden nach dem Ausbruch der Entzündung initiiert wird [Serhan und Savill 2005]. Zu diesem Netzwerk zählt eine Vielzahl von Teilprozessen, wobei klar zu sein scheint, dass deren primäres gemeinsames Ziel in einer Verringerung der Zahl aktivierter proentzündlicher Leukozyten am Entzündungsort definiert ist. Von übergeordneter Bedeutung für die Realisierung dieser Zielsetzung sind daher Prozesse, die zur Reduktion von Vasodilatation und Gefäßpermeabilität, zur Herunterregulation chemotaktischer Signale (IL-8/MIP-2, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1) und endothelialer Adhäsionsproteine (E-/P-Selektin, *very late antigen* (VLA)-1, ICAM-1, VCAM-1) sowie zur aktiven Eliminierung lokaler proinflammatorischer Zellen führen [Ayala *et al.* 2003; Henson 2005; Luster *et al.* 2005]. An der Umsetzung dieser Kernprozesse sind wiederum verschiedene Mechanismen beteiligt, wie zum Beispiel die Aktivierung immunsuppressiver T-Zellen, die Veränderungen der Expression co-stimulatorischer (CD40) oder inhibitorischer Adhäsionsproteine (CD44, CD45), die allgemeine Herunterregulation der Rezeptordichte

infolge hoher Ligandenkonzentrationen, die Sekretion löslicher Zytokinrezeptoren wie IL-1RII und TNF-RI/II, der gesteuerte Zelltod (Apoptose) proinflammatorischer Zellklassen sowie nicht zuletzt die Clearance apoptotischer Zellen durch Phagozyten [Greenhalgh 1998; Teder *et al.* 2002; Ayala *et al.* 2003; Serhan und Savill 2005; Anwar und Whyte 2007; Eming *et al.* 2007; Hart *et al.* 2008]. Als zentrale Mediatoren für die Initiierung und Regulation dieser Mechanismen sind neben Glucocorticoiden, Catecholaminen und E-Prostaglandinen in erster Linie antiinflammatorische Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL-1-Rezeptorantagonist, IL-4 und IL-10 zu nennen. Von äquivalenter Relevanz sind intrazelluläre Mechanismen, die eine enge Kontrolle der Signaltransduktion relevanter Zytokine in responsiven Zellen verantworten (SOCS-Proteine). Sie ermöglichen somit, das Ausmaß der Transkription zytokinregulierter Gene sowie die proentzündliche Polarisierung von Lymphozyten/ Leukozyten maßgeblich zu beeinflussen.

#### **4.1 Das JAK-STAT-Paradigma und die Familie der *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS)**

Es ist bekannt, dass Zytokine nicht nur für die Initiierung der Wundheilung, sondern auch für die Regulation weiterer fundamentaler biologischer Prozesse wie Proliferation, Immunität und Hämatopoese von essentieller Bedeutung sind [Krebs und Hilton 2001; O'Sullivan *et al.* 2007; Murray 2007]. Um dieser Funktionsbreite gerecht zu werden, existieren sehr viele Zytokinrezeptorkombinationen, deren größte Untergruppe (hämatopoetische Rezeptoren der Klassen I und II) schon allein ca. 41 verschiedene Rezeptorvarianten kennt [O'Sullivan *et al.* 2007]. Im Gegensatz zu den ca. 20 im humanen Genom bekannten Rezeptortyrosinkinasen (Insulin-, EGF-, VEGF-, PDGF-, FGF-Rezeptoren u.a.) besitzen hämatopoetische Rezeptoren keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität [Robinson *et al.* 2000]. Anstelle dessen wird diese durch rezeptorassoziierte *Janus*-Kinasen bereitgestellt (Abb. I.4). Interessanterweise reduziert sich die Signaltransduktion trotz der Vielzahl hämatopoetischer Rezeptoren dennoch auf nur 4 *Janus*-Kinasen (JAK1-3 und TYK2), gefolgt von 7 STAT-Proteinen (STAT1-5a, 5b-6), wobei die Mehrheit der Zytokinrezeptoren nur 3 der 10 möglichen JAK-Kombinationen nutzt [Murray 2007]. Wie es trotzdem nach Aktivierung identischer STAT-Transkriptionsfaktoren zu einer zellspezifischen Transkription zytokinspezifischer Gene mit zum Teil gegensätzlicher Funktionalität kommt, ist in der Literatur nur ansatzweise geklärt.

Möglicherweise spielen SOCS-Proteine aus der negativen Rückkopplungsschleife der JAK-STAT-Signalkaskade eine entscheidende Rolle, wie am Beispiel von SOCS3 und der Signaltransduktion nach IL-6 und IL-10-Stimulation in Makrophagen gezeigt werden konnte [Niemand *et al.* 2003; Yasukawa *et al.* 2003; El Kasmi *et al.* 2006].



**Abb. I.4: Schematische Darstellung der JAK-STAT-Signalkaskade und deren Hemmung durch negative Rückkopplung über SOCS-Proteine**

Die verschiedenen Angriffspunkte inhibitorischer SOCS-Proteine sind anhand von SOCS1 und SOCS3 schematisch aufgezeigt. Die Transkription der SOCS-Gene wie auch die weiterer Zytokin-regulierter Zielgene wird über STAT-Proteine vermittelt. Neuere Arbeiten diskutieren die Notwendigkeit einer Dimerisierung dieser STAT-Proteine für ihre transkriptionelle Aktivität (vgl. Text). JAK: *Janus-Kinase*; STAT: *signal transducer and activator of transcription*; SOCS: *suppressor of cytokine signaling*

Einer Expression von SOCS-Proteinen geht jedoch im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten intrazellulären Inhibitoren des Zytokinensignalweges PIAS (*protein inhibitors of activated STATs*) und SHP (*SH2-containing phosphatases*) eine Ligandenaktivierung des transmembranären Zytokinrezeptors voraus, die zur Oligomerisierung der Rezeptoruntereinheiten führt (Abb. I.4) [Wormald und Hilton 2004]. In Folge transphosphorylieren sich assoziierte oder rekrutierte JAKs in Juxtaposition zunächst selbst, um anschließend durch Phosphorylierung von Tyrosinresten an der zytoplasmatischen Rezeptordomäne Bindungsstellen für Proteine zu generieren, die über *Src homology 2* (SH2)-Domänen verfügen. Vertreter der STAT-Familie besitzen eine solche Domäne und binden am Rezeptor, werden phosphoryliert und translozieren anschließend als Homo- bzw. Heterodimer oder möglicherweise auch als Monomer in den Zellkern, um die Transkription zytokinregulierter Gene zu initiieren [Murray 2007]. Unter anderem kommt es nun zur Induktion von Proteinen der SOCS-Familie, die dank ihres meist

pleiotropischen Aktionsradius' zentraler Bestandteil der negativen Rückkopplungsschleife sind. Die Familie umfasst 8 Mitglieder (SOCS1-7 und das *cytokine-inducible SH2-containing protein* (CIS)), die sich alle durch eine zentrale SH2-Domäne auszeichnen. Diese Domäne wird aminoterminal durch eine Domäne variabler Länge und Sequenz und C-terminal durch ein konserviertes Motiv flankiert, das als SOCS-Box bekannt ist. Jede dieser Domänen ist offensichtlich in die Blockade der Signaltransduktion hämatopoetischer Rezeptoren involviert. So bindet beispielsweise SOCS1 über die SH2-Domäne direkt an JAK2 und hemmt deren Tyrosinkinaseaktivität wahrscheinlich über eine *kinase inhibiting region* (KIR) der N-terminalen Domäne [Kubo *et al.* 2003; Yoshimura *et al.* 2007]. Dieser Mechanismus wird auch für SOCS3 postuliert, wobei ebenso gezeigt werden konnte, dass SOCS3 mit hoher Affinität direkt an die gp130 Untereinheit eines Klasse I-Rezeptors (Y759) bindet und somit die Bindestelle möglicherweise kompetitiv hemmt [Kubo *et al.* 2003]. Gesichert scheint dagegen die Funktion der SOCS-Box, die das Elongin C bindet und nach Assoziation mit Elongin B, Cullin-5 und RBX2 eine E3-Ubiquitinligase darstellt, die über den N-Terminus/SH2-Domäne gebundene Proteine der Signalkaskade polyubiquitiniert lässt [Kamura *et al.* 2004]. Derartig derivatisierte Proteine werden im Proteasomkomplex degradiert. SOCS-Proteine werden in den meisten hämatopoetischen Geweben exprimiert. Für SOCS3 konnten erhöhte mRNA-Expressionsspiegel in Lunge, Milz, Fettgewebe, aber auch im epidermalen Kompartiment gezeigt werden [Starr *et al.* 1997; Tollet-Egnell *et al.* 1999; Goren *et al.* 2006a]. Die Expression ist transkriptionell eng reguliert, die Proteine werden rasch proteosomal abgebaut und bedürfen keiner zusätzlichen Aktivierung durch Phosphorylierung. Dennoch verweisen Studien darauf, dass Phosphorylierungen stattfinden, wobei deren Funktionalität teilweise geklärt scheint [Cacalano *et al.* 2001; Peraldi *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002; Peltola *et al.* 2004; Qasimi *et al.* 2006].

## 4.2 SOCS-Proteine und deren Rolle in pathophysiologischen Veränderungen

Die große physiologische Relevanz einer effizienten Kontrolle der Zytokinrezeptorsignaltransduktion durch Proteine der SOCS-Familie konnte anhand verschiedener Knockout-Mausmodelle eindrucksvoll belegt werden. Der Knockout von SOCS1 oder SOCS3 ist perinatal bzw. bereits embryonal letal [Marine *et al.* 1999a/b; Roberts *et al.*

2001]. Der Verlust von SOCS2 resultiert in ausgeprägtem Gigantismus infolge abnormaler Resonanz auf das Wachstumshormon (GH) und IGF-1 [Metcalf *et al.* 2000]. Es ist somit nicht verwunderlich, dass Proteine, die eine solche Schlüsselposition einnehmen, in die Pathogenese verschiedener entzündlicher und maligner Erkrankungen involviert sind. Besonders bedeutsam scheinen dabei pleiotrope Rezeptorblockaden (SOCS3-vermittelte Insulin- und Leptinresistenz) sowie eine insuffiziente Attenuierung exzessiver STAT-Aktivierung bei chronischen Infektionskrankheiten sowie malignen Erkrankungen zu sein. In Tabelle Tab. I.2 sind einige Beispiele zusammengefasst.

**Tab. I.2: Übersicht einer Auswahl pathogener Veränderungen in der JAK-STAT-SOCS-Signalkaskade im Kontext metabolischer, entzündlicher und maligner Erkrankungen**

Erkrankungen	Fehlgeregulierte Signalkomponenten	Literatur	
Metabolisches Syndrom	Insulinresistenz SOCS1 SOCS3 SOCS6 SOCS7	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Blockade von Bindungsstellen am Insulinrezeptor</li> <li>■ SOCS3-vermittelte Degradation von IRS1 und IRS2</li> <li>■ SOCS3-Überexpression im Fettgewebe führt zu lokaler Insulinresistenz</li> </ul>	Emanuelli <i>et al.</i> 2001 Mooney <i>et al.</i> 2001 Rui <i>et al.</i> 2002 Banks <i>et al.</i> 2005 Shi <i>et al.</i> 2006
	Leptinresistenz SOCS3	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ spezifischer neuronaler SOCS3-knockout und SOCS3-Haploinsuffizienz schützt vor HFD-induzierter Adipositas bei gleichbleibender Insulinsensitivität</li> </ul>	Bjorbaek <i>et al.</i> 1998 Howard <i>et al.</i> 2004 Mori H. <i>et al.</i> 2004
Entzündliche Erkrankungen	Atopisches Asthma Atopische Dermatitis Allergische Konjunktivitis (AK) SOCS1 SOCS3 SOCS5	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ SOCS3 reguliert und erhält T<sub>H</sub>2-vermittelte allergische Reaktionen</li> <li>■ SOCS3-Überexpression in Hautläsionen von AD-Patienten</li> <li>■ Korrelation zwischen SOCS3-Expression und Schweregrad der Erkrankung bei Patienten mit AK</li> <li>■ SOCS1-Genpolymorphismus bei Asthmapatienten</li> </ul>	Seki <i>et al.</i> 2003 Arakawa <i>et al.</i> 2004 Sano <i>et al.</i> 2004 Ozaki <i>et al.</i> 2005 Harada <i>et al.</i> 2006
	Psoriasis STAT3	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ konstitutive Aktivierung von STAT3 in Keratinozyten</li> </ul>	Sano <i>et al.</i> 2005
	Morbus Crohn Colitis ulcerosa SOCS3 STAT3 STAT4	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ konstitutive Aktivierung von SOCS3/STAT3/STAT4 in intestinalen T-Zellen bei Morbus Crohn-Patienten</li> <li>■ massive Aktivierung von STAT3 in Schleimhautbiopsien von Colitis ulcerosa-Patienten</li> </ul>	Suzuki <i>et al.</i> 2001 Lovato <i>et al.</i> 2003
	COPD STAT4	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ hohe STAT4-Aktivierung korreliert mit dem Grad der Atemwegsobstruktion</li> </ul>	Di Stefano <i>et al.</i> 2004
	Rheumatoide Arthritis STAT3	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ konstitutive Aktivierung von STAT3 in synovialen Fibroblasten</li> </ul>	Shouda <i>et al.</i> 2001
Maligne Erkrankungen	EBV-Lymphom STAT1	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ konstitutive Aktivierung von STAT1</li> </ul>	Weber-Nordt <i>et al.</i> 1996
	Morbus Hodgkin SOCS1 STAT5	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Mutation im SOCS1-Gen führt zu fehlgeregelter STAT5-Aktivierung</li> </ul>	Melzner <i>et al.</i> 2005 Weniger <i>et al.</i> 2006
	HCC SOCS1 SOCS3	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ CpG-Hypermethylierung im SOCS1 und SOCS3-Gen</li> <li>■ Hepatozyten-spezifischer SOCS3-k.o. resultiert in STAT3-vermitteltem Zellwachstum und HCV-induzierter Kanzerogenese</li> <li>■ adenovirales SOCS3 unterdrückt HCC-Tumorzellproliferation</li> </ul>	Yoshikawa <i>et al.</i> 2001 Niwa <i>et al.</i> 2005 Ogata <i>et al.</i> 2006 Cui <i>et al.</i> 2008

IRS: Insulinrezeptorsubstrat; HFD: Hochfett-diät; AD: Atopische Dermatitis; COPD: Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung; EBV: Epstein-Barr-Virus; HCC: Leberzellkarzinom; HCV: Hepatitis C-Virus

### 4.3 TGF-β als prototypisches antiinflammatorisches Zytokin im Kontext der Wundheilung

Die TGF-β -„Superfamilie“ umfasst ein komplexes Spektrum pluripotenter Zytokine, die entscheidend an der Aufrechterhaltung der Homöostase mitwirken und von großer Bedeutung für Zellwachstum, Differenzierung, Entwicklung und eine effiziente Wund-

heilung sind. Zu ihr gehören neben den in Säugetieren bekannten und zu 64-85% homologen Isoformen TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 die so genannten *bone morphigenic proteins* (BMPs), die *mullerian inhibiting substance* (MIS), Nodal, Aktivine und Inhibine [Massague 1990; O’Kane *et al.* 1997]. Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit unterscheiden sie sich *in vivo* teilweise deutlich in ihrer Funktionalität.

Die erwähnten TGF- $\beta$ -Isoformen werden als Vorstufen sezerniert und bilden mit dem so genannten *latency-associated protein* (LAP) und dem *latent TGF- $\beta$ -binding protein* (LTBP) einen latenten Proteinkomplex, der als extrazelluläres Reservoir die kontinuierliche Verfügbarkeit des Zytokins im entsprechenden Gewebeareal sicherstellt [Miyazono *et al.* 1991]. Erst nach proteolytischer Spaltung des Komplexes (u.a. durch Plasmin, Thrombospondin-1) liegt der Wachstumsfaktor in freier und aktivierter Form vor. Er bindet nun entweder an makromolekulare Matrixbestandteile (Decorin, Fibromodulin) oder an den TGF- $\beta$ -Rezeptor III, der das Zytokin schließlich den signaltransduzierenden Rezeptortypen I und II präsentiert [Werner und Grose 2003]. Nach dem Binden an den resultierenden heteromeren Rezeptorkomplex erzielen alle TGF- $\beta$ -Isoformen ihre biologische Wirkung primär über eine intrazelluläre Signalkaskade, die über aktivierende und inhibitorische SMAD-Proteine vermittelt wird [Derynck *et al.* 1998; Miyazono 2000].

Neben Thrombozyten und aktivierten Wundmakrophagen sind auch Neutrophile, Fibroblasten und Keratinozyten des Wundareals an der Synthese von TGF- $\beta$  beteiligt und sorgen für eine deutliche Induktion nach Verwundung [Schmid *et al.* 1993; Frank *et al.* 1996; Cowin *et al.* 2001]. Es konnte zudem in verschiedenen Modellen gezeigt werden, dass die Isoformen differenziell exprimiert werden. Während TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 in der Akutphase prädominieren, konnte erst in der Spätphase der Heilung ein Anstieg der TGF- $\beta$ 3-Isoform detektiert werden, so dass eine Cross-Regulation der Isoformen  $\beta$ 1 und  $\beta$ 3 postuliert wurde [Frank *et al.* 1996; O’Kane *et al.* 1997; Werner und Grose 2003]. Eine Störung dieser spezifischen Expressionskinetik bezüglich der Amplitude einer Isoform, aber auch bezüglich der Balance der Isoformen untereinander, wird daher nicht nur als Ursache für fibrotische Komplikationen und eine prominente Narbenbildung (TGF- $\beta$ 1>TGF- $\beta$ 3) diskutiert, sondern auch als Grund für ein ineffizientes und chronisches Heilungsgeschehen gewertet [Schmid *et al.* 1993; Shah *et al.* 1995; Frank *et al.* 1996; Cowin *et al.* 2001; Jude *et al.* 2002].



In Kapitel 2 ist bereits detailliert auf die Schlüsselfunktion von TGF- $\beta$  für alle Phasen des Heilungsprozesses eingegangen worden. Im Kontext antiinflammatorischer Mechanismen soll daher im Folgenden kurz auf die immunmodulatorischen Eigenschaften von TGF- $\beta$ 1 eingegangen werden. TGF- $\beta$ 1 spielt während des Heilungsprozesses eine einzigartige Rolle in der Initiierung und Regulation der Immunabwehr, was durch den multifokal entzündlichen Phänotyp der TGF- $\beta$ 1 Knockout-Maus eindrucksvoll bestätigt werden konnte (der Knockout der Isoformen  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 ist postnatal letal) [Kulkarni *et al.* 1993; Christ *et al.* 1994; Proetzel *et al.* 1995; Sanford *et al.* 1997]. Die hohe antiinflammatorische Potenz dieses Zytokins beruht dabei auf einer Vielzahl immunsuppressiver Mechanismen. So hemmt TGF- $\beta$  beispielsweise die Proliferation und IFN- $\gamma$ -Sekretion aktivierter T-Zellen und vermittelt deren Apoptose [Mendez-Samperio *et al.* 2000; Wahl *et al.* 2000; Sillett *et al.* 2001]. Als chemotaktisches Zytokin rekrutiert es Makrophagen, die das Wundareal von apoptotischen proinflammatorischen Leukozyten befreien und hemmt zudem in Kombination mit Prostaglandin (PG)-E2 und dem plättchenaktivierenden Faktor (PAF) über einen auto-/parakrinen Regelkreis die Produktion proinflammatorischer Zytokine [Fadok *et al.* 1998; Werner *et al.* 2000]. Dennoch ist bekannt, dass die pluripotenten regulatorischen Effekte auf Immunzellen durchaus widersprüchlich erscheinen und teilweise massiv vom Zelltyp und dem Differenzierungsstatus der betreffenden Zelle abhängen [Ashcroft 1999; Ling und Robinson 2002]. So überwiegt in der Initialphase einer Entzündung deutlich der proinflammatorische Phänotyp des Zytokins (vgl. Kap. 2.1). Wundheilungsstudien mit TGF- $\beta$ 1 überexprimierenden Mäusen (unter einem Keratin 5-Promoter) resultierten in einer Verzögerung der Heilung, die in allen Phasen durch eine profunde Entzündung gekennzeichnet war und bestätigen die proinflammatorische Potenz von TGF- $\beta$  [Wang *et al.* 2006].

## 5 Zielsetzung der Arbeit

Mit dem Ziel einer effizienten Regeneration des verletzten Gewebes stellt der Prozess der kutanen Wundheilung eine hochkomplexe Verkettung ineinander übergehender Heilungsphasen dar. Dabei besitzt die akute Entzündungsphase eine besondere Bedeutung für die koordinierte Initiierung des Regenerationsprozesses [Martin 1997; Singer und Clark 1999]. Im gesunden Organismus ist diese Phase in ihrer Amplitude und zeitlichen Ausdehnung eng reguliert, um einer überschießenden chronischen Entzündungssituation, die in Assoziation zu pathologisch veränderten Heilungsbedingungen steht [Loots *et al.* 1998; Wetzler *et al.* 2000a; Goren *et al.* 2003a; Kämpfer *et al.* 2005], entgegenzuwirken. Trotz der Erkenntnis, dass Proteine aus der Familie der *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) maßgeblich an der intrazellulären Dämpfung zytokinvermittelter proentzündlicher Signale beteiligt sind, existieren bislang keine Studien, die sich gezielt mit der Regulation dieser Proteine während der kutanen Wundheilung und deren grundlegende Bedeutung für den Heilungsprozess befassen. Besonders interessant schien das Protein SOCS3 zu sein, das bereits als zentraler Baustein in der Pathogenese verschiedener entzündlich-pathologischer Veränderungen in der Haut diskutiert wurde [Seki *et al.* 2003; Horiuchi *et al.* 2006].

Das Primärziel der Arbeit bestand somit in der Charakterisierung der SOCS3-Expressionskinetik während des kutanen Heilungsprozesses unter Verwendung eines bereits etablierten Wundmodells. Darüber hinaus sollten die im Wundareal an der Expression dieses Proteins partizipierenden Zelltypen identifiziert werden, um unter Umständen erste funktionelle Rückschlüsse ziehen zu können. Basis dieser initialen Untersuchungen sollten neben stoffwechselgesunden Mäusen auch diabetische *ob/ob*-Mäuse sein, deren Wundheilungsprozess bereits gut charakterisiert ist und deutliche Parallelen zum Wundbild chronisch-diabetischer Ulzerationen im humanen Organismus aufweist. Die Integration dieses Defektmodells hatte somit zum Ziel, eine tiefere Beurteilung der Rolle von SOCS3 unter einem pathophysiologischen Gesichtspunkt zu ermöglichen.

Darüber hinaus verweisen Studien der letzten Jahre zunehmend auf eine deutlich erweiterte Funktionalität der SOCS-Proteine, die zusätzlich die Regulation regenerativer Prozesse einschließt. Verschiedene Untersuchungen konnten dabei auf eine gesteigerte Bedeutung von SOCS3 in der Hemmung STAT3-vermittelter Signalkaskaden verweisen

[Denson *et al.* 2003; Tokumaru *et al.* 2005; Nagai *et al.* 2007], wobei bekannt ist, dass STAT3 in die Transkription migrations- und proliferationsrelevanter Gene involviert ist. Daher sollte im zweiten Teil der Arbeit ein transgenes Mausmodell generiert und charakterisiert werden, in dem SOCS3 in Anlehnung an die Erkenntnisse aus dem ersten Teil dieser Arbeit im epidermalen Kompartiment überexprimiert wird. Neben einer umfassenden Beurteilung des Wundheilungsgeschehens in diesen Tieren, bei der die Untersuchung der Entzündungsreaktion einen Schwerpunkt bilden sollte, war von Interesse, detaillierte Erkenntnisse über mögliche Auswirkungen der erhöhten SOCS3-Expression auf das Verhalten der Wundrandkeratinozyten zu erlangen. Die Untersuchung der für den raschen Heilungserfolg äußerst bedeutenden Schlüsselfunktionen Keratinozytenmigration und -proliferation sollten dabei sowohl *in vivo* als auch *in vitro* im Fokus der Analysen stehen.

## II MATERIAL UND METHODEN

### 1 Material

#### 1.1 Chemikalien

Organische Lösungsmittel und Säuren wurden über das Zentrallager der Apotheke der Uniklinik Frankfurt bezogen. Alle weiteren, im Folgenden nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungen wurden von den Firmen Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

Acrylamid- /Bisacrylamidlösungen	Roth; Karlsruhe
Agar	Gibco / Invitrogen; Karlsruhe
Agarose	Roth; Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Ampicillin Natriumsalz	Roth; Karlsruhe
Aprotinin	BioTrend; Köln
Aquatex, wässriges Eindeckmittel	Merck; Darmstadt
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	Roth; Karlsruhe
5-Brom-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal)	Roth; Karlsruhe
5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU)	BD Biosciences Europe; Heidelberg
Carbenicillin Dinatriumsalz	Roth; Karlsruhe
3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-propansulfat (CHAPS)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]CTP	GE Healthcare Europe; Braunschweig
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
DNA-Größenmarker	MBI Fermentas; St. Leon-Rot
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Microsystems; Nussloch
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Fibronektin (aus humaner Plazenta)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Geneticinsulfat (G418)	Gibco / Invitrogen; Karlsruhe
Glycin	Merck; Darmstadt
Guanidinthiocyanat (GSCN)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich; Taufkirchen

Hefeextrakt	Gibco / Invitrogen; Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth; Karlsruhe
Kollagen Typ IV (aus humaner Plazenta)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Leupeptin	BioTrend; Köln
Magermilchpulver	Merck; Darmstadt
Maus IgG-Agarose	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Mayers Hämatoxylin-Lösung	AppliChem; Darmstadt
Mitomycin C	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
PageRuler™ Proteinstandard	MBI Fermentas; St. Leon-Rot
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem; Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Nukleotidtriphosphate	Roche; Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Oligonukleotide	MWG Biotech; Ebersberg
Okadasäure	BioTrend; Köln
Pepton	Roth GmbH; Karlsruhe
Phenol	AppliChem; Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roche; Karlsruhe
Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Merck; Darmstadt
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
tRNA	Roche; Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Spermidin	Roche; Karlsruhe
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]UTP	GE Healthcare Europe; Braunschweig

## 1.2 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung wässriger Puffer und Lösungen wurde demineralisiertes Wasser (Ionen-austauscher; Millipore, Schwalbach) verwendet. Es wird im Folgenden mit DDW be-zeichnet, da dessen Leitfähigkeit der doppelt destillierten Wassers entspricht.

### 1.2.1 Allgemeine Puffer und Stammlösungen

<b>10x PBS-Puffer</b> (pH7,4)	139mM NaCl
	2,7mM KCl
	8,1mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
	1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

<b>10x TBE-Puffer</b>	890mM Tris 890mM Borsäure 20mM Na <sub>2</sub> EDTA
<b>10x TAE-Puffer</b>	400mM Tris/HCl 10mM EDTA
<b>10x TBST-Puffer (pH8)</b>	100mM Tris/HCl 5% Tween 20 (v/v) 1,5M NaCl

### 1.2.2 DEPC Wasser

Zur Herstellung RNase-freier Lösungen wurde DDW mit dem RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) (0,1% (v/v)) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) gerührt [Fedorcsak und Ehrenberg 1966]. Da selbst Spuren von DEPC Adenylreste carboxymethylieren, wurden die Lösungen anschließend autoklaviert und somit verbleibendes DEPC quantitativ thermisch zersetzt.

## 1.3 Kits und sonstige Materialien

ABC Staining System	Santa-Cruz Biotechnologies; Heidelberg
Accu-Check Aviva und Teststreifen	Roche Deutschland; Grenzach-Wyhlen
BAS-MP 2040S-Phosphoimaging-Platte	Fuji; Straubenhardt
BCA Reagent Assay	Pierce Inc.; Rockford, IL, USA
BrdU in situ Detection Kit	BD Biosciences Europe; Heidelberg
DCS LabLine Antikörperverdünnungspuffer	DCS; Hamburg
Enhanced chemoluminescence (ECL) detection kit	Amersham Pharmacia; Braunschweig
Griess-Ilosvays Reagenz auf Nitrit	Merck; Darmstadt
Hybond™-N Plus Nylonmembran	GE Healthcare Europe; Braunschweig
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell; Dassel
Nick™ Columns	GE Healthcare Europe; Braunschweig
PVDF Membran	Millipore; Eschborn
Quantikine® ELISA Kit	R&D Systems; Wiesbaden
Maus- IL-1β	
Maus- MCP-1 (CCL-2)	
Maus- MIP-2	
Maus- TGF-β1	
Maus- TNF-α	

Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen; Hilden
Rediprime II DNA labelling system	Amersham Pharmacia; Braunschweig
SigmaFAST™ 3,3'-Diaminobenzidin Tabletten	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Spectra/Por® CE Dialysemembran MWCO: 3500	Spectrum Europe; DG Breda, NL
SuperFrost Plus® Objektträger	Menzel Glasbearbeitung; Braunschweig
Tissue-Tek Cryomold® Einbettformen	Sakura Finetek Europe; Zoeterwoude, NL
Whatman® 3MM-Papier	Millipore; Eschborn

## 1.4 Enzyme

### 1.4.1 Übersicht verwendeter Enzyme

Dispase II	Roche; Karlsruhe
Pfu-DNA Polymerase	Promega; Mannheim
Proteinase K	Roche; Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Roche; Karlsruhe, MBI Fermentas; St. Leon-Rot, New England Biolabs; Frankfurt
RNA Polymerase T3 und T7	Roche; Karlsruhe
RNase A und T1	Roche; Karlsruhe
RNasin® Ribonukleaseinhibitor	Promega; Mannheim
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen; Karlsruhe
T4-DNA Ligase	Roche; Karlsruhe
GoTaq®-DNA Polymerase	Promega; Mannheim

### 1.4.2 Lösen und Vorinkubation lyophilisierter Enzyme

#### Proteinase K

Das Lyophilisat wurde zu einer Endkonzentration von 10mg/ml in DDW gelöst, aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### RNase A

Das Lyophilisat wurde zu einer Endkonzentration von 10mg/ml in RNase-Puffer [10mM Tris/HCl pH7,5; 15mMNaCl] gelöst, für 30min bei  $95^{\circ}\text{C}$  inkubiert, über Nacht auf RT abgekühlt, abschließend aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 1.5 Rekombinante und aufgereinigte Proteine

IL-1 $\beta$	Roche; Karlsruhe
IL-6	PeproTech; Frankfurt
IFN- $\gamma$	PeproTech; Frankfurt
TNF- $\alpha$	Roche; Karlsruhe
TGF- $\alpha$	Roche; Karlsruhe
TGF- $\beta$	Roche; Karlsruhe

## 1.6 Antikörper

### 1.6.1 Primärantikörper

Antikörper	Ursprung	Hersteller
anti- <i>Loricrin</i>	K (polyklonal)	Covance; Berkeley CA, USA
anti- <i>SOCS3</i>	Z (polyklonal)	Santa Cruz Biotech; Heidelberg
anti- <i>pSTAT3</i>	K (monoklonal)	New England Biolabs; Frankfurt
anti- <i>STAT3</i>	M (monoklonal)	New England Biolabs; Frankfurt
anti- $\beta$ - <i>Aktin</i>	M (monoklonal)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
anti- <i>Ki-67</i>	K (polyklonal)	Dianova; Hamburg
anti- <i>GR-1</i>	R (monoklonal)	PharMingen; Hamburg
anti- <i>F4/80</i>	R (monoklonal)	AbD Serotec; Hamburg
anti- <i>MCP-1(CCL2)</i>	Z (polyklonal)	R&D Systems; Wiesbaden
anti- <i>MIP-2</i>	Z (polyklonal)	Santa Cruz Biotech; Heidelberg
anti- <i>COX-2</i>	Z (polyklonal)	Santa Cruz Biotech; Heidelberg
anti- <i>BrdU</i>	R (monoklonal)	AbD Serotec; Hamburg
anti- <i>iNOS</i>	K (polyklonal)	Santa Cruz Biotech; Heidelberg
anti- <i>TGF-<math>\beta</math>(1,2,3)</i>	M (monoklonal)	R&D Systems; Wiesbaden
anti- <i>TGF-<math>\beta</math>(1,2,3)</i>	K (polyklonal)	R&D Systems; Wiesbaden
anti- <i>KLH</i>	M (monoklonal)	R&D Systems; Wiesbaden

K... Kaninchen; Z...Ziege; R...Ratte; M...Maus

### 1.6.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Ursprung	Konjugat	Hersteller
anti-goat IgG	K	HRP	Dianova; Hamburg
anti-mouse IgG	K	HRP	Pierce Inc.;Rockford,USA
anti-rabbit IgG	Z	HRP	Dianova; Hamburg
anti-rat IgG	K	Biotin	Dako; Hamburg

K...Kaninchen; Z...Ziege

## 1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden nach Vorgabe der Sequenz über die Firma MWG-Biotech aus Ebersberg bezogen.







### 1.11.3 Transgene (TgN-SOCS3) Mauslinien

Linie (TgN-SOCS3 Linie) <sup>1</sup>	Hintergrund	Founder-ID	Linien <sup>2</sup>
FVB/N-TgN(K5SOCS3)1928L3	FVB/N	1928	L 3
FVB/N-TgN(K5SOCS3)1931L8	FVB/N	1931	L 8
C57BL/6-TgN(K5SOCS3)1965L12	C57BL/6J	1965	L 12
C57BL/6-TgN(K5SOCS3)1969L13a	C57BL/6J	1969	L 13a

## 1.12 Geräte

ABI-Prism 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems; Weiterstadt
Axiovert 25-Mikroskop	Carl Zeiss; Göttingen
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf; Wesselin-Berzdorf
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf; Wesselin-Berzdorf
Fuji FinePix F30 Digitalkamera	Fujifilm Deutschland; Düsseldorf
Gel dryer 583	Bio-Rad; München
GeneAmp 2400/9600 Thermocycler	Applied Biosystems; Weiterstadt
HERAsafe <sup>®</sup> Sterilbank	Heraeus; Hanau
Heraeus Megafuge 1.0, Rotor 75750F	Heraeus; Hanau
Inkubator Heraeus BBD 6220	Heraeus; Hanau
Kulturschüttler Unitron Infors AG	Bottmingen; Schweiz
Midget-Elektrophoresekammern	Amersham Pharmacia; Braunschweig
NanoDrop-Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie; Erlangen
Nikon Eclipse E600-Mikroskop	Nikon; Düsseldorf
Phosphoimager BAS 1500	Raytest; Straubenhardt
Photometer-Uvikon'810P	Kontron Instruments; Neufahrn
Sunrise Mikrotiterplattenlesegerät	Tecan; Männedorf, Schweiz
Trans-Blot SD Blotting-Kammer	Bio-Rad; München
Transsonic Digital Ultraschallbad	Bender & Hobein; Zürich, Schweiz
TRI-CARB 2100 TR $\beta$ -counter	Canberra-Packard; Dreieich
UltraTurrax T10 basic	IKA; Staufen
OMNI Tissue Homogenizer 115	BioLab Products; Godensdorf

## 1.13 Computersoftware

Digitale Bildverarbeitung und Bildbearbeitung	Adobe Photoshop 5.0 Limited Edition
Radioisotopen-basierte Analyseverfahren	Tina 2.09g
Textverarbeitung / Tabellenkalkulation	Microsoft Office 2003

<sup>1</sup> Nach ILAR Journal V34(4) 1992.

Plasmidkarten	Clone Manager 7.01
Online-Datenbanken	National Center for Biotechnology Information (NCBI) URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Sequenzalignments	EMBL-European Bioinformatics Institute URL: <a href="http://www.ebi.ac.uk/">http://www.ebi.ac.uk/</a>

## 2 Bakterien

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der *E.coli*-Stamm XL1 blue MRF' verwendet. Die Inkubation der Flüssigkultur erfolgte bei 37°C unter aeroben Bedingungen auf einem Horizontalschüttler (140U/min) in LB (engl. lysogeny broth) -Medium [Bertani 2004].

LB -Medium:	1% (m/v) Trypton aus Casein
	1% (m/v) Hefeextrakt
	0,5% (m/v) NaCl

Für die Herstellung von Agarplatten wurden dem LB-Medium 15g/l Agar zugesetzt. Eine Selektion ampicillinresistenter Bakterien erfolgte über den Zusatz von 100µg/ml Ampicillin (Flüssigmedium) oder 100µg/ml Carbenicillin (Agarplatten).

### 2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E.coli* wurde auf die Rubidiumchlorid-Methode zurückgegriffen [modifiziert nach Hanahan 1983]. Dazu sind zunächst 100ml LB-Medium mit 200µl einer Übernachtskultur (*E.coli* XL1 blue MRF') angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von  $OD_{600nm} = 0,4-0,6$  herangezogen worden (37°C, 140U/min). Die Kultur wurde zentrifugiert (15min, 3800g, 4°C), in 100ml eisgekühlter TFB I-Lösung sorgfältig resuspendiert und für 45min auf Eis inkubiert. Durch erneute Zentrifugation (15min, 3800g, 4°C) und Aufnahme des Pellets in 9ml eisgekühlter TFB II-Lösung ist die Bakteriensuspension weiter aufkonzentriert und anschließend für 15min auf Eis inkubiert worden. Zur Konservierung der generierten kompetenten Zellen wurde die

---

<sup>2</sup> Die aus den Founder-Tieren hervorgegangenen Linien 3, 8, 12 und 13a stammen aus eigener Zucht.

Suspension abschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

	TFB I-Lösung (sterilfiltriert)	TFB II-Lösung (sterilfiltriert)
CaCl <sub>2</sub>	10mM	75mM
Glycerol	15% (v/v)	15% (v/v)
Kaliumacetat	30mM pH 5,8	-
MnCl <sub>2</sub>	50mM	-
RbCl	100mM	10mM
MOPS	-	10mM pH 7,0

## 2.2 Transformation

Zur Transformation wurden 100µl einer Suspension kompetenter Zellen (vgl. Kap.2.1) langsam auf Eis aufgetaut, mit 2-10ng Plasmid-DNA oder 20µl eines Ligationsansatzes (vgl. Kap. 5.7.2) versetzt und für 15min auf Eis inkubiert. Nach einem 2-minütigen Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis und nach Zugabe von 500µl LB-Medium eine 45-minütige Erholungsphase der Zellen bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter leichtem Schütteln (500U/min). Der Transformationsansatz wurde abschließend im Volumenverhältnis 1/5 zu 4/5 auf zwei selektive Agarplatten (LB-Carbenicillin), auf die zuvor 100µl X-Gal (2% in DMF) und 40µl IPTG (100mM in DDW) ausgestrichen wurden, verteilt und ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht erfolgte die Selektion transformierter Bakterienkolonien anhand einer Blaufärbung der nicht transformierten Bakterien, die sich für Experimentatoren mit ausgeprägter Dyschromatopsie oft erst nach weiteren 30-120min bei  $4^{\circ}\text{C}$  als zufriedenstellend sichtbar auszeichnete.

## 3 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden sowohl adulte, humane HaCaT-Keratinocyten als auch primäre, murine Keratinocyten verwendet. Alle Zellen und Linien wurden in Vollmedium unter standardisierten Bedingungen bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert (Heraeus BDD 6220 Inkubator). Ein Mediumwechsel erfolgte im Abstand von 3 Tagen. Stimulationsversuche fanden in supplementfreiem Minimalmedium statt. Waschschriffe wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit D-PBS (engl. Dulbecco's phosphate buffered saline, Ca<sup>2+</sup>-frei; Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Alle

zur Kultur von HaCaT-Zellen eingesetzten Medien und Puffer stammten von Gibco/Invitrogen, Karlsruhe. Medien und Puffer für die Primärzellkultur stammten von PromoCell, Heidelberg. Auf unterschiedliche Zusammensetzungen wird im Folgenden detailliert eingegangen. Alle zur Zellkultur verwendeten Gefäße wurden über die Firma Greiner Bio One, Frickenhausen bezogen.

### 3.1 HaCaT Keratinozyten

Bei der Zelllinie HaCaT (engl. human adult low calcium temperature) handelt es sich um adulte, immortalisierte, humane Keratinozyten, die aus dem Randgebiet eines Melanoms isoliert wurden [Boukamp *et al.* 1988]. Trotz des transformierten Phänotyps besitzen sie, abhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des Mediums, eine uneingeschränkte Kapazität zur Differenzierung.

#### 3.1.1 Zellkulturmedien und Lösungen

DMEM mit GlutaMax™	Dulbecco's modified Eagle Medium 4,5g/l D-Glucose 29,23g/l L-Glutamin (GlutaMax™) 3,7g/l $\text{NaHCO}_3$ pH7,0
Vollmedium (DMEM+)	DMEM mit GlutaMax™ 10% (v/v) FCS (engl. fetal calf serum) 100U/ml Penicillin 100U/ml Streptomycin
Minimalmedium (DMEM-)	Vollmedium ohne FCS
Einfriermedium	10% (v/v) DMSO 20% (v/v) FCS in DMEM
Trypsin/EDTA (TE)	0,05% (m/v) Trypsin 0,02% (m/v) EDTA

#### 3.1.2 Stimulation

HaCaT Keratinozyten wurden bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens in Vollmedium (DMEM+) kultiviert. Vor einem Stimulationsversuch wurden die Zellen ge-

waschen und für 24h in Minimalmedium (DMEM-) inkubiert, um sie in ihrem Teilungszyklus zu synchronisieren. Eine Stunde vor dem Versuch wurde das Medium erneut gewechselt. Die Zugabe der Induktoren erfolgte dann direkt in das überstehende Medium der Kulturschalen.

### **3.1.3 Subkultivierung**

Zur Subkultivierung wurde der konfluente Zellrasen zweifach gewaschen und für 5-7min mit TE inkubiert. Der Vorgang wurde nach Ablösen der Zellen durch Zugabe von DMEM+ gestoppt, so dass die Zellen im Anschluss in entsprechender Zellzahl in die Kulturgefäße ausgelegt werden konnten.

### **3.1.4 Kryokonservierung**

Der konfluente Zellrasen wurde trypsiniert (vgl. Kap. 3.1.3) und über Zentrifugation (5min, 1000U/min; Heraeus Megafuge) sedimentiert. Nach Resuspendieren der Zellen in Einfriermedium konnte die Suspension in Cryo.s™-Röhrchen aliquotiert und langsam auf -80°C heruntergekühlt werden. Die abschließende Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen der Zellsuspension erfolgte zügig in einem auf 37°C temperierten Wasserbad. Nach Aufnahme in DMEM+ wurden die Zellen in Kulturgefäße ausgelegt und wie beschrieben kultiviert (vgl. Kap. 3.1.3).

## **3.2 Primäre Keratinozyten**

Um Zellkulturexperimente durchführen zu können, die begründete Rückschlüsse auf Veränderungen im transgenen Tier (TgN-SOCS3 Linien) zulassen, wurde ein Verfahren zur Isolierung und Kultivierung primärer Mauskeratinozyten etabliert. In allen Versuchen mit Primärzellen dienten Keratinozyten aus nicht-transgenen Geschwistertieren desselben Wurfes als Kontrolle.

### 3.2.1 Zellkulturmedien und Lösungen

Vollmedium (Keratinocyte Growth Medium (KGM))	0,4% (v/v) boviner Hypophysenextrakt 125µg/ml hs.rec. EGF 5µg/ml hs. Insulin 0,33mg/ml Hydrocortison 10µg/ml hs. Transferrin 0,39µg/ml Adrenalin 0,05mM Ca <sup>2+</sup>
Minimalmedium (Keratinocyte Basal Medium (KBM))-1	KGM ohne Hypophysenextrakt
Minimalmedium (Keratinocyte Basal Medium (KBM))-2	KGM ohne Hypophysenextrakt, EGF und Insulin
Trypsin/EDTA (TE-II)	0,04% (m/v) Trypsin, 0,03% (m/v) EDTA
Trypsin-neutralisierende Lösung (TNS)	0,05% (m/v) Trypsininhibitor 0,1% (m/v) bovines Serumalbumin

### 3.2.2 Beschichtung von Zellkulturgefäßen

Für eine erhöhte Viabilität der Primärkulturen und eine verbesserte Adhärenz auf den Polystyroloberflächen sind Kulturschalen und -flaschen mit Matrixproteinen (Kollagen IV und Fibronectin) beschichtet worden.

Matrixprotein	Arbeitslösung	Beschichtungsgrad	Verwendung
Fibronectin	50-200µg/ml in D-PBS	5µg/cm <sup>2</sup>	Migrationsassay
Kollagen IV	25-100µg/ml in 0,05M HCl	2,5µg/cm <sup>2</sup>	Stimulationsversuche, Proliferationsassay

Dazu wurden in die Kulturgefäße sterile Lösungen der aufgeführten Matrixproteine pipettiert. Die Konzentration der Arbeitslösungen wurde so gewählt, dass das Volumen die Oberfläche der Kulturgefäße bei vorgegebenem Beschichtungsgrad vollständig bedeckte und über Nacht vollständig evaporieren konnte. Am Folgetag sind die beschichteten Schalen und Flaschen vor Verwendung 2-3fach gewaschen worden.



### 3.2.3 Isolation primärer Keratinozyten

Für die Isolation von Primärzellen wurden Würfe ab einem Umfang von mindestens 7 neugeborenen Mäusen mit einem Alter von 1-3 Tagen verwendet. Die Mäuse stammten von Zuchtpaaren der TgN-SOCS3 Linien L3 und L13a mit je einem heterozygot-transgenen Elternteil, so dass jeder Wurf aus transgenen und nicht-transgenen Nachkommen bestand. Die Tötung der Neugeborenen erfolgte durch Dekapitation nach Isofluran-Narkose (Baxter; Unterschleißheim) und Desinfektion in 70% Ethanol. Alle folgenden Schritte sind unter sterilen Bedingungen durchgeführt worden (HERAsafe® Sterilbank). Nach Abtrennen der Extremitäten wurde die Haut abgezogen, von überschüssigem Bindegewebe befreit und in quadratische Stücke (5x5mm) gewiegelt, die über Nacht bei 4°C in einer Petrischale mit steriler DispaseLösung (2,4U/ml) inkubiert wurden. Die Dispasebehandlung ermöglichte aufgrund spezifischer proteolytischer Aktivität eine schonende Desintegration der Epidermis, die am Folgetag als intakter konfluenter Zellrasen vom dermalen Kompartiment abgetrennt werden konnte. Parallel wurden Schwanzteile zur Genotypisierung jedes Neugeborenen aufgearbeitet (vgl. Kap. 5.2.2). Nach Kenntnis des Genotyps wurden die Epithelien gleichen Genstatus' gepoolt und zur Gewebedisaggregation für 7min bei 37°C trypsinisiert (TE-II). Nach dem Abstoppen der Reaktion mit TNS erfolgte ein Abtrennen von Matrixresten durch Filtration (70µm; Falcon, Becton Dickinson Labware, USA), das Sedimentieren der Zellen aus dem Filtrat durch Zentrifugation (2min, 210g) und vorsichtiges Resuspendieren des Pellets in Vollmedium (KGM). Abschließend wurden dem Versuch und der Grundfläche des Kulturgefäßes entsprechende Zellzahlen ausgelegt und kultiviert.

### 3.2.4 Stimulation

$4 \times 10^6$  Zellen wurden unmittelbar nach der Isolation in 6-well Platten ausgelegt und bis zum Erreichen eines zu 80-90% konfluenten Zellrasens in KGM kultiviert, um ein Ausdifferenzieren durch Kontaktinhibition zu minimieren. 24h vor der Stimulation erfolgte nach einmaligem Waschen ein Mediumwechsel zu Minimalmedium (KBM-2). Die Zugabe der Induktoren und Reagenzien erfolgte direkt in das überstehende Medium der 6-well Platten.

### 3.2.5 Untersuchungen der Zellmigration

Zur Beurteilung der Migrationskapazität wurde ein *Scratch Assay* durchgeführt. Dazu wurden  $4 \times 10^6$  primäre Zellen in 6-well Platten ausgelegt, kultiviert und in Analogie zu Stimulationsversuchen ab einer Konfluenz von 80-90% für 24h auf KBM-1 gesetzt, um die Zellen in einer Ruhephase zu synchronisieren. Zur Inhibition der Zellproliferation erfolgte im Anschluss eine zweistündige Inkubation mit Mitomycin C ( $10 \mu\text{g/ml}$  in KBM-1). Unter Verwendung einer gelben Pipettenspitze ist ein definierter zellfreier Spalt über den Durchmesser der Kulturschale gezogen worden. Nach erneutem Waschen der Kulturen und Wechseln des Mediums (KBM-1) erfolgte abschließend die Zugabe der entsprechenden Induktoren. Zur Dokumentation wurden verschiedene Abschnitte des Spalts zu definierten Zeitpunkten (1h, 4h, 8h, 24h, 48h nach Induktion) fotografiert (Sony DXC-C33 3CCD; Berlin).

### 3.2.6 Untersuchungen der Zellproliferation

Als Maß für die proliferative Aktivität der Primärzellen wurde die Inkorporation  $^3\text{H}$ -markierten Thymidins in die DNA gemessen.  $4 \times 10^7$  Zellen wurden in 24-well Platten ausgelegt und bis zum Erreichen einer 40-60%igen Konfluenz kultiviert. Nach initialem Hungern (KBM-2, 24h) wurden die Primärkulturen im Anschluss gewaschen und unter Verwendung verschiedener Kulturmedien und Induktoren in Gegenwart von [*methyl*- $^3\text{H}$ ]-Thymidin inkubiert ( $0,5 \mu\text{Ci}/500 \mu\text{l}$ ). Der Versuch wurde durch zweifaches Waschen mit eiskühlem D-PBS gestoppt. Im Anschluss folgten eine 30-minütige Inkubation mit 5% Trichloressigsäure ( $4^\circ\text{C}$ ), zwei weitere Waschschrte mit 5% Trichloressigsäure ( $4^\circ\text{C}$ ) und eine 30-minütige Inkubation mit  $500 \mu\text{l}$  1M NaOH ( $37^\circ\text{C}$ ), um die Zellen zu lysieren. Die resultierenden Lysate wurden in Szintillationsröhrchen transferiert, durch Zusatz von  $250 \mu\text{l}$  Eisessig neutralisiert und mit Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Quantifizierung abgegebener Strahlungsenergie erfolgte mittels TRI-CARB 2100 TR  $\beta$ -counter.

### 3.2.7 Bestimmung des Nitrit-Gehaltes nach Griess

Zur indirekten Ermittlung des Gehaltes an Stickstoffmonoxid (NO) in Zellkulturüberständen ist auf die Konzentrationsbestimmung des Oxidationsproduktes Nitrit in einer modifizierten Reaktion nach Griess zurückgegriffen worden [Green *et al.* 1982; Pollock

*et al.* 1991]. Grundprinzip der Methode ist die Bildung eines mesomeriestabilisierten Diazoniumsalzes nach dem elektrophilen Angriff des Nitrosyl-Kations am Stickstoff eines im Reagenz enthaltenen primären aromatischen Amins. Im zweiten Schritt erfolgt die Kupplung an ein zweites aromatisches Amin unter Bildung eines Azzofarbstoffes, dessen Konzentration photometrisch erfasst wurde ( $\lambda_{\max} = 540\text{nm}$ ). Zur Messung wurden 50 $\mu\text{l}$  des Zellkulturüberstandes in einer Mikrotiterplatte mit dem gleichen Volumen Griess-Ilosway Reagenz versetzt und gemischt. Innerhalb von 20min wurde die konzentrationsabhängige Absorption bei 540nm unter Verwendung des Sunrise Mikrotiterplattenlesegerätes ermittelt. Eine Natriumnitrit-Eichreihe (2,5-40 $\mu\text{M}$ ) diente zur Berechnung der Nitritkonzentration in den Proben, 50 $\mu\text{l}$  frischen Zellkulturmediums zur Ermittlung der Eigenabsorption (Blindprobe).

## 4 Proteinchemische Methoden

### 4.1 Extraktion von Proteinen

#### 4.1.1 Lysate aus eukaryontischen Zellen

Kultivierte Zellen (vgl. Kap. 3) wurden zur Herstellung eines Gesamtproteinlysates unmittelbar vor der Lyse 2-fach mit eisgekühltem D-PBS gewaschen und nach restlosem Abziehen des Waschpuffers mit einem entsprechenden Volumen<sup>3</sup> (400 $\mu\text{l}$ /57 $\text{cm}^2$ ) an Lysispuffer (siehe unten) versetzt. Das Lysat wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sonifiziert (4°C, 2x4min, Transsonic Ultraschallbad). Nach dem Abtrennen verbliebener Zelltrümmer durch Zentrifugation (10min, 15000g, 4°C) sind die Lysate quantifiziert (vgl. Kap. 4.2) und bei -20°C gelagert worden.

Proteinlysispuffer:	Pufferkomponenten		Proteaseinhibitoren	
	137mM	NaCl	10mM	NaF
20mM	Tris/HCl pH8,0	1mM	PMSF	
5mM	EDTA pH8,0	1mM	DTT	
10% (v/v)	Glycerol	1mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	
ad 100%	DDW	5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Leupeptin	
-	-	5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Aprotinin	
-	-	50nM	Okadasäure	

<sup>3</sup> Das Volumen wurde der Grundfläche der Zellkulturschalen jeweils angepasst.

### 4.1.2 Lysate aus murinem Gewebe

Tiefgefrorene murine Gewebestücke wurden zunächst unter Verwendung eines Hochleistungshomogenisators (UltraTurrax, OMNI Tissue Homogenizer) in einem geeigneten Volumen Proteinlysispuffer (vgl. Kap. 4.1.1) homogenisiert. Aus dem durchgehend eisgekühlten Homogenisat sind im Anschluss verbleibende Gewebereste durch Zentrifugation (15min, 15000g, 4°C) abgetrennt worden. Der opaleszierende Überstand ist in frische Reaktionsgefäße aliquotiert, der Proteingehalt quantifiziert (vgl. Kap. 4.2) und bei -80°C gelagert worden.

### 4.1.3 Wundlysate zur Bestimmung von TGF-β1 mittels ELISA

Für die Aufarbeitung der Gewebeproben zur Messung des TGF-β1 Gehaltes im Wundgewebe wurden die Protokolle von Morales *et al.* 1991 und McDevitt *et al.* 2001 leicht modifiziert. Dazu wurden die einzelnen Wunden in tiefgefrorener Form (N<sub>2</sub> liquid) gewogen und in Guanidinhydrochlorid-Lysispuffer (4M GuanidinHCl, 1M TrisHCl pH7,5, 10mM EDTA pH8, 0,5% (m/v) CHAPS; 10µl Puffer/mg Wunde) mittels UltraTurrax unter Eiskühlung homogenisiert und zentrifugiert (15min, 15000g, 4°C). Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

## 4.2 Quantifizierung von Proteinlysaten

Die Quantifizierung des Proteingehalts der unter Kap. 4.1.1 und 4.1.2 erhaltenen Lysate erfolgte über die Bicinchoninsäure (BCA)-Methode [nach Smith *et al.* 1985] unter Verwendung des BCA Reagent Assay Kit (vgl. Kap. 1.3). Die Methode basiert auf einer kalorimetrischen Auswertung eines violetten Komplexes aus Cu<sup>+</sup> und BCA bei 560nm, wobei Cu<sup>2+</sup> zuvor durch in Lösung befindliche Proteine zu Cu<sup>+</sup> reduziert wird. Zur Messung wurden die Lysate mit DDW verdünnt (1:20, 1:40) und nach Anweisung des Herstellers unter Verwendung des Sunrise Mikrotiterplattenlesegerätes vermessen.

## 4.3 Western Blot Analyse

Zur Analyse von Polypeptidmischungen sind Proteinlysate über diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese [Laemmli 1970] aufgetrennt und auf PVDF-Membranen trans-

feriert worden. Die Detektion des gewünschten Proteins erfolgte immunologisch durch Verwendung spezifischer Antikörper. Folgende Puffer fanden Verwendung:

Pufferkomponente	4x Lade- puffer	10x SDS Laufpuffer	Sammelgel- puffer	Trenngel- puffer	Transfer- puffer
Tris/HCl	0,25M pH6,8	0,25M pH8,3	0,5M pH6,8	1,5M pH8,8	25mM pH8,3
SDS	8% (m/v)	1% (m/v)	0,1% (m/v)	0,1% (m/v)	-
2-Mercaptoethanol	3M	-	-	-	-
Bromphenolblau	0,01% (m/v)	-	-	-	-
Glycerol	40% (v/v)	2,5M	-	-	-
Glycin	-	-	-	-	192mM
Methanol	-	-	-	-	20% (v/v)

#### 4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Basis dieser Trenntechnik ist die Tatsache, dass Proteine in Gegenwart von SDS denaturieren und zu negativ-geladenen SDS-Protein-Komplexen aggregieren. Komplexe verschiedener Proteine besitzen vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften, so dass die Auftrennung im elektrischen Feld auf der Größe des Proteins basiert.

Geeignete Mengen an Proteinlysate (25-120µg) wurden mit 4x Ladepuffer<sup>4</sup> verdünnt und nach Denaturierung (95°C, 5min) auf ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Gelsystem geladen, bei dem die Trennkapazität des Trenngels dem nachzuweisenden Protein angepasst wurde (8-15% Acrylamid). Die Auftrennung erfolgte in Midget-Elektrophoresekammern bei initial 80V, später 150V über 1-2h. Als Größenstandard wurden 2,5µl PageRuler<sup>TM</sup>-Proteinmarker (vgl. Kap. 1.1) mitgeführt.

#### 4.3.2 Transfer (Blotting) und Immundetektion

Der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte im so genannten *semi-dry-Verfahren* unter Verwendung von Transferpuffer und Trans-Blot SD Blottingkammern (Aufbau: zwei Lagen Whatmann-Papier, Membran, Gel, zwei Lagen Whatmann-Papier). Die Membran musste zuvor in Methanol benetzt und in Transferpuffer equilibriert werden. Der Transfer erfolgte bei 0,8mA/cm<sup>2</sup> über 75min. Nach Kontrolle des Transfers mittels Ponceau S-Färbung ist die Membran zur Absätti-

<sup>4</sup> Zur Analyse des Makrophagen-Oberflächenantigens F4/80 wurden die Proben in 4xPuffer ohne 2-Mercaptoethanol aufgenommen (nicht-reduzierende Bedingungen).

gung restlicher Proteinbindungsstellen für 1h mit 5-10% (m/v) Magermilch in 1xTBST inkubiert worden. Nach kurzem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (in 5% (m/v) BSA, 1h/RT oder 16h/4°C), gefolgt von 3x10min Waschen in TBST und der abschließenden Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:10 000 in 2,5% (m/v) Magermilch/TBST, 1h, RT). Nach erneutem Waschen (3x10min) mit 1xTBST ist die Membran nach Anweisung des Herstellers in 1,5ml ECL-Detektionslösung (vgl. Kap. 1.3) inkubiert worden. Ein Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm) wurde exponiert und entwickelt (Amersham Hyperprocessor).

#### **4.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Ein ELISA ist ein empfindliches immunologisches Verfahren zur spezifischen Quantifizierung von Proteinen. In dieser Arbeit sind ausschließlich vorbeschichtete ELISA-Sets der Firma R&D Systems verwendet worden, bei denen, mit Ausnahme der TGF- $\beta$ 1-Bestimmung, nach Anweisung des Herstellers verfahren wurde. Die abschließende Quantifizierung erfolgte über das Sunrise Mikrotiterplattenlesegerät und dessen Software.

##### **Probenaufbereitung für TGF- $\beta$ 1-ELISA**

Die Gewebeproben wurden wie in Kap. 4.1.3 beschrieben aufgearbeitet. Das weitere Vorgehen basierte auf dem Protokoll von McDevitt *et al.* 2001: 100 $\mu$ l Wundlysat (ca. 10mg Protein) wurden auf 500 $\mu$ l mit 0,01M HCl aufgefüllt, in Spectra/Por<sup>®</sup> CE Dialyseschläuche (vgl. Kap. 1.3) (MWCO: 3500) überführt und über Nacht bei 4°C gegen 2l 0,01M HCl dialysiert. Das Dialysat wurde lyophilisiert (Eppendorf *Concentrator* 5301) und in 200 $\mu$ l RD5-26-Assay-Puffer (aus dem TGF- $\beta$ 1 ELISA-Kit) aufgenommen. 50 $\mu$ l einer equilibrierten 1:1 Suspension aus RD5-26 und muriner Immunglobulin (Ig)G-Agarose wurden hinzugefügt und über Nacht bei 4°C im Drehrad inkubiert, um IgG-Bindeproteine aus der Lösung zu binden, die sonst mit dem Assay interferieren würden. Am Folgetag ist die Suspension zentrifugiert worden (10min, 200U/ min). Mit 50 $\mu$ l des klaren Überstandes wurde dann verfahren, wie in den Anweisungen zum TGF- $\beta$ 1 ELISA beschrieben ist.

## 4.5 Immunhistochemie (IHC)

### 4.5.1 Herstellung von Kryoschnitten

Die Wunden wurden entnommen wie in Kap. 7.3 beschrieben, auf eine PVDF-Membran aufgelegt, über den gesamten Querschnitt vertikal halbiert und anschließend auf Trockeneis eingebettet (Tissue-Tek Gießformen (vgl. Kap. 1.3), Jung Einbettmedium (vgl. Kap. 1.1)). Zusätzlich zu Wundenpräparaten wurden Schwanzhautpräparate erstellt. Aus den so gefertigten Biopsieblöcken konnten unter Verwendung des Leica CM 3050S Kryostats Schnitte mit 8µm Präparatstärke erstellt werden. Diese wurden mit Aceton vorfixiert (-20°C, 1min) und bei -80°C gelagert.

### 4.5.2 Peroxidasefärbung und Kerngegenfärbung

Immunhistochemische Färbungen verschiedener Zielproteine in den angefertigten Kryoschnitten wurden unter Verwendung des entsprechenden ABC-Staining-System (vgl. Kap. 1.3) durchgeführt. Folgendes Protokoll wurde verfolgt:

- 1) Auftauen der Präparate (RT, 1h oder 37°C, 20min) und Fixieren in Aceton (-20°C, 10min)
- 2) Waschen in PBS (2x5min)
- 3) Inkubation in 1% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS (RT, 10min) zur Inaktivierung der gewebebeständigen Peroxidase
- 4) Waschen in PBS (2x5min)
- 5) Absättigen unspezifischer Proteinbindungsstellen durch Inkubation mit *Blocking Solution*<sup>5</sup> (1,5% (v/v) *Blocking Serum* in PBS) (RT, 1h, Feuchtkammer)
- 6) Inkubation mit dem Erstantikörper in *Blocking Solution* (4°C, 1h-16h, Feuchtkammer, Verdünnungsfaktor des Antikörpers nach Herstellerempfehlung und eigener Erfahrung)
- 7) Waschen in PBS (3x5min)
- 8) Inkubation mit dem Zweitantikörper (Biotin-konjugiert) in *Blocking Solution* (RT, 1h, Feuchtkammer, 1:200)
- 9) Waschen in PBS (2x5min)
- 10) Inkubation mit Avidin/Biotin (Peroxidase-konjugiert)-Komplex (RT, 30min, Feuchtkammer)
- 11) Färbung nach Zugabe von Peroxidasesubstrat (vgl. Kap. 1.3) unter dem Mikroskop

---

<sup>5</sup> Inkubationen mit anti- BrdU und anti- GR-1 Antikörpern erfolgten in DCS LabLine (vgl. Kap 1.3).

Alle Waschschrirte erfolgten auf einer Horizontalwippe. Zellkerne wurden mit Hämatoxylinlösung gegengefärbt (2min), die Objektträger 2x 2min in Leitungswasser gewaschen und die Präparate unter Verwendung von Aquatex eingedeckt.

#### **4.5.3 Vorinkubation zur Detektion 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) -positiver Zellen**

Die Tiere wurden wie unter 7.3.1 beschrieben behandelt, getötet und die Wunden eingebettet (vgl. Kap. 4.5.1). Zum Freilegen der inkorporierten BrdU-Nukleotide wurde das BrdU *in situ* Detection Kit (BD Biosciences) verwendet und nach dessen Anweisungen verfahren.

## **5 Nukleinsäuretechniken**

### **5.1 Isolation von RNA**

#### **5.1.1 Präparation aus eukaryontischen Zellen**

Die Präparation von RNA aus kultivierten Zellen erfolgte durch Lyse der Zellen in Gegenwart von stark denaturierenden Agenzien (Guanidinthiocyanat und Tenside), gefolgt von einer klassischen Chloroform-Phenol-Extraktion und abschließender Ethanol-fällung [Chomczynski und Sacchi 1987 und 2006]. Kultivierte Zellen (vgl. Kap. 3) wurden zum Ende des Versuches 2-fach mit eisgekühltem D-PBS gewaschen und durch Zugabe von 4°C-kaltem GSCN-Puffer<sup>6</sup> lysiert. Das Lysat wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert, 1/10Vol 2M NaOAc (pH 4,0), 1/3Vol 120µl CHCl<sub>3</sub> und 1/1Vol sauren Phenols (DEPC-DDW-gesättigt) hinzugefügt, intensiv gemischt und zentrifugiert (10min, 15000g, 4°C). Der wässrige Überstand wurde mit 2,5Vol Ethanol versetzt, gemischt und nach einstündiger Inkubation bei -20°C zentrifugiert (10min, 15000g). Nach Lösen des resultierenden RNA-Pellets in einem geeigneten Volumen an DEPC-Wasser schloss sich ein zweiter Extraktionsschritt mit gleichem Volumen Phenol/CHCl<sub>3</sub> (25:1, gesättigt mit 1M Tris/HCl pH 9,5) an. Die RNA wurde nach Zusatz von 1/10Vol 3M NaOAc (pH5,2) und 2,5Vol EtOH erneut gefällt (Inkubation -20°C über Nacht), das

---

<sup>6</sup> Das Volumen richtet sich nach Fläche der Kulturschalen. Die folgenden Volumenangaben beziehen sich auf das jeweils verwendete Volumen an GSCN-Puffer.



Pellet mit 70% EtOH gewaschen, angetrocknet und in einem geeigneten Volumen DEPC-DDW gelöst (65°C, 5min). Nach Bestimmen der Konzentration (vgl. Kap. 5.3) wurde die Integrität der RNA elektrophoretisch überprüft (Agarosegel 1,5%, 1xTAE) (vgl. Kap. 5.4). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

GSCN-Puffer	50% (m/v) Guanidinthiocyanat
	0,7% (v/v) 2-Mercaptoethanol
	0,5% (m/v) Natriumlaurylsarkosin
	15mM Natriumcitrat pH7,0

### 5.1.2 Präparation aus murinem Gewebe

Tiefgefrorene Gewebestücke wurden zunächst in 4°C kaltem GSCN-Puffer unter Verwendung des UltraTurrax homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert (10min, 15000g, 4°C). Mit dem Überstand wurde in Analogie zu der unter 5.1.1 beschriebenen Vorgehensweise verfahren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

## 5.2 Isolation von DNA

### 5.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

#### Isolation in kleinem Maßstab (Minipräparation)

Zur Isolation geringer Mengen Plasmid-DNA (5-20µg) wurde auf ein Routineprotokoll mit alkalischer Lyse zurückgegriffen [Birnboim 1983]. Dazu wurden 4ml selektives LB-Medium mit der entsprechenden Kolonie inokuliert und über Nacht inkubiert (vgl. Kap. 2). Bakterien aus ca. 1,5ml der Kultur wurden sedimentiert (30sec, 15000g), in 150µl Puffer I resuspendiert und anschließend nach Zugabe von 150µl Puffer II unter Invertieren des Reaktionsgefäßes lysiert. Der folgende Neutralisierungsschritt mit 150µl 4°C-kaltem Puffer III ergab nach mehrmaligem Invertieren eine fast klare Flüssigkeit mit weißem Kopräzipitat aus Kalium-SDS, Zelltrümmern, genomischer DNA und Proteinen. Nach anschließender Zentrifugation (10min, 15000g, 4°C) wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand mit 2,5Vol Ethanol gefällt, pelletiert (15min, 15000g, 4°C) und gewaschen (70% Ethanol). Das trockene Pellet wurde in 20-40µl DDW aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

---

Puffer I	50mM Tris/HCl pH 8,0 10mM EDTA pH 8,0 100µg/ml RNase
Puffer II	0,2M NaOH 1% (m/v) SDS
Puffer III	3M KOAc pH 5,5

### Isolation in präparativem Maßstab (Midipräparation)

Größere Mengen Plasmid-DNA (>100µg) ließen sich mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Midi Kit* isolieren. Dazu wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

#### 5.2.2 Präparation genomischer DNA aus murinem Gewebe

Zur raschen Genotypisierung der TgN-SOCS3 Mauslinien mittels PCR (vgl. Kap. 5.6.2) wurde genomische DNA über ein einfaches Verfahren aus Gewebebiopsien isoliert (modifiziert nach G. Küblbeck, DKFZ Heidelberg und Talts *et al.* 1999). Dazu wurden in der Regel Schwanzbiopsien (5mm) eingesetzt, die den Tieren 14 Tage nach der Geburt vom Schwanzende abgetrennt wurden. Das Isolationsverfahren setzt einen proteolytischen Verdau der Biopsien in 500-750µl Proteinase K-Puffer unter leichtem Schütteln voraus (Eppendorf Thermomixer, 56°C, 550U/min). Nach 4-8h konnte das Lysat mittels Zentrifugation (5min, 15000g) von unverdaulichen Resten (Haare, Wirbel) abgetrennt werden. Zur Aufarbeitung für die PCR wurde der Überstand direkt mit 0,6Vol Isopropanol versetzt, die ausfallende DNA auf Schmelzpunktkapillaren aufgespult, in 70%EtOH gewaschen, 5min getrocknet und in TE-Puffer (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA; pH8) gelöst (65°C, Schütteln bei 1000U/min). Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Zur Genotypisierung mittels Southern Blot (vgl. Kap. 5.11) musste das Gewebelysate aufgereinigt werden. Zunächst erfolgte eine Inkubation mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus Phenol/Chloroform/Isopentanol (25:24:1) im Drehrad (4°C, 30min), an die sich ein Chloroform/Isopentanol-Schritt (25:1) anschloss. Das Ausfällen und Lösen der DNA erfolgte dann wie oben beschrieben.

Proteinase K-Puffer	5mM EDTA pH8,5
[Talts <i>et al.</i> 1999]	200mM NaCl
	100mM Tris/HCl pH8,5
	0,2% (m/v) SDS
	100µg/ml Proteinase K

### 5.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch über die Messung der Extinktion (E) einer wässrigen Lösung bei  $\lambda = 260\text{nm}$  (NanoDrop Spektrophotometer). Maßgeblich für den absorbierten Energiebetrag sind  $\pi \rightarrow \pi^*$  Elektronenübergänge miteinander in Konjugation stehender  $\pi$ -Elektronensysteme und  $n \rightarrow \pi^*$  Übergänge nichtbindender Elektronenpaare der Heterozyklen von Purin- und Pyrimidinbasen. Dabei ist definiert, dass doppelsträngige DNA mit  $c = 50\mu\text{g/ml}$  eine Extinktion von 1 besitzt. Gleiches gilt für RNA-Lösungen bei  $c = 40\mu\text{g/ml}$ . Zur Abschätzung erhöhter Protein-kontamination ist der Quotient aus  $E_{260} : E_{280}$  herangezogen worden ( $\lambda_{\text{max}}$  aromatischer Aminosäuren = 280nm). Er sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

### 5.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von Nukleinsäuremischungen erfolgte über Agarosegelelektrophorese. Dabei wurden dem angestrebten Trennungsgrad entsprechend Konzentrationen von 0,8-2,5% (m/v) Agarose in 1xTAE eingesetzt. Die angelegte Spannung betrug 5-10V/cm. Vor dem Laden wurden die DNA- und RNA-Proben in 4x Ladepuffer verdünnt. In einigen Fällen ist Agarose mit geringerem Schmelzpunkt (LMP-Agarose) und einer Geliertemperatur von ca. 30°C verwendet worden. DNA-Fragmente konnten aus dem Gel geschnitten ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet werden.

Zur Visualisierung der Banden ist der aufgekochten Agaroselösung Ethidiumbromid als interkalierendes Agens zugefügt worden (0,1-0,5µg/ml), dessen Eigenfluoreszenz bei Anregung ( $\lambda = 302\text{nm}$ ) nach Interkalation massiv verstärkt wird. Als Standard dienten DNA-Größenmarker ( $\lambda$ -DNA/Eco1301, 100bp-LadderPlus).

4x Ladepuffer	0,25% (m/v) Bromphenolblau
	30% (v/v) Glycerol
	40% (v/v) 10x TAE-Puffer
	0,25% (m/v) Xylencyanol

## 5.5 Reverse Transkription (RT)

Zentrales Element dieser Methode ist die RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase), ein retrovirales Enzym, das RNA in den komplementären DNA-Strang (cDNA) überschreibt [Baltimore *et al.* 1970, Temin und Mizutani 1970].

Es wurden 0,5µg Gesamt-RNA (max. 7µl) als Matrize vorgelegt und 1µl Oligo(dT)-Primer (0,5µg/µl) oder 1µl RandomHexamer-Primer (0,5µg/µl) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 5min bei 65°C inkubiert und auf Eis heruntergekühlt. Nach Zugabe der unten aufgeführten Komponenten erfolgte die Transkription in einem Gesamtvolumen von 20µl bei 42°C über 50min. Sie wurde beendet durch einen Inkubationsschritt bei 95°C für 5min. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

4µl 5xRT-Puffer
2µl 0,1M DTT
1µl RNasin®
4µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP,dTTP; je 2,5mM)
1µl SuperScript™ II ReverseTranskriptase (200U/µl)

## 5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technologie basiert auf einem Verfahren, das seit 1985 [Saiki *et al.* 1985] und 1987 [Mullis und Faloona 1987] in seinem Anwendungsspektrum kontinuierlich erweitert wird. Es ermöglicht eine effiziente *in vitro* Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen, definiert über zwei Oligonukleotide (Primer), die gegenläufig an die komplementären Stränge aneliert sind. Zentrale Komponente sind thermostabile DNA-Polymerasen (z.B. *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*). Das Verfahren beruht auf einer zyklischen Wiederholung folgender 3 Schritte: Denaturierung der DNA, Annealing (Hybridisierung der Primer) und Elongation, ausgeführt in einem GenAmp Thermocycler:

Initiale Denaturierung	94°C, 10min
Denaturierung	94°C, 1min
Annealing	52-57°C, 1min
Elongation	72°C, 2min ( <i>Taq</i> -Polymerase); 74°C, 2min ( <i>Pfu</i> -Polymerase)
Finale Elongation	72°C, 2min

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen (vgl. Kap. 5.6.1 und 5.6.2):

	RNA-Sonden	Keratin-10/GAPDH	Genotypisierung
DNA	2µl cDNA	4µl cDNA	500ng gen. DNA
Primer-Mix (je 10pmol/µl)	4µl	4µl	2µl
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 2,5mM)	4µl	4µl	2µl
5x Polymerase-Puffer	10µl	10µl	5µl
DMSO	-	-	0,8µl
GoTaq® DNA-Polymerase	1U	1U	1U
DDW	ad 50µl	ad 50µl	ad 25µl

### 5.6.1 PCR von RT Produkten

#### RNA-Sonden

Der erste Amplifikationsschritt erfolgte bei  $T_{\text{Annealing}} = 52^{\circ}\text{C}$  über 30 Zyklen (*Taq*-Polymerase). Nach Aufreinigung über LMP-Agarose (vgl. Kap. 5.4) wurde das Amplikon in weiteren 25 Zyklen reamplifiziert (*Pfu*-Polymerase).

#### Semiquantitative Keratin-10 RT-PCR

Das PCR-Programm umfasste 30 Zyklen ( $T_{\text{Annealing}} = 56^{\circ}\text{C}$ , *Taq*-Polymerase). 10µl des 50µl-PCR-Ansatzes wurden elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Kap. 5.4). Ein Abgleich erfolgte über GAPDH-Amplifikate ( $T_{\text{Annealing}} = 56^{\circ}\text{C}$ , *Taq*-Polymerase, 23 Zyklen).

### 5.6.2 PCR zur Genotypisierung der TgN-SOCS3 Linien

Die Primer *pBKS-K5(+)* und *mmSOCS3(-) (III)* wurden zur genomischen DNA (vgl. Kap. 5.2.2) zugefügt (vgl. Kap. 1.7.3). *pBKS-K5(+)* war so konstruiert, dass er im bovinen Zytokeratin-5-Promoter des transgenen Konstruktes hybridisiert. Somit ergaben ausschließlich transgene DNA-Proben entsprechende Amplifikate. Nach 25 Zyklen bei  $T_{\text{Annealing}} = 57^{\circ}\text{C}$  ist der gesamte PCR-Ansatz elektrophoretisch aufgetrennt worden (vgl. Kap. 5.4). Als Positivkontrolle wurden 1,5pg des Plasmides *pBKS(+)**K5-SOCS3* mitgeführt.

## 5.7 Modifizierung von DNA

### 5.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)

Unter den bekannten Kategorien bakterieller Restriktionsendonukleasen (RE) schneiden ausschließlich Typ II-RE die DNA spezifisch an definierten Stellen. Diese Fähigkeit wurde zur Klonierung in analytischem und präparativem Maßstab und zum Abbau genomischer DNA beim Southern Blotting genutzt (vgl. Kap. 5.8 und 5.11). In Abhängigkeit vom Anwendungsbereich sind entsprechende Mengen DNA für 1h bei 37°C mit dem jeweiligen Enzym in Gegenwart eines geeigneten Puffers nach Anweisung des Herstellers inkubiert worden. Genomische DNA ist mit höheren Mengen des Enzyms und in Gegenwart von Spermidin über Nacht verdaut worden.

### 5.7.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die verwendete T4 DNA-Ligase gilt als Standardenzym für die Ligation von DNA-Fragmenten und ist in der Lage, mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit die Bildung kovalenter Phosphodiesterbindungen zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und 3'-Hydroxylfunktion von Nukleinsäuren zu katalysieren. Der Reaktionsansatz (20µl) bestand aus linearisierter Vektor-DNA (10-25ng), 2U T4 DNA-Ligase, 2µl 10x Ligationspuffer und 5µl bei 68°C geschmolzener LMP-Agarose mit dem gewünschten Insert (vgl. Kap. 5.4). Der Ansatz wurde über 3h bei RT oder 1h bei 37°C inkubiert.

## 5.8 Klonierung

### 5.8.1 Klonierung von RNA-Sonden

Um RNA-Sonden (200-350 Nukleotide) zu generieren, mussten die entsprechenden cDNA-Sequenzen aus RNA-Lysaten erstellt und unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotide amplifiziert werden. Die Amplifikate wurden über LMP-Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und in den pBluescript II (+) KS -Vektor ligiert, der zuvor mit *EcoRV* linearisiert wurde. Nach Transformation in *E.coli* wurde das rekombinante Plasmid aufgereinigt, sequenziert und zur Generierung der *antisense*-RNA mit *EcoRI* oder *HindIII* linearisiert. Der folgende Phenol/CHCl<sub>3</sub>-Extraktionsschritt ergab ein linearisiertes Plasmid, das im RPA (vgl. Kap. 5.10) eingesetzt werden konnte.

### 5.8.2 Klonierung von pBKS(+)K5-SOCS3

Das rekombinante Plasmid *pBKS(+)K5-SOCS3* ist Basis des TgN-SOCS3 Mausmodells. Zur Generierung dieses Plasmides wurde das transgene Vorläuferkonstrukt (Abb. III.4) unter Verwendung der Primer mmSOCS3-*Sall*(fwd) und mmSOCS3-*ClaI*(rev) (vgl. Kap. 1.7.1) aus dem Vektor *pcmSOCS3*, der die cDNA-Sequenz des murinen SOCS3-ORF enthielt und freundlicherweise von Itamar Goren (AG Frank) zur Verfügung gestellt wurde, über PCR amplifiziert ( $T_{\text{annealing}} = 52^{\circ}\text{C}$ , 30 Zyklen, *Pfu*-Polymerase). Das Amplikon wurde gelelektrophoretisch überprüft und anschließend mit *Sall* und *ClaI* verdaut. Das resultierende Konstrukt wurde über LMP-Gelelektrophorese aufgereinigt und in den Zielvektor *pBKS(+)K5* ligiert, der zuvor in analoger Verfahrensweise mit *Sall/ClaI* geschnitten und aufgereinigt wurde. Der resultierende Vektor *pBKS(+)K5-SOCS3* wurde in *E.coli* amplifiziert, isoliert und sequenziert.

## 5.9 Sequenzierung

Sequenzanalysen wurden leicht modifiziert nach dem Prinzip von F. Sanger und Kollegen [Sanger *et al.* 1977] unter Zuhilfenahme eines Abi-Prism Sequenziergerätes durchgeführt. Durch Verwendung verschiedenfarbig fluoreszierender 2',3'-Dideoxynukleotid-5'-Triphosphaten (ddNTPs) im dNTP-Mix kommt es zu Kettenabbrüchen der Synthesereaktion und somit zu einer Population unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die sich kapillarelektrophoretisch ihrer Länge nach auftrennen lassen. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes (Fluoreszenz) ist dabei spezifisch für das jeweilige endständige Nukleotid. Die zu sequenzierenden Proben sind nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt worden. Der Reaktionsansatz und das PCR-Programm sind unten aufgeführt. Die abschließende Auswertung der Sequenzspektren erfolgte über die Software des Geräteherstellers (Abi Prism sequencing analysis).

Reaktionsansatz:		PCR:	
1µl	Plasmid-DNA (250ng)	Denaturierung	96°C, 10sec
2µl	BigDye™-Terminatormix	Annealing	55°C, 5sec
1µl	Sequenzierprimer (1pmol)	Elongation	60°C, 2min
ad 10µl	DDW	Zyklenzahl	25

## 5.10 RNase-Verdau Schutzanalyse (RPA)

Dieses Verfahren stellt eine sensitive Methode zur relativen Quantifizierung bestimmter mRNA-Sequenzen aus RNA-Lysaten nach elektrophoretischer Auftrennung markierter Hybride dar. Letztere bestehen aus dem mRNA-Fragment und dem komplementären, [<sup>32</sup>P]-markierten *antisense*-Transkript (Sonde) und sind als Hybrid vor enzymatischem Verdau geschützt. Als interner Standard wurden jeweils GAPDH-Sonden mitgeführt. Das Verfahren lässt sich in 3 Abschnitte gliedern. Folgende Puffer fanden Verwendung:

	FLB80-Puffer	FAB-Puffer	RNase-Puffer
Formamid (deionisiert)	80% (v/v)	80% (v/v)	-
EDTA pH8	1mM	1mM	5mM
PIPES pH6,4	-	40mM	-
NaCl	-	400mM	-
NaOAc pH7	-	-	300mM
Tris/HCl pH7,5	-	-	10mM
TBE (1x)	0,01% (v/v)	-	-
Bromphenolblau	0,05% (m/v)	-	-
Xylencyanol	0,05% (m/v)	-	-

### 5.10.1 Generierung und präparative Aufreinigung der *antisense*-Transkripte

Das, wie unter 5.8.1 beschrieben, generierte und linearisierte Plasmid galt als Matrize für die initiale *in vitro*-Transkription der jeweils benötigten einzelsträngigen *antisense*-Sonde. Der Transkriptionsansatz stellte sich wie folgt dar:

1µl	linearisierte Plasmid-DNA (1µg/µl)	
1µl	Nukleotide (ATP, CTP, GTP; 5mM)	
2µl	Transkriptionspuffer	
0,4µl	RNasin® (40U/µl)	
1µl	RNA-Polymerase (T3 oder T7)	
2,5µl	[α- <sup>32</sup> P]UTP (800Ci/mmol)	
ad 10µl	DEPC-DDW	Inkubation: 1h, 37°C

Nach Zugabe von 90µl DEPC-DDW und anschließender Phenol/CHCl<sub>3</sub>-Extraktion ist das markierte Transkript aus der wässrigen Phase nach Hinzufügen von 40µl 7,5M NH<sub>4</sub>OAc ethanolisch gefällt worden. Als Carrier dienten 20µg tRNA (10µg/µl). Das Pellet ist in 20µl FLB80-Puffer aufgenommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt worden (5% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 8M Harnstoff, 1xTBE; 250V, 1h). Die radioaktiv-markierte Sonde konnte autoradiografisch detektiert (BAS-MP 2040S-Phosphoimaging-Platte, Phosphoimager BAS 1500, Tina 2.09g) und aus dem Gel eluiert werden (350µl; 0,1xTBE, 0,2% (m/v) SDS). Die Aktivität des Eluates wurde ge-



messen (TRI-CARB  $\beta$ -Counter). Im Anschluss wurden die für den folgenden Schritt benötigten Sondenmischungen hergestellt.

### 5.10.2 Hybridisierung und RNase-Verdau

10-25 $\mu$ g Gesamt-RNA sind mit einem entsprechenden Volumen an Sondenmischung versetzt (2,5cpm/Sonde je  $\mu$ g Gesamt-RNA) und nach Zugabe von NaOAc pH5,2 co-präzipitiert worden. Das Pellet wurde in 30 $\mu$ l FAB-Hybridisierungspuffer aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. Anschließend folgten eine Inkubation bei 85°C über 15min zur Denaturierung und schließlich die Hybridisierung über Nacht bei 42°C im Wasserbad. Am Folgetag sind alle nicht hybridisierten einzelsträngigen RNA-Sequenzen durch den Zusatz von 300 $\mu$ l RNase-Puffer (mit 35ng/ml RNase A und 720U/ $\mu$ l RNase T<sub>1</sub>; 30°C, 1h) hydrolytisch abgebaut worden. Die Reaktion wurde durch Inkubation mit 7 $\mu$ l 10% (m/v) SDS und 5 $\mu$ l Proteinase K (10 $\mu$ g/ $\mu$ l) (42°C, 15min) gestoppt. Die verbliebenen RNA-Hybride sind nach einem Extraktionsschritt mit 300 $\mu$ l basischem Phenol/Chloroform ethanolisch gefällt worden. 20 $\mu$ g tRNA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l) dienen erneut als Carrier. Die Pellets wurden in 25 $\mu$ l FLB80-Puffer aufgenommen.

### 5.10.3 Analytische Gelelektrophorese und Auswertung

Die Proben sind zunächst denaturiert (95°C, 5min) und im Anschluss auf ein Acrylamid/Harnstoff-Gel (vgl. Kap. 5.10.1) geladen worden. 1000cpm der freien Sonde dienten als Ladekontrolle (erste Spur). Nach 90min bei 250V wurden die Gele auf Whatman 3MM-Papier fixiert, getrocknet (Biorad Gel dryer, 80°C, 90min) und autoradiografisch ausgewertet.

## 5.11 Southern Blotting zur Genotypisierung der TgN-SOCS3 Linien

Das von Edwin M. Southern 1975 entwickelte Verfahren [Southern 1975] ermöglicht die Identifizierung eines spezifischen DNA-Fragments, das nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Matrix transferiert und mit einer markierten DNA-Sonde hybridisiert wird. Genomische DNA muss zunächst enzymatisch verdaut werden.

Das zur Genotypisierung angewandte Prinzip basiert auf der Tatsache, dass DNA-Konstrukte bei einer Pronukleusinjektion in der Regel in *head to tail*-Orientierung multipel

in das Genom integrieren. Wird dann genomische DNA des transgenen Organismus mit einem Restriktionsenzym inkubiert, für das nur eine Schnittstelle im Transgen existiert, entstehen Fragmente, die der Gesamtlänge des Konstruktes entsprechen (plus 5'-Anfangs- und 3'-Endfragmente mit unbekannter Länge).

### 5.11.1 Restriktionsverdau und elektrophoretische Auftrennung der Fragmente

Da für *Bam*HI nur eine Schnittstelle im Transgen existiert (Abb. III.4), wurden 7µg genomische DNA aus murinen Schwanzbiopsien (vgl. Kap. 5.2.2) mit 50U dieses Enzyms in Gegenwart von 3µl 0,1M Spermidin bei 37°C über Nacht in einem 150µl-Ansatz verdaut. Um einen quantitativen Verdau zu sichern, wurden am Folgetag weitere 25U *Bam*HI für 2h hinzugefügt. Der Ansatz wurde ethanolisch gefällt und aufgetrennt (0,8% (m/v) Agarosegelelektrophorese, 4°C, 130V, 4,5h) (vgl. Kap. 5.4). Als Positivkontrolle ist das *Kpn*I-Fragment aus *pBKS(+)**K5-SOCS3* (Abb. III.4) mitgeführt worden.

### 5.11.2 Transfer auf eine Nylonmembran (Blotting)

Vor dem Transfer (Blotting) der DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Membran (Amersham Hybond N+) ist das Gel zur Depurinierung und Denaturierung der DNA für 30min in 0,25M HCl und für 2x15min in 0,5M NaOH auf dem Schüttler inkubiert worden. Nach abschließendem Neutralisieren des Gels (30min; 0,5M Tris/HCl pH7, 1,5MNaCl) erfolgte das Blotten mit 20xSSC (3M NaCl, 300mM NaCitrat pH7,0) über Nacht (Kapillarblotverfahren). Abschließend ist die Membran nach Waschen in 2xSSC für 2h bei 80°C inkubiert worden, um adhärente DNA kovalent an die Matrix zu binden.

### 5.11.3 Hybridisierung und Auswertung

Nachdem die DNA-Fragmente auf die Membran fixiert wurden, erfolgte die Hybridisierung mit der DNA-Sonde. Diese ist unter Verwendung des Rediprime II Random Prime Labeling System (vgl. Kap. 1.3) und Redivue [<sup>32</sup>P]dCTP (3000Ci/mmol) nach dem Protokoll des Herstellers generiert worden [siehe auch: Feinberg und Vogelstein 1983]. Als Template dienten 20ng des *Sal*I/*Cla*I-Fragments aus *pBKS(+)**K5-SOCS3* (Abb. III.4), das aus einem LMP-Agarosegel ausgeschnitten wurde. Der Ansatz wurde fraktioniert (Nick<sup>TM</sup>-Säulen, vgl. Kap. 1.3). Die zweite Fraktion enthielt die Sonde mit

einer Aktivität von ca. 60kcpm/ $\mu$ l. Parallel zur Herstellung der Sonde ist die Nylonmembran über 4h bei 65°C in 80ml Hybridisierungspuffer (0,5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7% (m/v) SDS, 1% (m/v) BSA, 1mM EDTA; pH7,2) equilibriert worden. Anschließend ist der Puffer gegen 12,5ml frischen Hybridisierungspuffer ausgetauscht und mit der über 10min bei 95°C denaturierten, markierten Sonde versetzt worden (5x10<sup>6</sup>cpm; Inkubation über Nacht bei 65°C). Am Folgetag ist die Membran mit zunehmender Stringenz bis zu einer Restaktivität von 50-200IPS (Berthold LB 122 Handmonitor; Wildbad) gewaschen (Puffer 1 (2x SSC, 0,1% (m/v) SDS): 2x15min, 42°C + 30min, 65°C; Puffer 2 (0,5% SSC, 1% (m/v) SDS): 2x30min, 65°C), in Haushaltsfolie eingeschlagen und abschließend autoradiografisch ausgewertet worden (Exponierung 16h).

## 6 Genotypisierung der TgN-SOCS3 Mauslinien

Die Genotypisierung von Tieren der Founder-Generation erfolgte initial mittels Southern-Blotting (vgl. Kap. 5.11) und PCR (vgl. Kap. 5.6.2) nach Isolation genomischer DNA aus den Schwanzbiopsien der Mäuse (vgl. Kap. 5.2.2). Tiere der nachfolgenden Generationen wurden mittels PCR genotypisiert.

## 7 Tierexperimentelle Methoden

### 7.1 Haltung und Zucht

Alle verwendeten Mauslinien (vgl. Kap. 1.11) wurden unter definierten Bedingungen (21°C  $\pm$  2°C, Wasser und Futter *ad libitum*, künstlicher 12 h Tag-Nacht-Zyklus, 4-6 Tiere pro Käfig) in den Tierställen der Zentralen Forschungseinrichtung des Klinikums gehalten. Die Zucht der TgN-SOCS3 Linien erfolgte in SPF-Barrierhaltung (engl. selective pathogen free). Alle Versuche wurden unter konventionellen Haltungsbedingungen durchgeführt. Um eine Adaptation der Tiere an eine veränderte Haltungsform zu gewährleisten, wurde eine Karenz von 5 Tagen eingehalten.

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzrichtlinien durchgeführt und sind vom Regierungspräsidium des Bundeslandes Hessen in Darmstadt genehmigt (Akt.Z.: V54-19c20/15-F95/21).

## 7.2 Glukosetoleranztest

Zur Diagnose eines möglichen gestörten Glukosestoffwechsels in den TgN-SOCS3 Linien wurde ein Glukosetoleranztest durchgeführt. Dazu wurden die Tiere zur Ermittlung des basalen Blutzuckerspiegels zunächst über 12h gehungert, um anschließend 0,5ml einer sterilen Glukoselösung mit definiertem Glukosegehalt (1,5mg/g Körpergewicht) intraperitoneal zu applizieren. Vor der Applikation und zu festgelegten Zeitpunkten nach der Applikation konnte der Blutzuckerspiegel über eine Punktion der lateralen Schwanzvene unter Verwendung eines handelsüblichen Blutzuckermessgerätes (Accu-Check Aviva) ermittelt werden. Nicht-transgene Geschwistertiere dienten als Kontrolle.

## 7.3 Wundheilungsstudien

Studien zur Beurteilung der Wundheilung sind mit adulten weiblichen und männlichen Tieren im Alter von 8-12 Wochen und einem durchschnittlichen Gewicht von  $21 \pm 2$ g (FVB/N, BL6, BALB, TgN-SOCS3 Linien) bzw.  $50 \pm 2$ g (BL6-*ob/ob*) durchgeführt worden. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn anästhesiert (Ketamin 80mg/kg, Xylazin 10mg/kg in D-PBS) und im Bereich des Rückens vollständig rasiert. Nach Desinfektion der Rücken Haut mit 70% EtOH wurden 6 Vollhautexzisionswunden einschließlich des *panniculus carnosus* in definierter symmetrischer Anordnung gesetzt (5mm Durchmesser, 4mm Abstand). Zu definierten Zeitpunkten (1, 3, 5, 7, 13 Tage nach Verwundung) wurden die Tiere durch zervikale Dislokation nach initialer Isofluran-Narkose getötet und jede Wunde einschließlich des Wundrandes (2-3mm), des Granulationsgewebes und des Schorfes entnommen. Hautbiopsien in vergleichbarer Größe aus der Rücken Haut unverletzter Tiere dienten als Kontrolle.

Die entnommenen Gewebeproben wurden gepoolt und zur Isolation von RNA (n = 3 Wunden/Tier) und Protein (n = 2 Wunden/Tier) in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Jeweils eine Wunde des Tieres wurde zur Anfertigung histologischer Präparate eingebettet (vgl. Kap. 4.5.1). Zur statistischen Auswertung wurden für jeden Zeitpunkt vier individuelle Wundserien generiert.

### 7.3.1 Studien nach Applikation von 5-Bromo-2'-desoxyuridin

Zur Identifizierung proliferierender Wundareale ist Versuchstieren das synthetische Nukleosid 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) appliziert worden. Aufgrund struktureller Analogie zu Thymidin wird es in sich replizierenden Zellen in die DNA inkorporiert und ist anschließend immunhistochemisch detektierbar [de Fazio *et al.* 1987].

Die Tiere wurden verwundet wie in Kap. 7.3 beschrieben. Am 5. Tag nach Verletzung ist jeder Maus 1ml einer sterilen BrdU-Lösung (1mg/ml in D-PBS) intraperitoneal injiziert worden. Noch am selben Tag (6h nach BrdU-Injektion) wurden die Tiere getötet, die Wunden entnommen, eingebettet und tiefgefroren (-80°C) (vgl. Kap. 4.5.3).

### 7.3.2 Studien mit neutralisierendem Antikörper ( $\alpha$ TGF- $\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 3)

Die Tiere wurden verletzt wie in Kap. 7.3 beschrieben. Beginnend 6h vor der Verwundung wurden täglich um 7.00Uhr 500 $\mu$ l einer sterilen Lösung eines pan-spezifischen anti-TGF- $\beta$ -Antikörpers (2mg/kg Körpergewicht, Klon 1D11) bis einschließlich Tag 4 nach Verwundung intraperitoneal appliziert. Kontrollgruppen erhielten nach identischem Schema 500 $\mu$ l eines irrelevanten Kontrollantikörpers desselben Isotyps (mAB anti-KLH; 2mg/kg Körpergewicht; Klon 11711.11). Am 5. Tag nach Verletzung wurden die Tiere getötet, die Wunden fotografiert (Fuji F30) und wie beschrieben entnommen.

### 7.3.3 Studien nach Leptinsubstitution in *ob/ob*-Mäusen

Ab dem Tag der Verwundung sind *ob/ob*-Versuchstieren 0,5ml einer Lösung aus murinem rekombinantem Leptin (2 $\mu$ g/g Körpergewicht in PBS; Calbiochem, Bad Soden) für 13 Tage i.p. appliziert worden. Tiere der *ob/ob*-Kontrollgruppe erhielten 0,5ml PBS.

## 7.4 Präparation von Dermis und Epidermis

Die Tiere wurden getötet wie in Kap. 7.3 beschrieben. Nach dem Abtrennen des Schwanzes wurde die Schwanzhaut abgezogen und für 30min bei 37°C in 2M NaBr-Lösung inkubiert. Im Anschluss konnte die Epidermis als intakter Gewebeverband von der Dermis abgetrennt werden. Die Lagerung der Gewebeproben erfolgte bei -80°C.

### **III ERGEBNISSE**

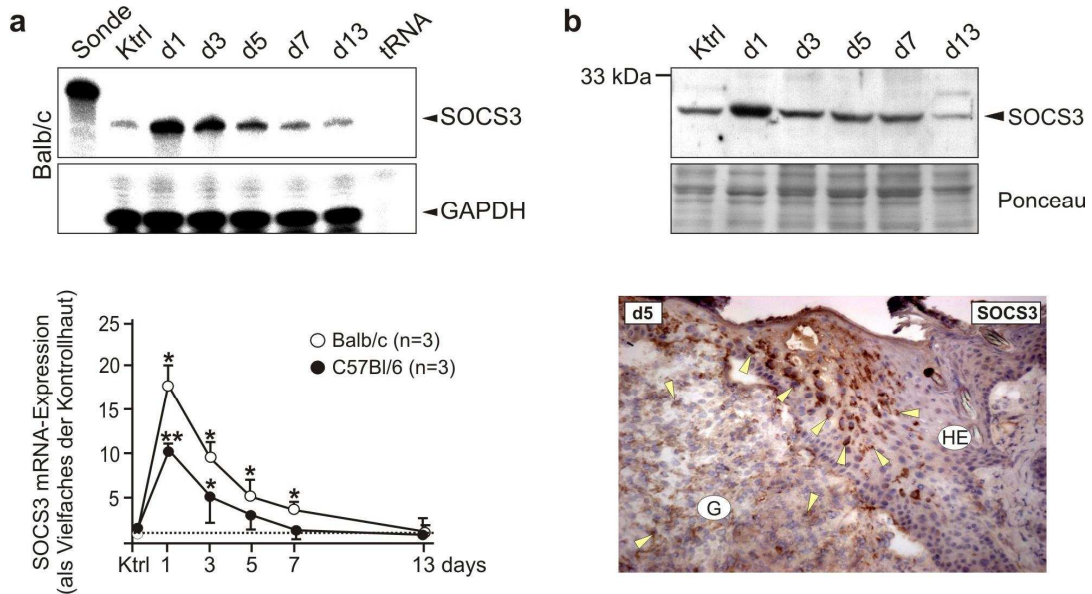
#### **1 SOCS3 im Prozess der Wundheilung**

Zur initialen Charakterisierung des SOCS3-Proteins im Kontext der kutanen Wundheilung ist zunächst dessen Expressionskinetik im Heilungsverlauf auf mRNA- und Proteinniveau untersucht worden. Im Anschluss sind in immunhistochemischen Färbungen unter Verwendung spezifischer Antikörper SOCS3-exprimierende Zellen im Wundgewebe lokalisiert worden. Als Basismodell dienten dazu stoffwechselgesunde Mäuse der Inzuchtstämme C57BL/6 und Balb/c. Das Alter der Versuchstiere wurde auf 12 Wochen  $\pm$  5 Tage festgelegt. Im Wundheilungsexperiment wurden in den Rücken der Tiere 6 Vollhaut-Exzisionswunden gesetzt (inklusive des *Panniculus carnosus*). Nach 1, 3, 5, 7 und 13 Tagen wurden die Tiere getötet und jede Wunde einschließlich des Wundrandes (2-3mm), des Granulationsgewebes und des Schorfes entnommen. Hautbiopsien in vergleichbarer Größe aus der Rückenhaut unverletzter Tiere dienten als Kontrolle für unverletzte Haut. Die entnommenen Gewebeproben wurden nach definiertem Schema zur Isolation von RNA (n = 12 Wunden; je 3 Wunden von 4 Tieren) und Protein (n = 8 Wunden; je 2 Wunden von 4 Tieren) vereinigt. Aus der 6. Wunde wurden histologische Präparate zur Herstellung von Gefrierschnitten angefertigt, die dazu vor dem Einbetten vertikal halbiert wurde.

##### **1.1 SOCS3 ist in der akuten Entzündungsphase eines normalen Heilungsprozesses induziert**

Nachdem sich bereits unverletzte Kontrollhaut durch eine basale Expression von SOCS3 auszeichnete, konnte nach Verletzung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine deutliche Induktion der SOCS3-Expression im Wundgewebe detektiert werden (Abb. III.1). Dabei fiel auf, dass sich die mRNA-Expression der unterschiedlichen Maus-Hintergrundstämme in ihrer Amplitude, aber nicht in ihrer Kinetik unterschied. Die Proteinexpression folgte ohne zeitlichen Verzug der mRNA-Kinetik. Interessanterweise wurde der maximale Expressionsspiegel bereits nach sehr kurzer Zeit (Tag 1 nach Verwundung) erreicht. Mit zunehmendem Heilungsfortschritt sank die Expression

wieder, um nach Abschluss der Reepithelialisierungs- und Remodellierungsphase der basalen Expression zu entsprechen.



**Abb. III.1: Regulation der SOCS3-Expression im Heilungsprozess gesunder Wildtyp-Mäuse**

Stoffwechselgesunde adulte Tiere der Stämme C57BL/6 und Balb/c wurden verletzt. Aus entnommenen Wunden wurden Gesamt-RNA- und Gesamtproteinlysate sowie Gefrierschnitte (8µm) erstellt. **(a)** In einer RNase-Verdauungsanalyse sind SOCS3-mRNA-Spiegel in unverletzter Haut (Ktrl) und Wunden der Heilungstage 1-13 (d1-d13) ermittelt worden (aus je 15µg Gesamt-RNA). Die obere Abbildung zeigt eine repräsentative Balb/c-Serie. Jeder Zeitwert entspricht Wunden (n=12) aus 4 individuellen Tieren. Als Größenmarker diente 1kcpm der Sonde, zur Ladekontrolle wurde GAPDH hybridisiert. Die signalfreie tRNA-Spur demonstriert die Spezifität der Sonden. Der untere Teil zeigt eine statistische Auswertung der Mittelwerte ± SD aus 36 Wunden pro Zeitpunkt (je 3 Wunden aus 12 individuellen Tieren), erhoben aus Balb/c- und C57BL/6-Tieren, dargestellt als ein Vielfaches der Kontrollhautspiegel. \* p<0,05; \*\* p<0,01 (ungepaarter t-Test). **(b)** Im Immunoblot (50µg Gesamtprotein, 12% SDS-Gel) und in histologischen Tag 5-Wundsnitten (unten) konnte das SOCS3-Protein nachgewiesen werden. Jeder Zeitwert im Immunoblot entspricht je 2 Wunden aus 4 Tieren (n=8) Eine Ponceau S-Färbung diente zur Ladekontrolle. Pfeile im repräsentativen histologischen Wundsnitt verweisen auf stark immunpositive Signale. G: Granulationsgewebe; HE: hyperproliferierendes Epithel

Immunhistochemische Untersuchungen in Tag 5-Wunden zeigten deutlich, dass neben einer großen Zahl immunpositiver Zellen im Granulationsgewebe vor allem Keratinozyten des hyperproliferierenden Epithels (HE) zur Population SOCS3-exprimierender Zellen zählten. Interessanterweise beschränkte sich die starke Expression im HE auf eine dem Wundinneren zugewandten Untergruppe an Keratinozyten, die unmittelbar hinter der führenden Epithelzunge lokalisiert war.

## 1.2 Lokalisierung der SOCS3-Expression im Wundgewebe

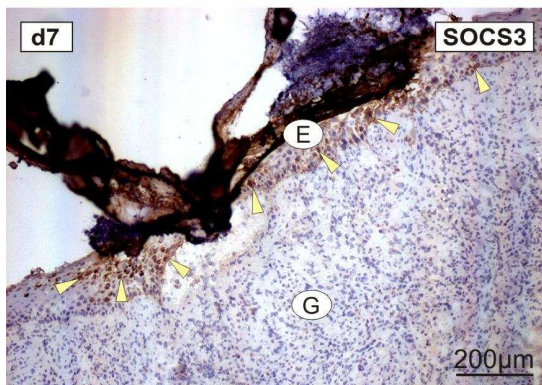
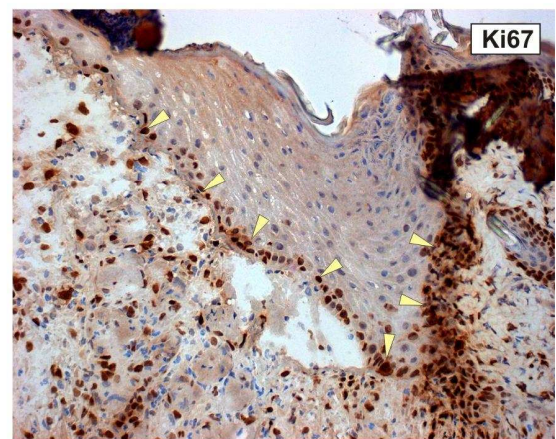
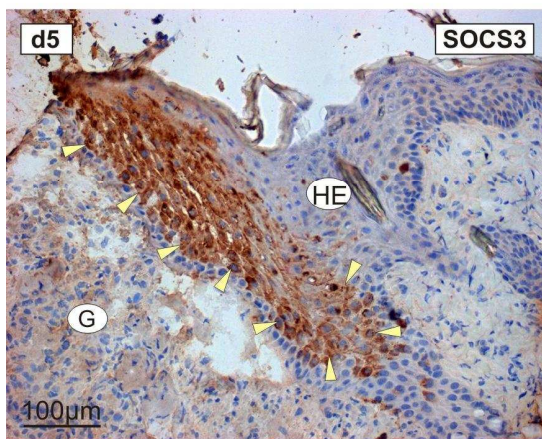
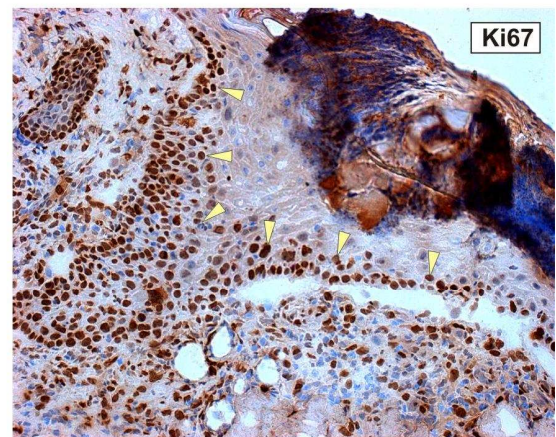
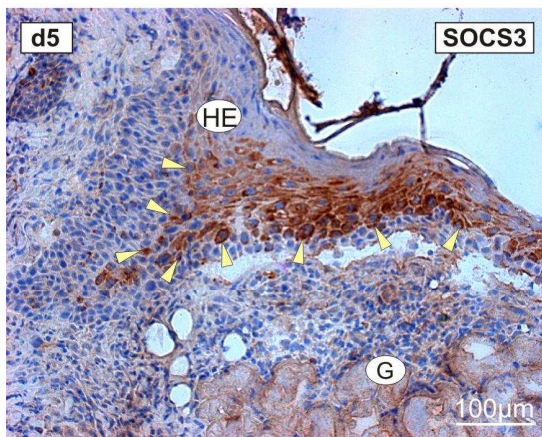
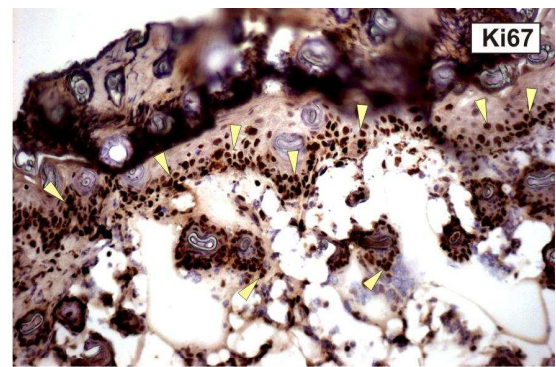
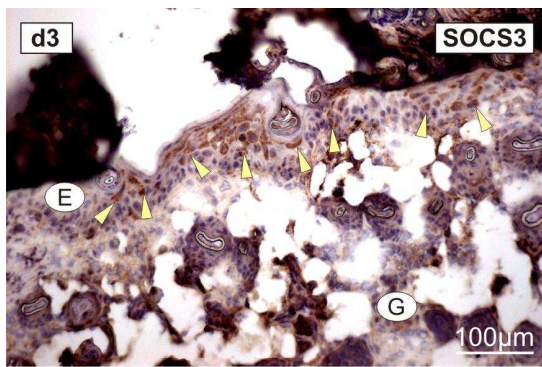
Mit dem Ziel, die funktionelle Bedeutung einer Induktion der SOCS3-Expression für die allgemeine Keratinozytenphysiologie zu klären, konnte anhand verschiedener stabil SOCS3-überexprimierender HaCaT-Zelllinien gezeigt werden, dass das Protein mit den Teilprozessen Keratinozytendifferenzierung und -proliferation interferiert [Goren *et al.* 2006a]. Die Höhe der SOCS3-Spiegel stand deutlich in negativer Korrelation zur Proliferationsaktivität der Zellen bei gleichzeitig gesteigerter Expression der Differenzierungsmarker Keratin 1, Keratin 10 und Loricrin.

Somit lag nahe, die *in vitro* aufgezeigte funktionelle Verknüpfung zwischen SOCS3 und der Zellproliferation *in vivo* zu überprüfen. Histologische Wundpräparate aus der Akutphase des Regenerationsprozesses (Heilungstage 3, 5 und 7) sind immunhistochemisch erneut gegen SOCS3 und zusätzlich gegen den Proliferationsmarker Ki67 gefärbt worden, der in der teilungsaktiven Zellpopulation des Zellverbandes (S/G<sub>2</sub>/M-Übergang) exprimiert wird [Gerdes *et al.* 1983 und 1984]. Dazu sind Serien-Gefrierschnitte mit einer Schnittstärke von 8µm herangezogen worden, um Aussagen zur relativen Lokalisierung positiv gefärbter Zellen zueinander treffen zu können.

In Übereinstimmung mit der in Kapitel 1.1 beschriebenen Beobachtung konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten neoepidermale Keratinozyten der Wundränder als SOCS3-exprimierende Zellen identifiziert werden, wobei erneut nicht alle epidermalen Zellen positiv gefärbt waren. Als außerordentlich interessant stellten sich anschließend die Ergebnisse der Ki67-Färbung direkt benachbarter Serienschnitte heraus. Vor allem in Präparaten aus Wunden des 5. Heilungstages, in denen das HE der Wundränder besonders charakteristisch ausgeprägt war, war deutlich zu erkennen, dass sich die Expressionen von SOCS3 und Ki67 gegenseitig ausschlossen. Während eine dem Wundinneren zugewandte Unterpopulation suprabasaler Keratinozyten des HE immunpositiv gegen SOCS3 gefärbt werden konnte, waren es innerhalb des epidermalen Kompartiments ausschließlich Zellen im wundäußeren Teil des HE und basale Keratinozyten, die eine Ki67-Expression zeigten. Auch in benachbarten Gefrierschnitten der Tage 3 und 7 nach Verletzung wurde deutlich, dass eine Kolokalisierung einer SOCS3- und Ki67-Expression in Keratinozyten ausgeschlossen werden konnte. Die Erkenntnisse aus vorhergehenden Zellkulturversuchen sind somit für die Heilungssituation im Tier bestätigt worden.



**Abb. III.2: Lokalisierung SOCS3- und Ki67-positiver Zellen am Wundrand normal heilender Wunden**  
Stoffwechselgesunde adulte Tiere der Stämme C57BL/6 und Balb/c wurden verletzt. Aus entnommenen Wunden der Tage 3, 5 und 7 nach Verletzung wurden Serien-Gefrierschnitte (8µm) erstellt. Direkt benachbarte Schnitte sind unter Verwendung spezifischer Antikörper immunhistochemisch gegen SOCS3 (linke Hälfte) und Ki67 (rechte Hälfte) gefärbt worden. Dargestellt ist eine Auswahl repräsentativer Präparate aus C57BL/6-Tieren. Pfeile kennzeichnen stark immunpositiv-gefärbte Zellen. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. E: Epidermis; HE: hyperproliferierendes Epithel; G: Granulationsgewebe

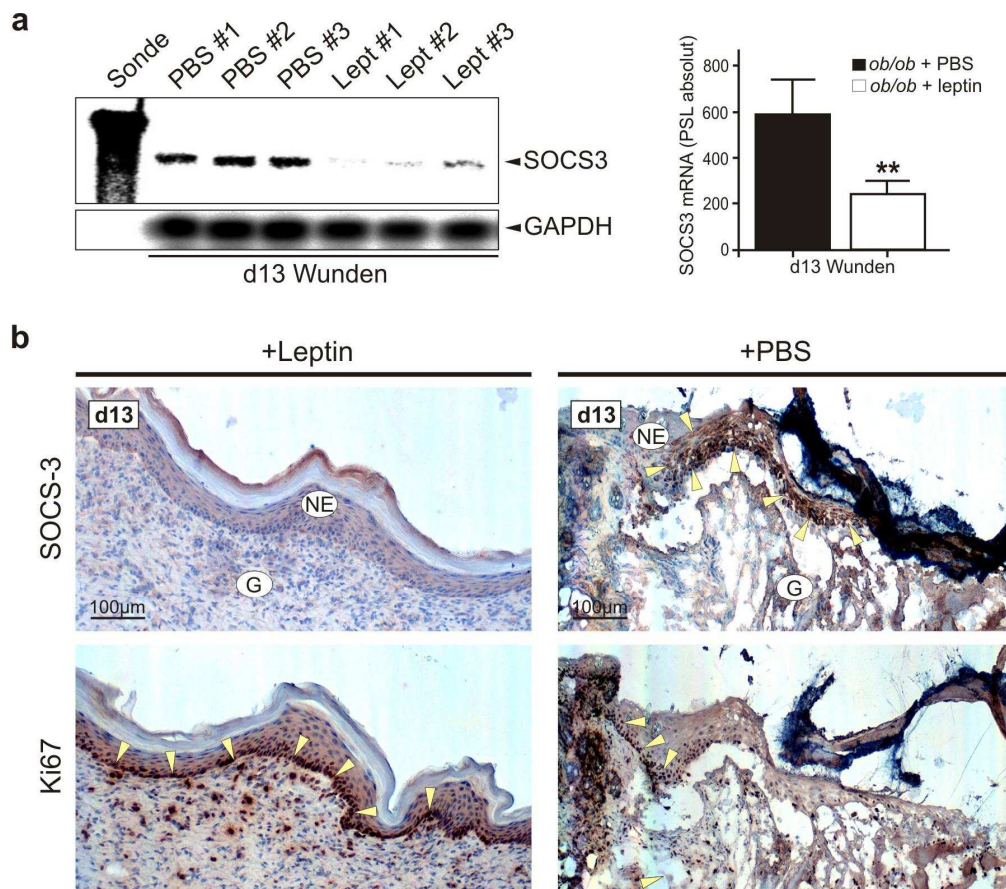


### 1.3 Verstärkte und verlängerte SOCS3-Expression bei diabetisch-gestörtem Heilungsverlauf

Im nächsten Schritt sollte die Regulation von SOCS3 in Wunden diabetischer Mäuse untersucht werden, um mögliche Unterschiede zum stoffwechselgesunden Tier zu charakterisieren. Als Tiermodell wurde auf den etablierten C57BL/6J-*ob/ob*-Stamm zurückgegriffen, dessen diabetischer Phänotyp aus einem homozygoten Verlust des *ob*-Gens und damit des von ihm kodierten Leptins resultiert. Eine ausgeprägte Adipositas und ein daraus resultierender Typ II-Diabetes sind Folgen der Leptindefizienz [Coleman 1978; Zhang *et al.* 1994].

In einer Vielzahl verschiedener Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ähnlich der Situation beim humanen Typ II-Diabetes die Wundheilung im diabetischen *db/db*- und *ob/ob*-Mausmodell drastisch gestört ist und von einer massiven Entzündung begleitet wird [Frank *et al.* 2000; Ring *et al.* 2000; Wetzler *et al.* 2000a; Stallmeyer *et al.* 2001; Goren *et al.* 2003a; Kämpfer *et al.* 2003 und 2005]. Interessanterweise führte die Substitution des fehlenden Leptins in der *ob/ob*-Maus gut sichtbar zu einem weitestgehend normalisierten Wundheilungsgeschehen [Frank *et al.* 2000; Ring *et al.* 2000]. Der Blutzuckerspiegel sank, das Gewicht der Tiere konnte reduziert werden und histologische Untersuchungen der Wundmorphologie ergaben entgegen der Situation in PBS-behandelten Tieren gut ausgebildete, starke Neopithelien.

Unter Ausnutzung dieses Wissens wurden Tiere des C57BL/6J-*ob/ob*-Stammes in Analogie zu der in Kapitel 1.1 aufgeführten Verfahrensweise verletzt. Dabei wurden 2 Versuchsgruppen definiert: die erste Gruppe erhielt beginnend mit dem Tag der Verwundung bis zum 13. Tag nach Verwundung einmal täglich 500µl einer Lösung aus rekombinantem murinem Leptin (2µg/g Körpergewicht in PBS) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Einer zweiten Gruppe wurden nach gleichem Schema 500µl PBS i.p. verabreicht. Wie erwartet zeigten Tiere der PBS-Kontrollgruppe massive Störungen im Heilungsverlauf, wogegen die Wunden Leptin-behandelter Tiere deutlich besser heilten. Die Analyse der SOCS3-mRNA-Expression ergab in der PBS-Kontrollgruppe hohe Expressionsspiegel bis in späte Phasen des Heilungsverlaufes. Interessanterweise führte die Leptinsubstitution nicht nur zu einer deutlich beschleunigten Wundheilung, sondern auch zu einer signifikant verminderten SOCS3-mRNA-Expression in den Wunden Leptin-behandelter Mäuse (Abb. III.3a).



**Abb. III.3: SOCS3 und Ki67-Expression in diabetisch-gestörter Wundheilung an Tag 13**

Zwei Versuchsgruppen adulter diabetischer *ob/ob*-Mäuse wurden verletzt. Eine Gruppe erhielt einmal täglich 500µl einer Leptin-Injektion (2µg/g Körpergewicht in PBS) über 13 Tage, die zweite nach gleichem Schema 500µl PBS. Aus Wunden des 13. Tages (d13) nach Verletzung wurden Gesamt-RNA-Lysate und Gefrierschnitte (8µm) erstellt. (a) In einer RNase-Verdauerschutzanalyse sind SOCS3-mRNA-Spiegel im Wundgewebe ermittelt worden (aus je 15µg Gesamt-RNA). Jeder Wert in der linken Abbildung entspricht 4 Wunden (n=4). Aufgezeigt sind jeweils 3 Leptin-behandelte Tiere (Lept #1 - Lept #3) und 3 Kontrolltiere (PBS #1 - PBS #3). Als Größenmarker diente 1kcpm der Sonde, zur Ladekontrolle wurde GAPDH hybridisiert. Die rechte Hälfte zeigt eine statistische Auswertung der Mittelwerte ± SEM aus je 12 Wunden (je 3 Wunden aus 4 individuellen Tieren). \*\* p<0,01 (ungepaarter t-Test); PSL: *photon stimulated luminescence*. (b) Histologische Präparate aus Tag 13-Wunden beider Versuchsgruppen wurden immunhistochemisch gefärbt (benachbarte Serienschnitte) und Kerne mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. Pfeile weisen auf stark immunpositive Signale. G: Granulationsgewebe; NE: Neoepithel

Die sich anschließende immunhistochemische Analyse der Tag 13-Wunden sollte die zellulären Quellen der SOCS3-Expression aufdecken. Während in Wunden Leptin-behandelter Tiere weder im Granulationsgewebe, noch in der Neoepidermis SOCS3-immunpositive Signale detektierbar waren, konnten in heilungsdefizienten Wunden aus Tieren der Kontrollgruppe, die noch immer nicht vollständig reepithelialisiert waren, in der Tat Keratinozyten der atrophischen Wundränder als die Hauptquelle der SOCS3-Expression identifiziert werden (Abb. III.3b oben). In Analogie zu den Beobachtungen

in stoffwechselfgesunden Tieren des C57BL/6-Hintergrundes erwiesen sich Keratinozyten der SOCS3-exprimierenden Fraktion erneut als teilungsinaktiv. Ausschließlich SOCS3-negative Keratinozyten zeigten immunpositive Signale für den Proliferationsmarker Ki67 (Abb. III.3b unten) und unterstützten den Verdacht einer kausalen Verbindung zwischen einer erweiterten Präsenz des inhibitorischen Proteins SOCS3 und Heilungsverzögerungen in Wunden diabetischer Tiere, deren Wunden maßgeblich durch eine pathologisch veränderte Reepithelialisierungskapazität charakterisiert sind.

## 2 SOCS3-Überexpression im transgenen Mausmodell

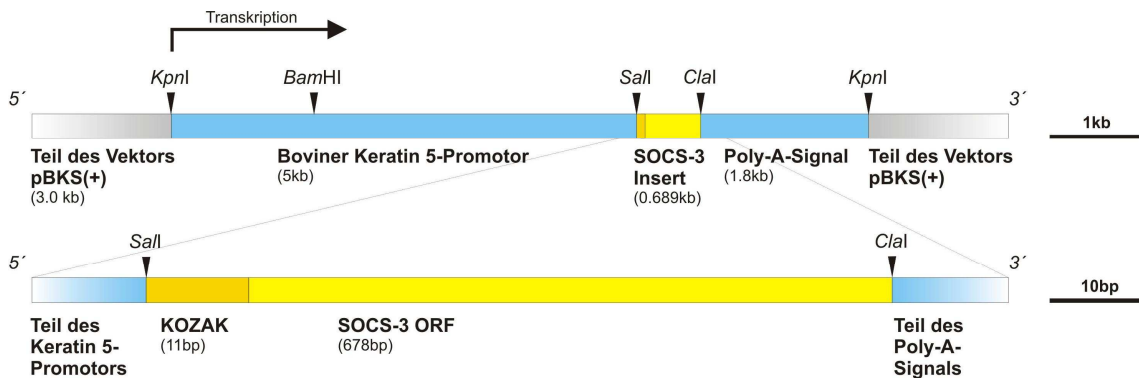
Der Wundheilungsverlauf in insulinresistenten, Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäusen ist massiv gestört [Frank *et al.* 2000; Ring *et al.* 2000; Goren *et al.* 2003a und 2006a] und neben einer deutlich verlängerten Entzündungssituation durch eine verstärkte und verlängerte SOCS3-Expression im atrophischen Neopithel heilungsdefizienter Wunden charakterisiert (vgl. Kap. 1.3). Um den Verdacht einer möglichen funktionellen Verbindung zwischen der Fehlregulation der SOCS3-Expression und einer drastisch gestörten Wundheilung zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell generiert, in dem SOCS3 unter der Kontrolle eines bovinen Keratin 5-Promotors konstitutiv exprimiert wird. Keratin 5-Filamente sind intrazelluläre Strukturproteine des epidermalen Zytoskeletts, die ausschließlich in basalen Zellen der innersten epidermalen Schicht und in follikulären Zellen exprimiert werden. Somit erfolgte die Überexpression des Transgens gerichtet und exklusiv im basalen Kompartiment sowie in epidermalen Zellen der Haarfollikel [vgl. Luster *et al.* 1998; Mann *et al.* 2001; Gonzalez-Suarez *et al.* 2001; Amendt *et al.* 2002].

### 2.1 Generierung der Founder-Generation

Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mauslinien sind in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut (MPI) für Biochemie (München/Martinsried) in den Laboratorien von Prof. Reinhard Fässler durch Pronukleusinjektion generiert worden. Die Mikroinjektion eines DNA-Konstruktes in den Vorkern befruchteter Eizellen stellt ein häufig verwendetes Verfahren zur Erstellung genetisch modifizierter Labormäuse dar. Es wurde bereits 1974 beschrieben [Jaenisch und Mintz 1974]. Dennoch ist es erst in den

1980er Jahren erfolgreich gelungen, mit Hilfe dieser Methode transgene Tiere zu erstellen [Gordon *et al.* 1980; Brinster *et al.* 1981; Wagner *et al.* 1981].

Basis des transgenen Konstruktes dieser Arbeit war *pBKS(+)*K5, ein rekombinanter Vektor, der von Prof. M. Blessing (Mainz) zur Verfügung gestellt und bereits in mehreren Arbeiten erfolgreich verwendet wurde [Neufang *et al.* 2001; Amendt *et al.* 2002]. Dieser Vektor enthielt bereits die Promotorsequenz sowie das Splice- und Polyadenylierungssignal des bovinen Keratin 5-Gens. Das transgene Vorläuferkonstrukt, bestehend aus dem murinen SOCS3-ORF (engl. offenes Leseraster) und einer Erweiterung in 5'-Richtung um eine KOZAK-Konsensussequenz (Abb. III.4) [Kozak 1986 und 1987], wurde über *SalI* und *Clal*-Schnittstellen hinter den Keratin 5-Promotor in den Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid wird als *pBKS(+)*K5-SOCS3 bezeichnet.



**Abb. III.4: Schematische Darstellung des transgenen Konstruktes in *pBKS(+)*K5-SOCS3**

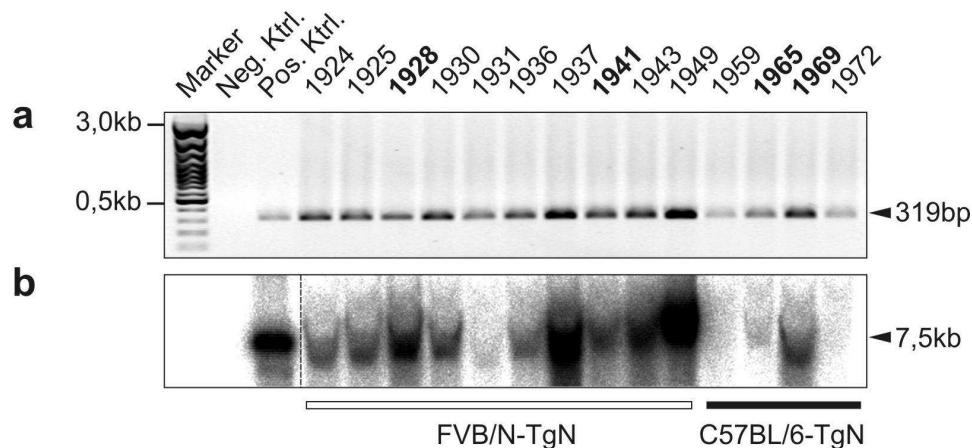
Der murine SOCS3-ORF wurde in 5'-Richtung um eine KOZAK-Konsensussequenz erweitert und als Vorläuferkonstrukt in *pBKS(+)*K5 ligiert. Aus dem resultierenden Plasmid *pBKS(+)*K5-SOCS3 wurde das finale transgene Konstrukt über *KpnI*-Restriktionsschnittstellen aus dem Vektor herausgetrennt und in Vorkerne fertilisierter Oozyten mikroinjiziert. Die Verwendung des Keratin 5-Promotors führt zu einer starken und gerichteten Expression des Transgens in Basalzellen des epidermalen Kompartimentes.

Nach dem Heraustrennen des transgenen Konstruktes aus *pBKS(+)*K5-SOCS3 über *KpnI*-Schnittstellen konnte das *KpnI*-Fragment in den Laboratorien des Kooperationspartners in Martinsried aufgereinigt und in den Pronukleus fertilisierter Oozyten der Stämme C57BL/6 und FVB/N mikroinjiziert werden. Bei diesem Verfahren wird das Transgen zufällig und meist multipel in die DNA des Vorkerns integriert. Überlebende Embryonen wurden im 2-Zell-Stadium in scheinchwangere Ammenmütter implantiert und ausgetragen. Insgesamt 55 potenziell transgene Tiere sind geboren worden. Diese erste Generation wird als Founder-Generation (engl. Gründer-Generation) bezeichnet.

## 2.2 Genotypisierung potenziell-transgener Tiere der Founder-Generation

Um eine Zucht transgener Linien aufbauen zu können, mussten die Founder-Tiere zunächst auf Transgenität überprüft werden. Dies erfolgte initial mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide, die so konstruiert waren, dass ausschließlich aus der DNA transgener Tiere Amplifikate mit einer Länge von 319bp resultierten. Die PCR-Ergebnisse wurden im Anschluss unter Verwendung der Southern Blot-Methodik unter Verwendung einer spezifischen  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde verifiziert (Matrize: *SalI-ClaI*-Fragment aus *pBKS(+)**K5-SOCS3*).

Die Integration des Transgens bei einer Pronukleusinjektion erfolgt üblicherweise als *head-to-tail concatemer* (engl. Kopf-zu-Ende Concatemer). Verdaut man nun genomische DNA mit einem Restriktionsenzym, für das nur eine Schnittstelle im Transgen existiert (*Bam*HI), entstehen Fragmente, die der Gesamtlänge des Transgens entsprechen (hier: 7,5kb; vgl. Abb. III.4) [Schneider und Wolf 2005].



**Abb. III.5: Genotypisierung der Founder-Generation**

Aus 55 Founder-Tieren sind die 14 aufgeführten Tiere als Transgen-positive Individuen ermittelt worden. Die Signalstärke korreliert dabei mit der Zahl der integrierten Kopien des transgenen Konstruktes. Tiere mit den Nummern 1924-1949 wurden im Stamm FVB/N generiert (FVB/N-TgN), Tiere der Nummern 1959-1972 im Stamm C57BL/6 (C57BL/6-TgN). (a) PCR Analyse mit 500ng genomischer DNA. Positivkontrolle (Pos. Ktrl.): 1,5pg *pBKS(+)**K5-SOCS3*. Negativkontrolle (Neg. Ktrl.): 500ng C57BL/6-WT-DNA. (b) Southern Blot Analyse mit 7µg genomischer DNA. Verdaut wurde mit *Bam*HI, hybridisiert mit einem  $^{32}\text{P}$ -markierten Transkript, für dessen Synthese das *SalI-ClaI*-Fragment aus *pBKS(+)**K5-SOCS3* als Matrize diente. Proben der Founder, die zum Aufbau der verwendeten Linien genutzt wurden, sind markiert (Nr. 1928, 1941, 1965, 1969). Positivkontrolle: 1ng *pBKS(+)**K5-SOCS3*, der zuvor mit *KpnI* verdaut wurde.

In 14 von 55 getesteten Founder-Tieren konnte sowohl in der PCR als auch in der Southern Blot Analyse das Transgen detektiert werden (Abb. III.5). Neben zehn positiv-transgenen Tieren, die im Stamm FVB/N generiert wurden (Nr. 1924-1949), konnten

vier transgene Founder mit C57BL/6-Hintergrund ermittelt werden (Nr. 1959-1972). Letztere waren besonders wertvoll, da der C57BL/6-Inzuchtstamm experimentell häufig Verwendung findet, einer Generierung genetisch modifizierter Tiere über Pronukleusinjektion jedoch nur mit geringer Effizienz zur Verfügung steht [Taketo *et al.* 1991]. In den Ergebnissen beider Verfahren ist erkennbar, dass die der Bandenintensität entsprechende Zahl der Kopien des Transgens variiert. Dabei korreliert die Intensität der PCR-Amplikons mit dem Muster des Southern Blot. Die größte Zahl transgener Kopien konnte im Genom des Tieres 1949 detektiert werden, die geringste Kopienzahl im Genom des Tieres 1959, für das zwar in der PCR ein klares Signal erkennbar ist, die Bedingungen des Southern Blot jedoch nicht sensitiv genug waren.

## **2.3 Etablierung und Phänotypisierung der transgenen Mauslinien**

Alle transgenen Founder wurden in die Tierställe des Uniklinikums Frankfurt überführt und im Alter von 12 Wochen mit WT-Mäusen des gleichen genetischen Hintergrundes verpaart, um den Inzuchtstatus aufrecht zu erhalten. Dabei ist jeder Founder als eigene Linie behandelt worden. Die hemizygot-transgenen Nachkommen aller Linien waren fertil und entwickelten sich normal. Sie wiesen keine morphologischen Anomalien oder atypischen Bewegungs- und Verhaltensmuster auf.

### **2.3.1 Expression des Transgens in der F1-Generation**

Wie bereits erwähnt geschieht die Integration des Transgens bei einer Pronukleusinjektion zufällig, in variabler Kopienzahl und zum Teil an mehreren Integrationsstellen [Schneider und Wolf 2005]. Oft erfolgt sie nicht im Einzellstadium, sondern in einer späteren Phase der Embryogenese, so dass die Founder tendenziell ein genetisches Mosaik darstellen. Positions- und Silencingeffekte führen dazu, dass die Zahl der integrierten Kopien keinesfalls zwingend mit dem Expressionsspiegel des Transgens korreliert und dass einige Founder das Transgen selbst nicht exprimieren oder sogar infertil sind [Rülicke und Hübscher 2000]. Bei Kenntnis dieser Tatsache ist es daher von untergeordneter Bedeutung, die genaue Kopienzahl zu kennen.

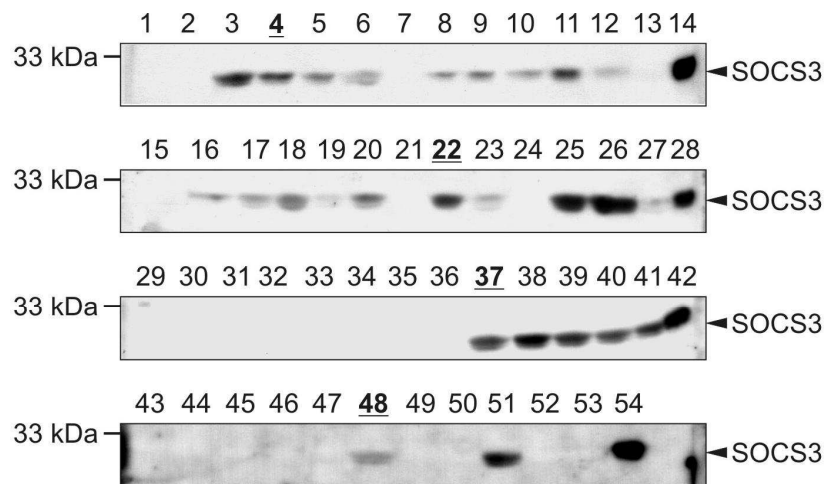
Das Mosaikproblem bedingt, dass eine Keimbahntransmission oft ausbleibt und Founder-Tiere das Transgen nicht oder zumindest nicht im Verhältnis des Mendelschen Gesetzes vererben. Erst Individuen der F1-Generation geben das Transgen als normales



Mendelsches Gen weiter. Daher war es von pivotaler Bedeutung, möglichst viele Transgen-positive Nachkommen der F1-Generation zu erhalten, um anschließend in Hautbiopsien den Expressionsspiegel zu ermitteln.

Zunächst wurden 188 Nachkommen der ersten Folgegeneration mittels RCR genotypisiert. Anschließend wurden aus dieser Generation 58 Transgen-positive, 10 Transgen-negative Geschwistertiere sowie zwei unabhängige WT-Tiere (FVB/N und C57BL/6) biopsiert und aus den Gewebeproben ein Gesamtproteinlysate hergestellt. Die Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen SOCS3 ermöglichte im Immunoblot den direkten Nachweis des Proteins. Wie erwartet befand sich die SOCS3-Expression in gesunder WT-Kontrollhaut und in der Haut nicht-transgener Geschwistertiere nahe an der Detektionsgrenze. Es ist bekannt, dass die Expression der SOCS-Proteine eng kontrolliert wird und daher basal sehr gering ausfällt (Abb. III.6) [Krebs und Hilton 2000; Greenhalgh und Hilton 2001; Goren *et al.* 2006a]. Weiterhin zeigten nicht alle Transgen-positiven Tiere eine Expression des Transgens; zudem variierte der Expressionsspiegel innerhalb eines Wurfes, was auf ein genetisches Mosaik des transgenen Elternteils oder auf mehrere Integrationsstellen hinweisen kann.

Mit dem Ziel, eine Zucht individueller transgener Linien aufzubauen, die eine unterschiedliche, aber für die zu untersuchende Fragestellung geeignete Expression des Transgens aufweisen, konnten zwei Tiere mit einem FVB/N-Hintergrund (Nr. 4 und 22) und zwei Tiere mit einem C57BL/6-Hintergrund (Nr. 37 und 48) ausgewählt werden, die zur Erzeugung hemizygot-transgener Nachfahren mit WT-Tieren des gleichen genetischen Hintergrundes verpaart wurden.



Spur	Probe	Genotyp	Founder	Hintergrund	Linie	Spur	Probe	Genotyp	Founder	Hintergrund	Linie
1	Ktrl.-Haut	wt		FVB/N		15	F39	-	1936	FVB/N	L5
2	M19	-	1928	FVB/N	L3	16	M32	+	1936	FVB/N	L5
3	M17	+	1928	FVB/N	L3	17	M34	+	1936	FVB/N	L5
<b>4</b>	M21	+	1928	FVB/N	L3	18	F36	+	1936	FVB/N	L5
5	F23	+	1928	FVB/N	L3	19	F37	+	1936	FVB/N	L5
6	F24	+	1928	FVB/N	L3	20	F38	+	1936	FVB/N	L5
7	M53	-	1941	FVB/N	L7	21	F67	-	1931	FVB/N	L8
8	M49	+	1941	FVB/N	L7	<b>22</b>	M61	+	1931	FVB/N	L8
9	M50	+	1941	FVB/N	L7	23	F66	+	1931	FVB/N	L8
10	M51	+	1941	FVB/N	L7	24	M76	-	1949	FVB/N	L10
11	M52	+	1941	FVB/N	L7	25	M77	+	1949	FVB/N	L10
12	M54	+	1941	FVB/N	L7	26	F82	+	1949	FVB/N	L10
13	F56	+	1941	FVB/N	L7	27	F57	+	1941	FVB/N	L7
14	Positivkontrolle HEKmSOCS3					28	Positivkontrolle HEKmSOCS3				
Spur	Probe	Genotyp	Founder	Hintergrund	Linie	Spur	Probe	Genotyp	Founder	Hintergrund	Linie
29	Ktrl.-Haut	wt		C57BL6		43	M92	+	1965	C57BL6	L12
30	M85	+	1959	C57BL6	L11	44	M95	+	1965	C57BL6	L12
31	M86	+	1959	C57BL6	L11	45	M96	+	1965	C57BL6	L12
32	F88	+	1959	C57BL6	L11	46	M97	+	1965	C57BL6	L12
33	F89	+	1959	C57BL6	L11	47	F100	+	1965	C57BL6	L12
34	F90	+	1959	C57BL6	L11	<b>48</b>	F101	+	1965	C57BL6	L12
35	F149	+	1959	C57BL6	L11	49	F102	+	1965	C57BL6	L12
36	M106	-	1969	C57BL6	L13a	50	F104	+	1965	C57BL6	L12
<b>37</b>	M108	+	1969	C57BL6	L13a	51	F172	+	1969	C57BL6	L13a
38	F112	+	1969	C57BL6	L13a	52	F118	-	1972	C57BL6	L14
39	F113	+	1969	C57BL6	L13a	53	F123	+	1972	C57BL6	L14
40	F114	+	1969	C57BL6	L13a	54	Positivkontrolle HEKmSOCS3				
41	F115	+	1969	C57BL6	L13a						
42	Positivkontrolle HEKmSOCS3										

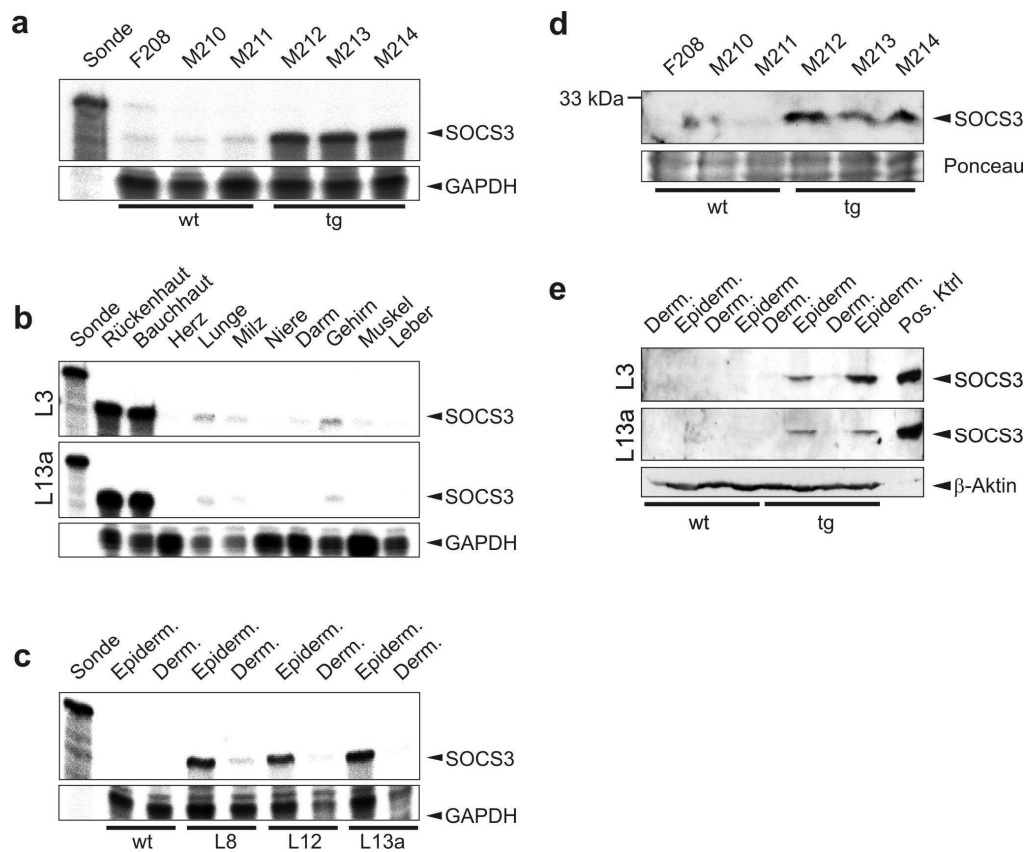
**Abb. III.6: SOCS3-Proteinexpression in Tieren der F1-Generation**

Dargestellt sind Immunoblots aus Rückenhautbiopsien (3mm Durchmesser) der Würfe, aus denen die in der Arbeit verwendeten Mauslinien hervorgingen. Der Nachweis von SOCS3 erfolgte mittels Antikörper aus 40µg Gesamteinlysate, das in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt wurde. Proben aus negativ-transgenen Geschwistertieren und unabhängiger WT-Kontrollhaut (Ktrl.-Haut) zuchtfremder C57BL/6-Mäuse dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurden 2,5µl Proteinlysate aus HEK-Zellen geladen, die zuvor mit muriner SOCS3-cDNA transfiziert wurden (HEKmSOCS3). Proben aus Tieren, die zum Aufbau der verwendeten Linien genutzt wurden, sind markiert (Nr.4, 22, 37, 48). wt: Wildtyp-Tier, „+“: Transgen-positiv, „-“: Transgen-negativ

### 2.3.2 Organspezifität der Transgenexpression

Das Konzept des transgenen Mausmodells basierte auf einer gerichteten Expression des Transgens ausschließlich in der Epidermis. Zur Verifizierung dieser organspezifischen Expressionsstrategie wurden zunächst Tiere aus der F2-Generation mehrerer Linien getötet und verschiedene Organe entnommen, die zur Extraktion von RNA- und Proteinlysate separat aufgearbeitet wurden. Unter Verwendung spezifischer <sup>32</sup>P-markierter antisense-RNA Sonden und Antikörper gegen SOCS3 konnten auch in der zweiten Folgegeneration hohe Expressionsspiegel des Transgens in Bauch- und Rückenhaut Transgen-positiver Tiere sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene detektiert werden (Abb. III.7 a/d). Die Haut Transgen-negativer Geschwistertiere wies dagegen im Vergleich nur marginale Spiegel an SOCS3 auf. Analoges galt für die Organe Herz, Niere, Dünndarm, Skelettmuskulatur und Leber, in denen keine oder nur geringe Mengen SOCS3-mRNA aufzeigbar waren (Abb. III.7 b). Die Existenz leicht erhöhter mRNA-Spiegel in Milz und Lunge ist aus der Literatur bekannt und unabhängig von der Transgenität des untersuchten Mausmodells [Starr *et al.* 1997].

Dass die hohen SOCS3-Spiegel in der Haut nahezu ausschließlich auf eine Expression im epidermalen Kompartiment zurückzuführen waren, konnte bestätigt werden, nachdem aus Schwanzhautbiopsien die Epidermis von der Dermis abgetrennt, separat aufgearbeitet und analysiert wurde (Abb. III.7 c/e). SOCS3-Signale in dermalen Proben resultieren aus einer nur unvollständig möglichen präparativen Trennung von Epidermis und Dermis.



**Abb. III.7: Organspezifität der Transgenexpression**

Tiere aus der F2-Generation der Linien 8 (L8), 12 (L12) und 13a (L13a) wurden im Alter von 12 Wochen getötet. Verschiedene Organe wurden isoliert, aus Schwanzhautbiopsien wurde die Epidermis von der Dermis separiert. Für den Nachweis von SOCS3-mRNA (a-c) wurden jeweils 20µg Gesamt-RNA in einer RNase-Verdauerschutzanalyse eingesetzt. Als Größenmarker diente jeweils 1kcpm der <sup>32</sup>P-markierten Sonde (Sonde), zur Ladekontrolle wurde eine GAPDH-Sonde mitgeführt. (a) Rückenhautlysate von drei Transgen-negativen Tieren der Linie 13a (F208-M211) wurden gegen die Lysate dreier Transgen-positiver Geschwistertiere (M212-M214) aufgetragen. (b) Lysate verschiedener Organe von einem Tier der Linien 3 und einem Vertreter der Linie 13a. (c) Lysate aus Epidermis und Dermis. Jede Spur repräsentiert dabei die gepoolte Epidermis bzw. Dermis aus dem Schwanz von je vier adulten nicht-transgenen Tieren vom Stamm C57BL/6 (wt) und je vier transgenen Geschwistertieren der Linien 8, 12 und 13a (n=4). (d+e) Zur Analyse von SOCS3-Protein wurden jeweils 125µg Gesamtproteinlysate in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. Als Positivkontrolle (Pos. Ktrl.) dienten 2,5µl HEK-Lysat. Eine Ladekontrolle erfolgte über β-Aktin bzw. Ponceau S-Färbung. (d) Rückenhautlysate von drei nicht-transgenen (F208-M211) und drei transgenen Geschwistertieren (M212-M214) (Linie13a). (e) Epidermis und Dermis aus je zwei nicht-transgenen (wt) und transgenen (tg) Geschwistertieren der Linien 3 und 13a.

### 2.3.3 Immunhistochemische Lokalisierung der Transgenexpression

Zur weiteren Überprüfung der zellspezifischen Expression des Transgens und zur Charakterisierung der Hautmorphologie wurden Gewebeschnitte aus neonataler Rückenhaut und adulter Schwanzhaut angefertigt. Die Rückenhaut von Neugeborenen und die Schwanzhaut ausgewachsener Tiere sind vielschichtig und eigneten sich daher beson-

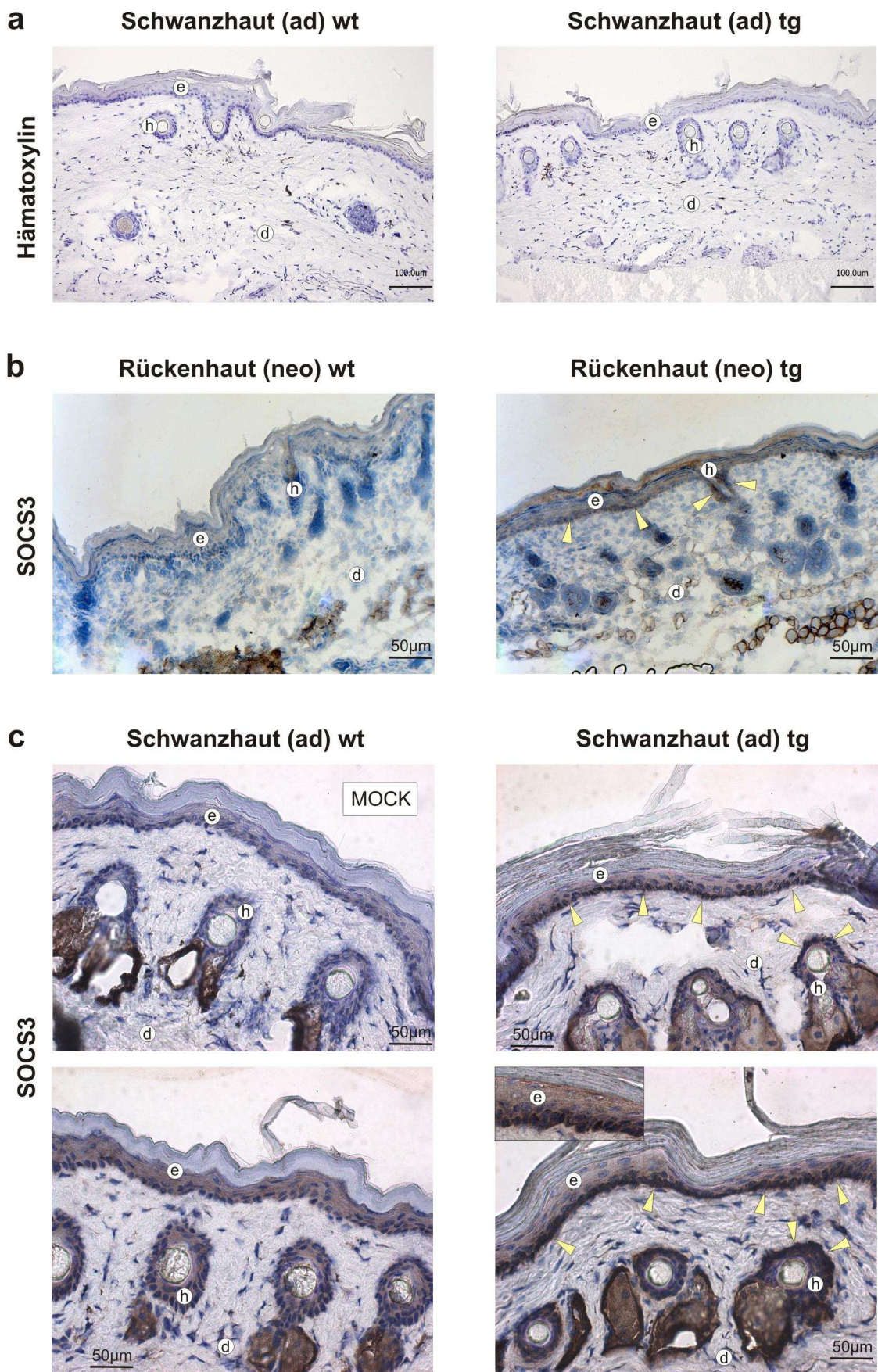
ders zur Darstellung der Basalschicht in Abgrenzung von distalen Zelllagen [Hill *et al.* 1981; Mack *et al.* 2005].

Nach eingehender histologischer Bewertung der Morphologie adulter Schwanzhaut (Hämatoxylinfärbung) konnten keine atypischen Veränderungen in der Epidermis und in Haarfollikeln transgener Tiere festgestellt werden. Die zellulären Strukturen des *Stratum basale*, *Stratum spinosum* und *Stratum corneum* waren unauffällig und glichen denen nicht-transgener Geschwistertiere. Auch die Anzahl und Verteilung der Haarfollikel waren in transgenen und nicht-transgenen Tieren vergleichbar (Abb. III.8 a).

Nach immunhistochemischer Färbung mit einem SOCS3-spezifischen Antikörper konnte die zellspezifische Expression bestätigt werden. SOCS3-positive Zellen waren eindeutig im basalen Kompartiment der interfollikulären Epidermis sowie in der distalen äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel lokalisiert (Abb. III.8 b/c). Die Transgenexpression erfolgte somit entsprechend der erwarteten Aktivität des Keratin 5-Promotors.

**Abb. III.8: Hautmorphologische Untersuchung und Lokalisierung SOCS3-exprimierender Zellen**

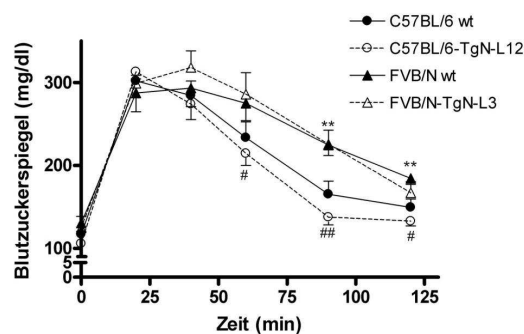
Aus der Schwanzhaut adulter Tiere (ad) und der Rückenhaut neugeborener Tiere (neo) wurden Gefrierschnitte angefertigt (8µm). Dargestellt ist eine Auswahl repräsentativer Präparate transgener Tiere (tg) und nicht-transgener Geschwistertiere (wt). (a) Hämatoxylinfärbung. (b+c) Immunhistochemische Färbung von SOCS3-Protein (Pfeile, braune Färbung) und Kontrollfärbung ohne SOCS3-spezifischem Erstantikörper (MOCK), Zellkerne wurden mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. e: Epidermis; h: Haarfollikel; d: Dermis



### 2.3.4 Glukosetoleranztest

Als größtes Organ des Körpers ist die Haut nicht zuletzt durch ihre konstant hohe proliferative Aktivität erheblich am Gesamtmetabolismus des Organismus beteiligt. Es ist bekannt, dass SOCS3 mit Komponenten des Insulinsignalweges interferiert und als potenter Mediator einer Insulinresistenz diskutiert wird [Emanuelli *et al.* 2000 und 2001; Rui *et al.* 2002; Ueki *et al.* 2004; Shi *et al.* 2004; Torisu *et al.* 2007]. Zur Charakterisierung des Phänotyps des generierten SOCS3-überexprimierenden Mausmodells war es daher von Bedeutung, mögliche Auswirkungen der Transgenexpression auf die Glukose-Homöostase in einem Glukosetoleranztest zu untersuchen.

Für diesen Test wurden transgene Tiere der Linien 3 und 12 und nicht-transgene Geschwistertiere im Alter von 12 Wochen initial über 12h gehungert, um nach Ermittlung des basalen Blutzuckerspiegels 1,5mg Glukose pro Gramm Körpergewicht i.p. zu applizieren. In direktem Anschluss wurde der Blutzuckerspiegel unter Verwendung eines handelsüblichen Blutzuckermessgerätes zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt (Abb. III.9). Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb desselben genetischen Hintergrundes keine signifikanten Unterschiede in der Regulation des Blutzuckerspiegels zwischen nicht-transgenen und transgenen Tieren existieren, womit ein systemischer Einfluss des Transgens auf die Glukose-Homöostase für das untersuchte Alter ausgeschlossen werden kann. Auffällig war, dass der Spiegel in Tieren mit C57BL/6-Hintergrund im Vergleich zu FVB/N-Tieren sein Maximum früher erreichte und schneller in Richtung Basalniveau zurückfiel.



**Abb. III.9: Glukosetoleranztest**

Nicht-transgene Tiere der Linien 3 (FVB/N wt; n=8) und 12 (C57BL/6 wt; n=7) und transgene Geschwistertiere der Linie 3 (FVB/N-TgN-L3; n=3) und 12 (C57BL/6-TgN-L12; n=5) wurden über 12h gehungert. Nach Ermittlung des basalen Blutzuckerspiegels über Punktion der lateralen Schwanzvene sind jedem Tier 500µl einer sterilen Glukoselösung i.p. appliziert worden (1,5mg/g Körpergewicht). Zu definierten Zeitpunkten (20, 40, 60, 90 und 120min nach Applikation) ist der Blutzuckerspiegel erneut bestimmt worden. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$  C57BL/6wt gegen FVB/N wt; #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$  C57BL/6-TgN-L12 gegen FVB/N-TgN-L3 (ungepaarter t-Test).

### 3 Primäre Keratinozyten

Bisher konnte gezeigt werden, dass das Konzept der gerichteten organspezifischen Expression des Transgens in dem generierten Mausmodell erfolgreich umgesetzt werden konnte. Hohe SOCS3-Expressionsspiegel konnten detektiert und den Zellen des epidermalen Kompartiments zugeordnet werden. Zur Klärung der Frage nach einer tatsächlich existenten Funktionalität des transgenen Proteins und einer detaillierten Charakterisierung der exprimierenden Zellen wurde ein Verfahren etabliert, mit dessen Hilfe primäre Keratinozyten aus Neugeborenen isoliert und kultiviert wurden.

#### 3.1 Keratinozyten aus transgenen Tieren zeigen eine hohe SOCS3-Expression und eine vollständige Blockierung der IL-6 vermittelten STAT3 Phosphorylierung

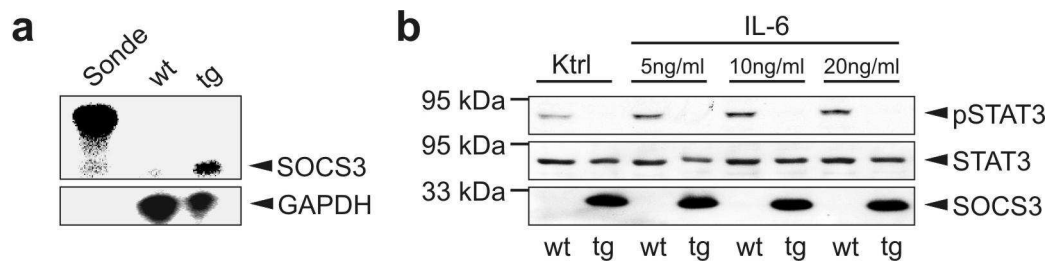
Das SOCS3-Protein gehört zu einer Familie intrazellulärer regulatorischer Proteine des Zytokinsignalwegs, die in einer klassischen negativen Rückkopplungsschleife Komponenten des *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT)-Signalwegs inhibieren und somit in der Lage sind, die Zytokin-vermittelte Signaltransduktion unter physiologischer Zielsetzung eng zu kontrollieren (vgl. Kap. I.4.1).

Die Transkription Interleukin (IL)-6-regulierter Gene wird über den Transkriptionsfaktor STAT3 vermittelt, der über Phosphorylierung am Tyrosinrest 705 aktiviert und als Dimer in den Zellkern transloziert wird [Zhong *et al.* 1994; Akira 1997]. Gleichzeitig kommt es nach IL-6-Stimulation zu einer deutlichen Induktion der SOCS3 Expression in Keratinozyten, gefolgt von einer regulatorischen, SOCS3-vermittelten Inhibition der STAT3-Aktivierung im Sinne einer negativen Rückkopplung [Yamasaki *et al.* 2003; Goren *et al.* 2006a]. Die IL-6-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 war somit ein ideales Instrument zur Verifizierung der biologischen Funktionalität des Transgenproduktes.

Primäre Keratinozyten wurden aus nicht-transgenen und transgenen Geschwistertieren isoliert und kultiviert. Unter Verwendung einer <sup>32</sup>P-markierten *anti-sense*-mRNA-Sonde und eines spezifischen Antikörpers konnten ausschließlich in transgenen Zellen sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene massiv erhöhte Expressionsspiegel an SOCS3 detektiert werden (Abb. III.10 a/b). Wie erwartet kam es in WT-Keratinozyten nach Stimulation mit IL-6 zu einer dosisabhängigen Induktion der STAT3-Phosphory-



lierung. Im Gegensatz dazu konnte in SOCS3-überexprimierenden transgenen Zellen auch mit der höchsten Stimulationskonzentration keine detektierbare Phosphorylierung von STAT3 induziert werden. Selbst in ruhenden transgenen Kontrollzellen konnte kein aktiviertes STAT3 detektiert werden, was eindrucksvoll zeigt, dass das in transgenen Keratinozyten überexprimierte SOCS3-Protein funktionell ist.



**Abb. III.10: Expression von SOCS3 in primären Keratinozyten und vollständige Blockade der IL-6-vermittelten STAT-3-Aktivierung**

Primäre Keratinozyten wurden aus 4 nicht-transgenen (wt) und 5 transgenen (tg) neugeborenen Mäusen eines Wurfes im Alter von 1-3 Tagen isoliert und kultiviert. (a) Aus kultivierten Keratinozyten wurde RNA isoliert und 7µg mRNA in einer RNase-Verdauerschutzanalyse mit einer spezifischen <sup>32</sup>P-markierten Sonde hybridisiert. 1kcpm der Sonde fungierte als Größenmarker. Hybridisierung mit einer GAPDH-Sonde diente als Ladekontrolle. (b) Primäre Keratinozyten wurden über Nacht gehungert und für 20min mit murinem rekombinantem IL-6 in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. 50µg Gesamtprotein wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Im Immunoblot erfolgte der Nachweis von STAT3, pSTAT3(Y705) und SOCS3. Nicht-stimulierte, ruhende Zellen dienten als Kontrolle (Ktrl; Zeitpunkt 0).

### 3.2 *In vitro*-Wundheilung: Hohe SOCS3-Expression ist assoziiert mit verminderter Keratinozytenproliferation und gestörter Zellmigration

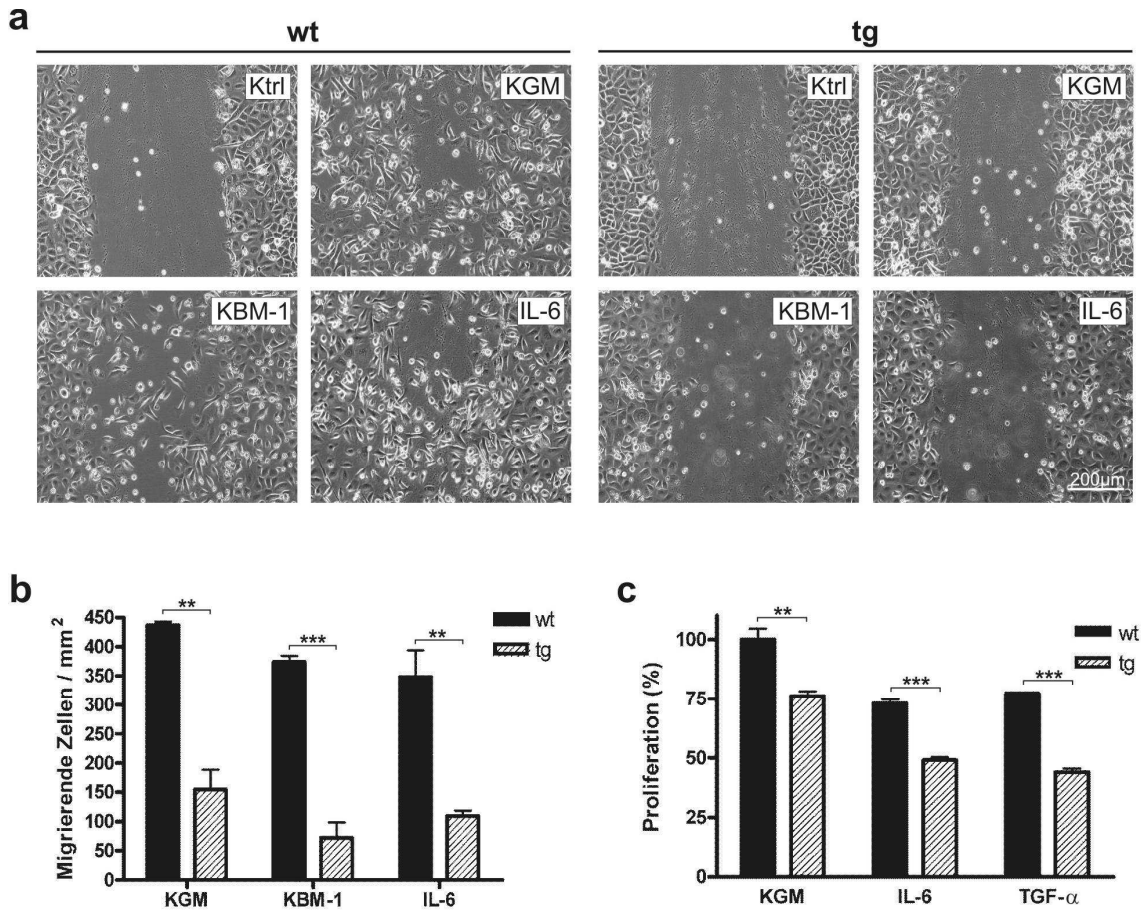
Die Wiederherstellung der funktionellen Integrität der Haut nach einer Verletzung ist zur Aufrechterhaltung der Schutzfunktion von essentieller Bedeutung. Um dies zu gewährleisten, setzt nach dem provisorischen Wundverschluss durch einen Fibrinthrombus um einige Stunden versetzt die Reepithelialisierungsphase ein. Dabei sind die Qualität der Neoepidermis und die Zeit, die für einen vollständigen Wundschluss benötigt wird, maßgeblich von den Prozessen Keratinozytenmigration und -proliferation abhängig [Bennett und Schultz 1993; Martin 1997; Santoro und Gaudino 2005]. Eine Vielzahl von Studien diskutieren STAT3 und SOCS3 als potentielle Mediatoren in der Regulation von Proliferation und Migration [Denson *et al.* 2003; Tokumaru *et al.* 2005a/b; Sano *et al.* 1999 und 2005; Quadros *et al.* 2004; Horiuchi *et al.* 2005; Goren *et al.* 2006a; Nagai *et al.* 2007]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die diabetisch-gestörte Wundheilung in Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäusen durch atrophische Neoepithelien

charakterisiert ist, die bis in die Spätphase des Heilungsprozesses erhebliche Mengen an SOCS3 exprimieren (vgl. Kap. 1.3) [Frank *et al.* 2000; Goren *et al.* 2006a]. Zur Aufklärung einer möglichen Verbindung wurden daher *in vitro*-Analysen durchgeführt, die die Charakterisierung der Migrations- und Proliferationsaktivität SOCS3-überexprimierender Zellen zum Ziel hatten.

Zur Beurteilung der Migrationskapazität wurde ein *Scratch-Assay* durchgeführt, bei dem die Zahl der in einen zellfreien Spalt migrierenden Keratinozyten bestimmt wird, nachdem der proliferative Einfluss durch Vorinkubation der Zellen mit Mitomycin C ausgeschlossen wurde. Es wurden 3 Versuchsbedingungen definiert: Inkubation in Vollmedium (KGM), Inkubation in Supplement-reduziertem Minimalmedium (KBM-1) und Inkubation in KBM-1 unter Zusatz des Zytokins IL-6, für das ein induzierender Einfluss auf die Keratinozytenmigration gezeigt werden konnte [Nishida *et al.* 1992]. Alle Bedingungen führten einheitlich zu einem deutlichen sichtbaren Ergebnis (Abb. III.11 a/b). Entsprechend der Versuchsbedingung konnten im Durchschnitt zwischen 348 und 436 migrierende WT-Keratinozyten / mm<sup>2</sup> mit typischer Morphologie detektiert werden, wobei ein induktiver Effekt durch Stimulation mit IL-6 nicht bestätigt werden konnte. Im Gegensatz dazu war die Migration SOCS3-überexprimierender Zellen massiv beeinträchtigt. Es konnten selbst unter Kultur in KGM im Durchschnitt nur maximal 155 migrierende Zellen / mm<sup>2</sup> gezählt werden. Unter Inkubation in KBM-1 konnten dagegen nur durchschnittlich 72 migrierende transgene Zellen / mm<sup>2</sup> ermittelt werden, deren Anzahl durch Zusatz von IL-6 nur marginal auf durchschnittlich 110 Zellen / mm<sup>2</sup> gesteigert werden konnte. Ein erweiterter inhibitorischer Einfluss des SOCS3-Proteins auf Signalkaskaden, die zur Induktion von Zellmigration führen, ist somit wahrscheinlich.

Zur Ermittlung der proliferativen Aktivität der isolierten primären Keratinozyten wurden Proliferationsassays durchgeführt, bei denen die Inkorporation <sup>3</sup>H-markierten Thymidins in die DNA als Maß für die Teilungsaktivität der Zellen gemessen wurde. Es wurden 3 verschiedene Versuchsbedingungen definiert, die neben einer Inkubation in Vollmedium die Inkubation in Supplement-freiem Medium (KBM-2) unter Zusatz von IL-6 und TGF- $\alpha$  einschlossen. Die mitogene Potenz beider Stimuli ist beschrieben [Greenhalgh 1996; Sato, M. *et al.* 1999; Kim *et al.* 2001]. Unter allen Bedingungen konnte eine induzierte Zellproliferation detektiert werden (Abb. III.11 c). Interessanterweise zeigten in Vollmedium kultivierte Keratinozyten die höchsten Wachstumsraten.

Messungen aus Zellen, die in KBM-2 kultiviert wurden, wiesen im Vergleich dazu - unbeeinflusst von den zugesetzten Stimuli - geringere Wachstumsraten auf, was sehr wahrscheinlich auf das Fehlen essentieller Zusätze im Supplement-freien Medium zurückzuführen ist.



**Abb. III.11: Keratinozytenmigration und -proliferation**

Primäre Keratinozyten wurden aus nicht-transgenen (wt) und transgenen (tg) neugeborenen Mäusen im Alter von 1-3 Tagen isoliert. (a)  $4 \times 10^6$  Zellen wurden in 6-well Platten ausgelegt und ab Erreichen einer 80%igen Konfluenz für 24h in KBM-1 gehungert. Nach 2-stündiger Vorinkubation mit Mitomycin C (10 $\mu$ g/ml) wurden unter Verwendung einer sterilen Pipettenspitze „in vitro-Wunden“ gesetzt und die Zellen unter den indizierten Bedingungen für 24h kultiviert (Ktrl: Ausgangssituation 30min nach Ziehen des zellfreien Spaltes; KGM: Vollmedium; KBM-1: Supplement-reduziertes Medium; IL-6: 10ng/ml in KBM-1). Aufgeführt sind repräsentative Fotos aus 4 unabhängigen Versuchen. (b) Die Anzahl in den Spalt migrierender Zellen aus drei unabhängigen Versuchen wurde quantifiziert und auf die Fläche von 1mm<sup>2</sup> extrapoliert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3). Abk. siehe (a). \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 (ungepaarter t-Test). (c)  $4 \times 10^7$  Zellen wurden in 24-well Platten ausgelegt, bis zum Erreichen einer 40-60%igen Konfluenz kultiviert und gehungert (KBM-2, 24h). Nach Zusatz <sup>3</sup>H-markierten Thymidins (0,5 $\mu$ Ci/500 $\mu$ l/well) wurden die Zellen wie indiziert für 24h kultiviert (KGM: Vollmedium; IL-6: 10ng/ml in Supplement-freiem Medium (KBM-2); TGF- $\alpha$ : 30ng/ml in KBM-2). Eine Proliferation von 100% entspricht der emittierten Strahlungsenergie aus in KGM kultivierten WT-Keratinozyten. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM unabhängiger Versuche (n=4). \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 (ungepaarter t-Test).

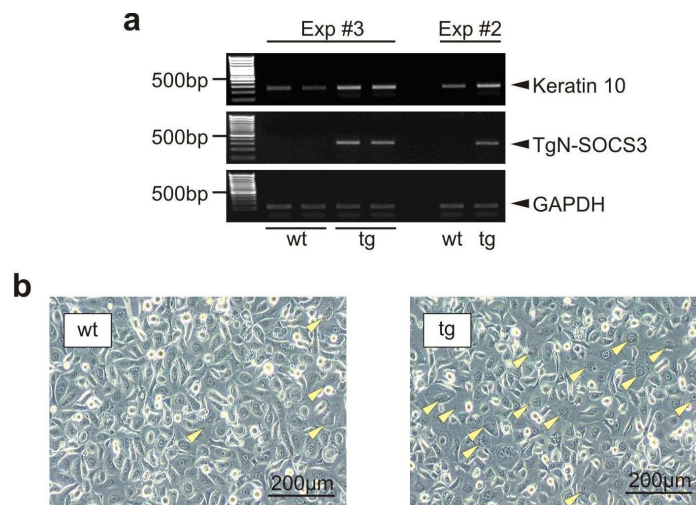
Insgesamt jedoch konnte unter allen Versuchsbedingungen eine drastische Reduktion der Proliferation SOCS3-überexprimierender Keratinozyten im Vergleich zu WT-Keratinozyten um bis zu 43% beobachtet werden, was in Übereinstimmung zu den Daten aus HaCaT-Zelllinien einen deutlich proliferationshemmenden Einfluss von konstitutiv überexprimiertem SOCS3 bestätigt [vgl. Goren *et al.* 2006a].

### **3.3 Hinweise auf eine funktionelle Verbindung zwischen SOCS3 und verfrühter Keratinozytendifferenzierung**

Die Epidermis ist aus mehreren Schichten aufgebaut, deren zelluläre Basis Keratinozyten darstellen. Um dem Anspruch einer Barriere- und Schutzfunktion gerecht zu werden, sind die einzelnen Schichten durch strukturelle und funktionelle Besonderheiten charakterisiert. Diese sind eng an den Prozess der terminalen Ausdifferenzierung der Keratinozyten geknüpft, der sich neben dem Verlust an mitotischer Aktivität durch ein differenzielles Expressionsmuster intrazellulärer Strukturproteine auszeichnet, die als Differenzierungsmarker bezeichnet werden [Sun *et al.* 1983; Fuchs 1990; Fuchs und Raghavan 2002; Mack *et al.* 2005]. Als innerste Schicht besitzt ausschließlich die aus basalen Keratinozyten aufgebaute Lage epidermalen Stammzellcharakter und fungiert gemeinsam mit *transient amplifying cells* als Reservoir für den kontinuierlichen Regenerierungsprozess der Epidermis. Keratinozyten des *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* verlieren die Fähigkeit zur Zellteilung und beginnen mit der zunehmenden Expression von Differenzierungsmarkern wie Keratin 1 und 10, Loricrin und Involucrin. Das äußere *Stratum corneum* besteht letztlich aus toten und verhornten Zellfragmenten.

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen verfrühter, SOCS3-vermittelter Ausdifferenzierung von Keratinozyten in negativer Korrelation zur Proliferationsaktivität konnte bereits postuliert werden [Goren *et al.* 2006a]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine konstitutive SOCS3-Expression in primären murinen Keratinozyten zu einer drastischen Reduktion der Proliferation führt (vgl. Kap. 3.2). Begründet durch limitierte Mengen an aus Primärzellen isolierter RNA und nur wenig brauchbarer auf dem Markt verfügbarer Antikörper wurde auf die semi-quantitative RT-PCR-Technik zurückgegriffen, um die Expression des Differenzierungsmarkers Keratin 10 in kultivierten primären Keratinozyten zu analysieren (Abb. III.12). Dabei konnten in zwei unabhängig vonein-

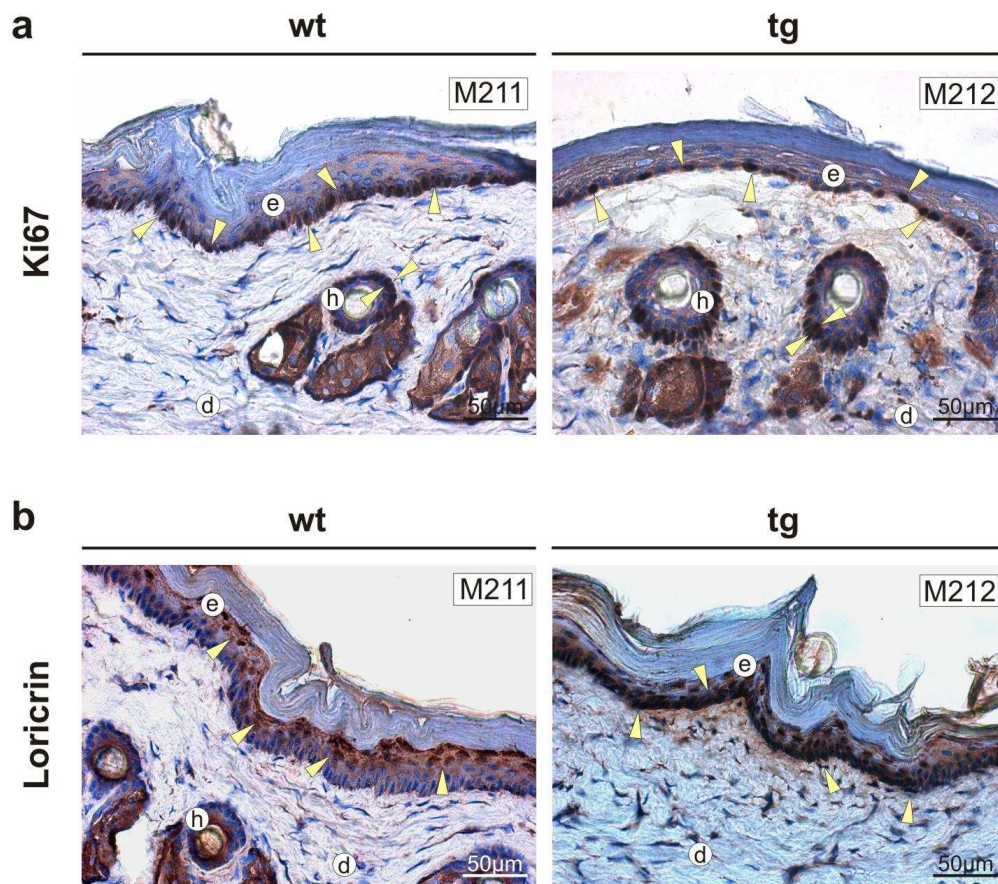
ander isolierten Chargen an transgenen Keratinozyten erhöhte Mengen an Keratin 10-mRNA im Vergleich zu WT-Zellpopulationen aus nicht-transgenen Geschwistertieren detektiert werden. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch den Vergleich des morphologischen Erscheinungsbildes kultivierter Primärkeratinozyten. Werden diese ab Erreichen eines konfluenten Zellrasens weiter kultiviert, weisen wesentlich mehr transgene als nicht-transgene Zellen morphologische Veränderungen auf, die für ausdifferenzierende Keratinozyten charakteristisch sind (Abb. III.12 b).



**Abb. III.12: Semiquantitative RT-PCR gegen Keratin 10 und Vergleich der Zellmorphologie**

(a) Dargestellt sind Ergebnisse aus 2 unabhängig voneinander isolierten Chargen primärer Keratinozyten (Exp#2: Linie 13a; Exp#3: Linie 3). Primäre Keratinozyten wurden aus nicht-transgenen (wt) und transgenen (tg) neugeborenen Mäusen im Alter von 1-3 Tagen isoliert und ab Erreichen einer 80%igen Konfluenz für weitere 48h in KGM kultiviert. Gesamt-RNA wurde isoliert, jeweils 0,5µg wurden revers transkribiert und Teilsequenzen der cDNA von Keratin 10 (30 Zyklen) und des transgenen Konstruktes (TgN-SOCS3; 25 Zyklen) in einer PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide amplifiziert. GAPDH-cDNA diente als Kontrolle (23 Zyklen). Als Größenmarker diente ein 100bp-Marker. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 1,5%igen Agarosegelen. (b) Primäre Keratinozyten wurden 48h nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz fotografiert. Pfeile zeigen morphologisch auffällige Zellen.

Zusätzlich dazu sind immunhistochemische Färbungen gegen Ki67, ein in teilungsaktiven Zellen exprimiertes Antigen [Gerdes *et al.* 1983 und 1984] und gegen den Differenzierungsmarker Loricrin in Schwanzhautpräparaten adulter Tiere angefertigt worden. Obwohl in basalen Keratinozyten sowohl transgener als auch nicht-transgener Tiere eine deutliche Ki67-Färbung erkennbar war (Abb. III.13 a), gab es in der Haut transgener Tiere Bereiche, in der basale Keratinozyten eine starke immunpositive Färbung für Loricrin aufwiesen, welches normalerweise im *Stratum corneum* exprimiert ist (Abb. III.13 b). Da sich diese Beobachtung jedoch nur auf Teilbereiche der Epidermis erstreckte, lässt sich keine eindeutige Aussage ableiten.



**Abb. III.13: Immunohistochemische Färbung gegen Ki67 und Loricrin**

Aus der Schwanzhaut adulter transgener Tiere (tg; M212) und nicht-transgener Geschwistertiere (wt; M211) der Linie 13a im Alter von 12 Wochen wurden Gefrierschnitte angefertigt (8µm). (a) Ki67-positive Zellen sind in der Basalschicht der Epidermis und in Zellen der distalen äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel lokalisiert (Braunfärbung; Pfeile). (b) Immunohistochemische Färbung gegen Loricrin. Teilbereiche der transgenen Epidermis zeigen im Gegensatz zum nicht-transgenen Beispiel eine deutliche Färbung der Basalschicht (Pfeile, Braunfärbung). Zellkerne wurde mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. e: Epidermis; h: Haarfollikel; d: Dermis

Dennoch kann zusammengefasst werden, dass Erkenntnisse aus Versuchen mit SOCS3-überexprimierenden HaCaT Keratinozyten [Goren *et al.* 2006a] in transgenen primären Keratinozyten gestützt werden konnten. Die Theorie einer funktionellen, pathophysiologischen Verknüpfung zwischen erhöhter SOCS3-Expression und Verzögerungen im Heilungsverlauf von Wunden diabetischer *ob/ob*-Mäuse, begründet durch gestörte Keratinozytenmigration und -proliferation, bleibt somit weiterhin bestehen.

## 4 Wundheilungsstudien

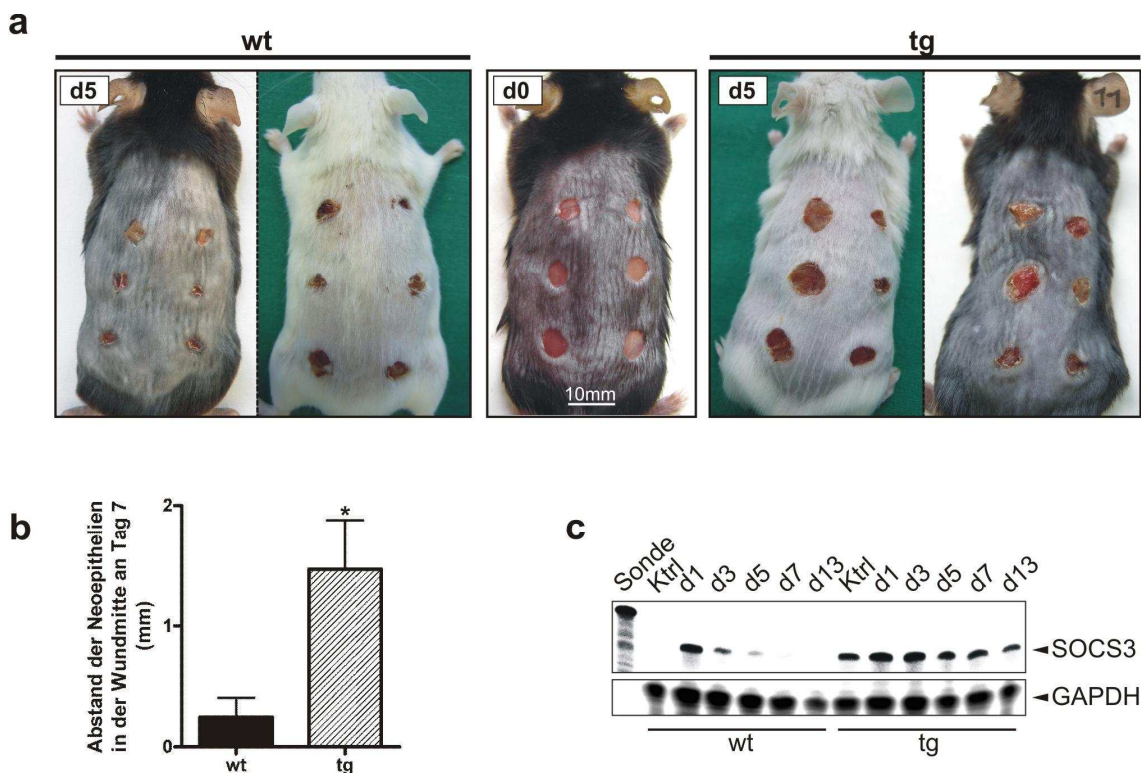
Nach Erhebung der *in vitro*-Daten war es von großem Interesse, die Wundheilungssituation im transgenen Mausmodell zu charakterisieren - besonders in Assoziation zu den Erkenntnissen aus heilungsdefizienten, diabetischen *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen.

Als Modell dienten hemizygot-transgene SOCS3-überexprimierende Tiere und nicht-transgene Geschwistertiere der Linien 3, 8, 12 und 13a der Generationen F2 und F3 sowie WT-Tiere des Stammes C57BL/6. In Analogie zu dem in Kapitel 1.1 beschriebenen Versuchsdesign wurde das Alter der Versuchstiere auf 12 Wochen  $\pm$  5 Tage festgelegt. Ebenso sind zur Charakterisierung der Wundheilung in den Rücken der Tiere 6 Vollhaut-Exzisionswunden gesetzt und nach identischem Schema an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 13 nach Verwundung entnommen worden. Hautbiopsien in vergleichbarer Größe aus der Rückenhaut unverletzter Tiere dienten erneut als Kontrolle. Die entnommenen Gewebeproben wurden nach definiertem Schema zur Isolation von RNA ( $n = 3$  Wunden/Tier) und Protein ( $n = 2$  Wunden/Tier) gepoolt. Aus der 6. Wunde wurden histologische Präparate (Gefrierschnitte) angefertigt. Um die Beobachtungen statistisch auswerten zu können, wurden aus den Linien 13a (C57BL/6) und 3 (FVB/N) je 2 vollständige transgene Serien (Kontrollhaut bis Tag 13) generiert, aus den Linien 8 (FVB/N) und 12 (C57BL/6) jeweils eine transgene Serie. Die Daten aus diesen Serien wurden mit jeweils 2 Serien (C57BL/6 und FVB/N) nicht-transgener Geschwistertiere sowie einer C57BL/6-WT-Serie verglichen.

### 4.1 Wunden transgener Tiere heilen mit deutlicher Verzögerung

Wie bereits beschrieben, beschränkt sich die genetische Veränderung im generierten Mausmodell expressionsbezogen ausschließlich auf das basale Kompartiment der Epidermis. Umso erstaunlicher war es, dass bereits fünf Tage nach Verletzung in transgenen Tieren massive Unterschiede im Heilungsfortschritt im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren sichtbar waren (Abb. III.14 a). Interessanterweise konnten zwischen den verschiedenen Linien 3, 8, 12 und 13a keine ausgeprägten Unterschiede festgestellt werden. Die Wundoberfläche aller transgenen Tiere war stark gerötet und der Wunddurchmesser deutlich größer als der nicht-transgener Geschwistertiere. Auffällig war zudem ein nahezu transparentes Erscheinungsbild des Wundzentrums nach Entnahme des

Wundgewebes, was auf ein unterentwickeltes Granulationsgewebe hindeutet. Selbst sieben Tage nach Verwundung, als die Wunden nicht-transgener Tiere nahezu vollständig reepithelialisiert waren, betrug der Abstand der Neoeithelzungen transgener Wunden mit durchschnittlich 1,47mm noch immer fast 30% des ursprünglich gesetzten Wunddurchmessers (Abb. III.14 b). Dennoch kam es auch in transgenen Tieren, wenn auch mit deutlicher Verzögerung, bis zum Erreichen des 13. Tages nach Verletzung zur vollständigen Abheilung der Wunden. Eine Chronifizierung der Wundheilungsstörung über diesen Zeitpunkt hinaus konnte nicht beobachtet werden.



**Abb. III.14: Verzögerte Wundheilung in transgenen Tieren**

In den Rücken nicht-transgener (wt) und transgener (tg) Tiere wurden 6 Exzisionswunden gesetzt. (a) Unmittelbar (d0) und am 5. Tag (d5) nach Verwundung wurde der Rücken repräsentativer Tiere der Linien 3 und 13a fotografiert. (b) Aus histologischen Präparaten von Tag 7-Wunden verschiedener Tiere (mediane Schnittebene) wurde der Abstand der Neoeithelien ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 5 Wunden (n=5). \* p<0,05 (ungepaarter t-Test). (c) Über RNase-Verdauungsanalyse wurde aus 10µg Gesamt-RNA die Expression von SOCS3-mRNA in je einer transgenen (tg) und nicht-transgenen (wt) Serie von Tieren der Linie 13a untersucht (jeder Zeitpunkt entspricht n=3 Wunden). Als Größenmarker diente 1kcpm der Sonde, zur Ladekontrolle wurde GAPDH hybridisiert. Ktrl: unverletzte Haut; d1-d13: Tage 1-13 nach Verletzung.

Unter Verwendung einer <sup>32</sup>P-markierten Sonde wurde die SOCS3-mRNA Expression über den Heilungsverlauf analysiert (Abb. III.14 c). In Analogie zu bereits publizierten Daten [Goren *et al.* 2006a] konnte in nicht-transgenen Geschwistertieren bereits am

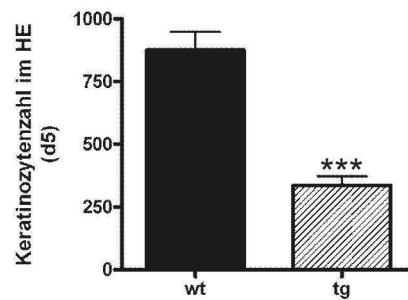


ersten Heilungstag eine starke Induktion im Wundgewebe detektiert werden, die in den Folgetagen deutlich abfiel. Dagegen war, wie erwartet, das Wundgewebe im transgenen Tier durch kontinuierlich hohe SOCS3-mRNA-Spiegel gekennzeichnet, die an den Tagen 1 und 3 nach Verwundung dennoch sichtbar additiv induziert waren.

#### **4.1.1 Die hyperproliferierenden Epithelien in Wunden transgener Tiere sind deutlich reduziert**

Zur weiterführenden Beurteilung der massiven Heilungsverzögerung, die in transgenen Tieren beobachtet werden konnte, wurden zunächst histologische Präparate des Wundgewebes zu verschiedenen Zeitpunkten des Heilungsverlaufes angefertigt. Dabei lag im Kenntnis der generierten *in vitro*-Daten das Hauptinteresse in der Qualität der neoepithelialen Wundränder. Es ist bekannt, dass Keratinozyten des Wundrandes wenige Stunden nach Verletzung einer Änderung ihres Phänotyps unterlaufen und mit der Migration auf der provisorischen Matrix des Granulationsgewebes in das Wundbett beginnen [Ortonne *et al.* 1981; Paladini *et al.* 1996]. Keratinozyten hinter den aktiv migrierenden Zellen durchlaufen hingegen einen massiven Proliferationsschub und bilden das so genannte hyperproliferierende Epithel (HE) [Martin 1997; Singer und Clark 1999; Kirfel und Herzog 2004; Santoro und Gaudino 2005]. Dieses stellt die zelluläre Basis für die in die Wunde migrierenden Keratinozyten dar und ist somit von fundamentaler Bedeutung für den Wundschluss.

In den angefertigten Wundschnitten konnten nach Gegenfärbung der histologischen Präparate drastische Unterschiede zwischen dem morphologischen Erscheinungsbild nicht-transgener und transgener Wunden festgestellt werden. In den Wunden nicht-transgener Tiere war bereits 5 Tage nach Verwundung deutlich die Bildung des HE sichtbar, aus dem heraus sich eine bereits tief in das Wundbett vordringende neoepitheliale Zunge gebildet hatte. In völligem Gegensatz dazu waren die Epithelzungen in Wunden transgener Tiere nur marginal in den Wundraum eingedrungen und im Vergleich stark dystrophisch (Abb. III.16). Die Auszählung der Keratinozytenzahl im HE (mediane Schnittebene) bestätigte dies und ergab statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der durchschnittlichen Zellzahl in den Epithelrändern (Abb. III.15). Das hyperproliferierende Epithel in Wunden nicht-transgener Tiere setzte sich im Mittel aus einer 2,6-fach höheren Zellzahl als das transgener Tiere zusammen.



**Abb. III.15: Vergleich der Zellzahlen in den hyperproliferierenden Epithelien transgener und nicht-transgener Tiere am fünften Heilungstag**

Gefrierschnitte (8µm) aus der medianen Schnittebene verschiedener repräsentativer Tag 5-Wunden (Linie 3, 12 und 13a) transgener und nicht-transgener Tiere wurden zur Ermittlung der Keratinozytenzahl im HE (manuelle Auszählung aus einer 40-fachen Vergrößerung auf Papier) der Wundränder (n=6) herangezogen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. \*\*\* p<0,001 (ungepaarter t-Test).

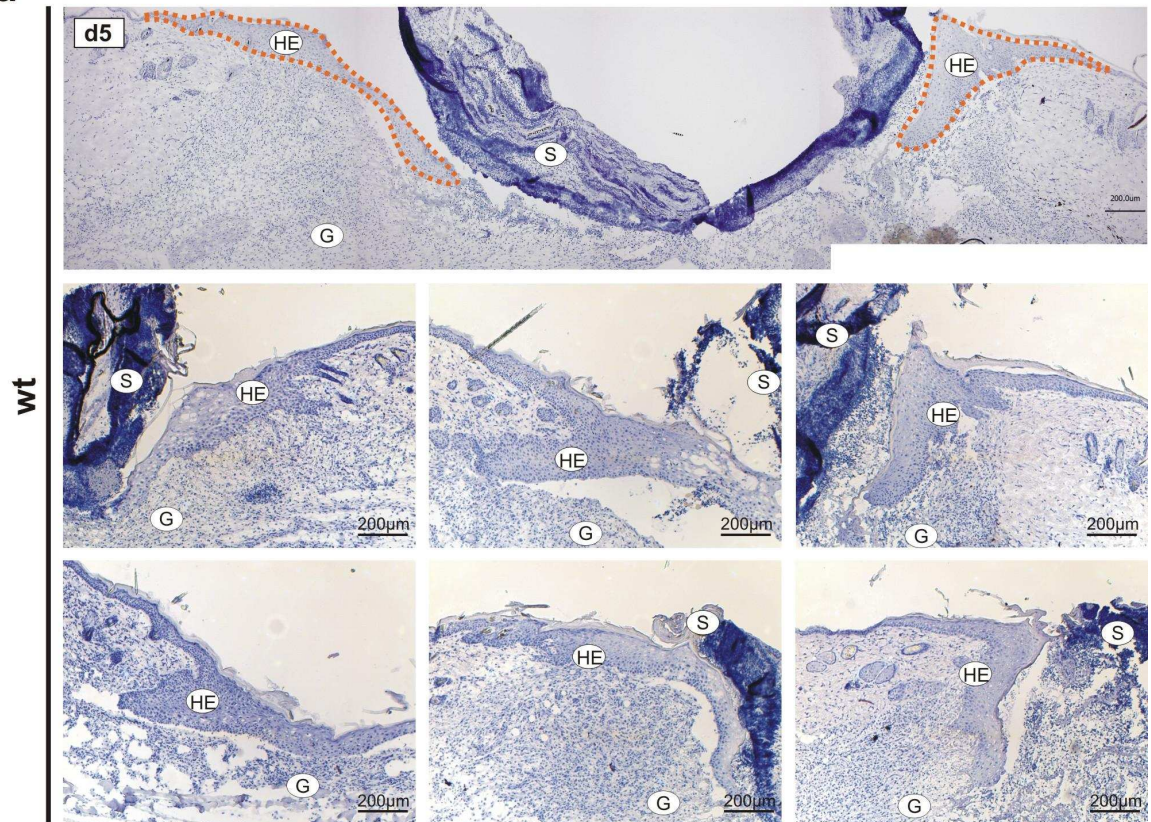
In der Konsequenz stellten sich auch 7 Tage nach Verwundung morphologische Unterschiede heraus. Während nahezu alle Wunden nicht-transgener Tiere bereits vollständig reepithelialisiert waren, blieb ein erheblicher Bereich der Oberfläche transgener Wunden ausschließlich mit Schorf bedeckt (siehe auch Abb. III.14 b). Die führenden neoepithelialen Zungen waren teilweise noch sehr weit voneinander entfernt.

Interessanterweise beschränkten sich die histologisch erkennbaren Unterschiede zwischen Wunden transgener Tiere und denen nicht-transgener Geschwistertiere auf das epidermale Kompartiment. Das Granulationsgewebe schien weitestgehend unbeeinflusst und war vergleichbar gut ausgebildet. Allein der Prozess der Wundkontraktion, der auf eine gesteigerte Zahl kontraktile Myofibroblasten zurückzuführen ist [Darby *et al.* 1990; Martin 1997; Singer und Clark 1999; Hinz 2007], schien in Wunden nicht-transgener Tiere im Vergleich zu transgenen Tieren bereits eingeleitet zu sein (Abb. III.16).

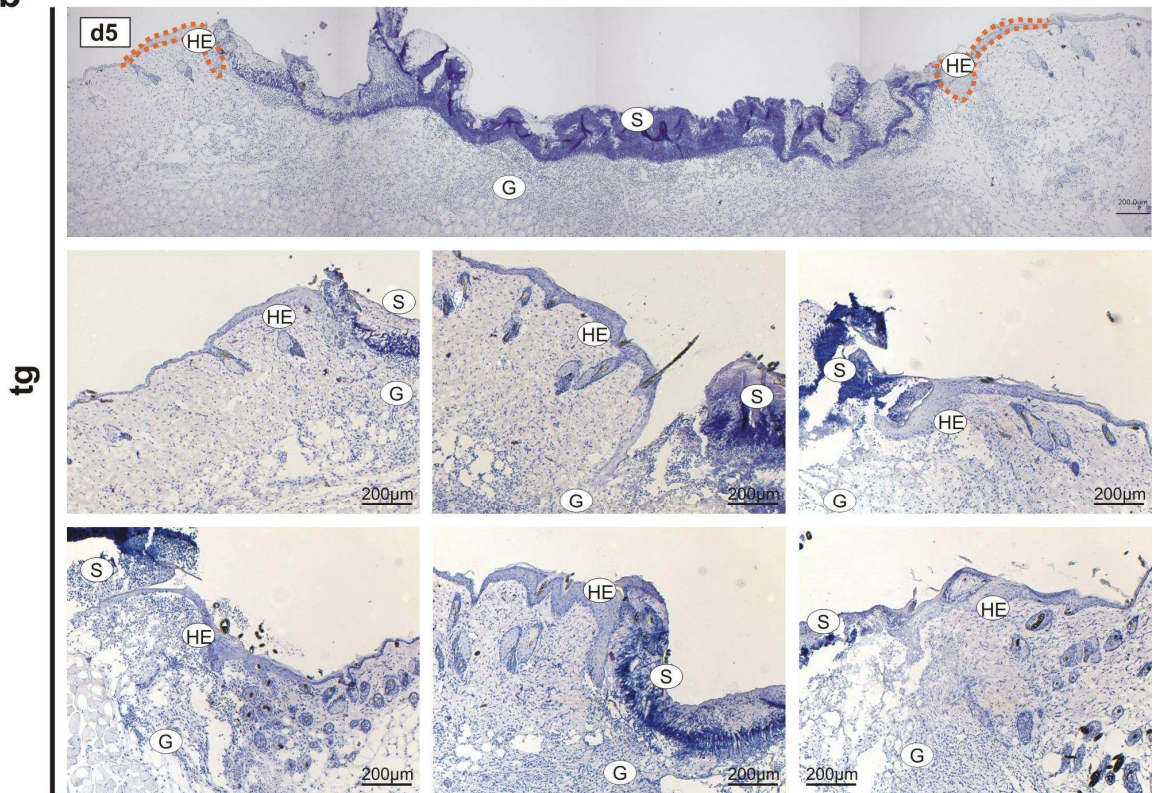
**Abb. III.16: Histologischer Wundquerschnitt an den Tagen 5 und 7 nach Verletzung**

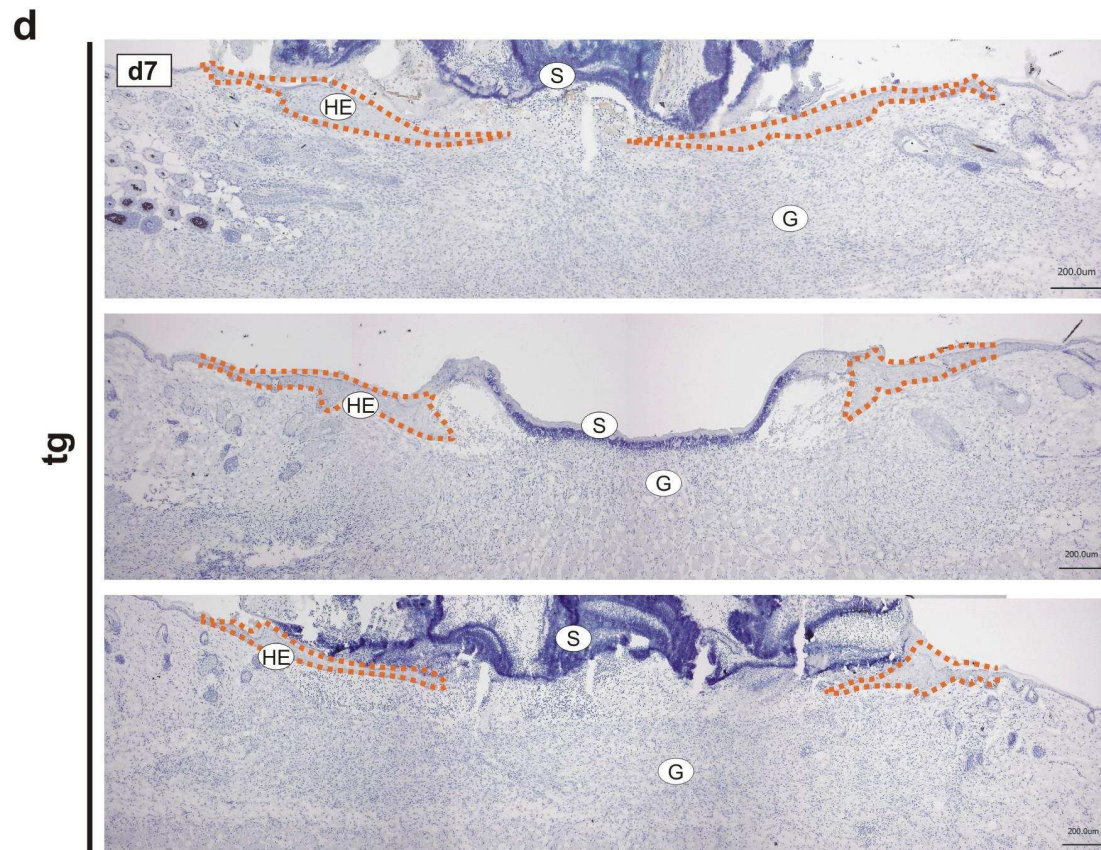
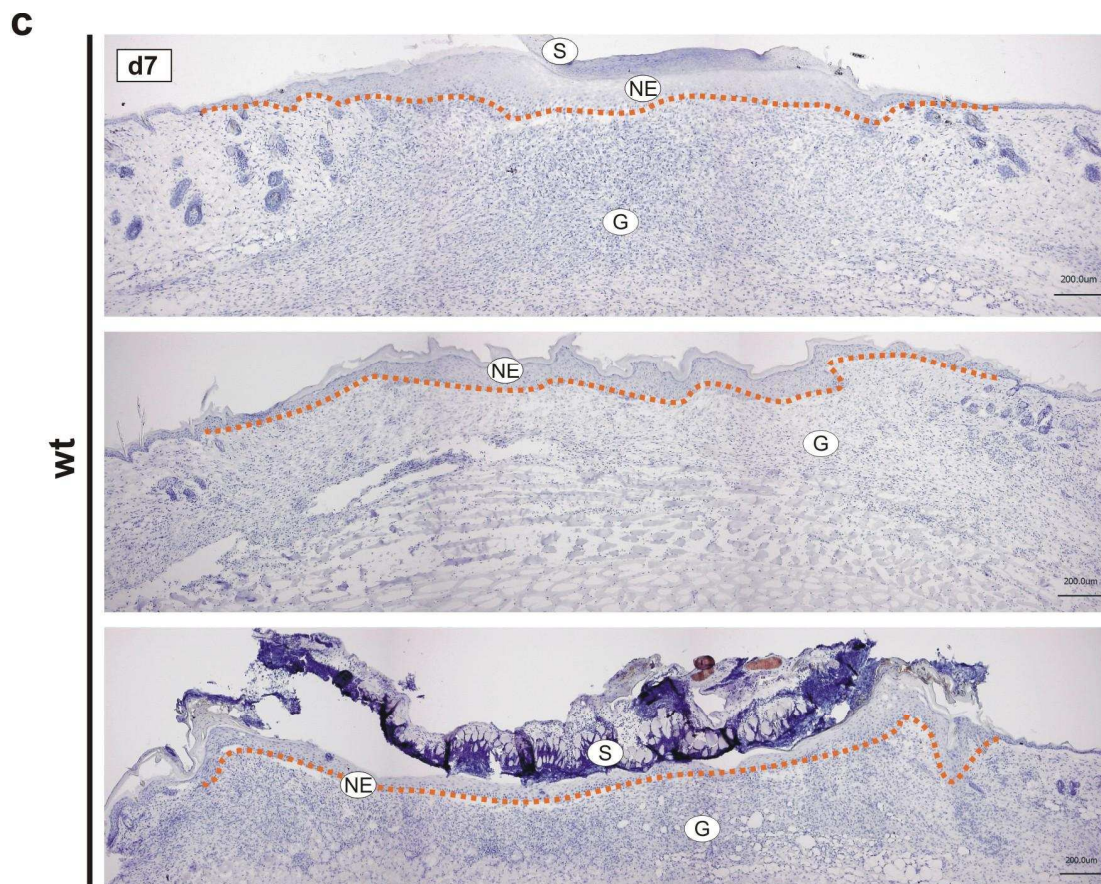
Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3, 12 und 13a wurden verletzt. Aus jeweils einer Wunde wurden Gefrierschnitte (8µm) hergestellt und mit Hämatoxylin gefärbt. Dargestellt sind Aufnahmen repräsentativer Präparate, angefertigt aus einem der ersten zehn Schnitte nach dem Anschneiden des Blockes. Übersichtsfotos der gesamten Wunde wurden nachträglich aus mehreren Einzelbildern zusammengesetzt. (a+b) Wundquerschnitte aus Tag 5-Wunden. Aufgeführt sind jeweils eine Übersichtsfärbung und sechs Detailaufnahmen der hyperproliferierenden Epithelien. Die gestrichelte Linie kennzeichnet jeweils die Epithelzungen. (c+d) Wundquerschnitte aus Tag 7-Wunden. Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Neoepidermis bzw. Epithelzungen. S: Schorf, NE: Neoepithel, HE: hyperproliferierendes Epithel, G: Granulationsgewebe.

**a**



**b**



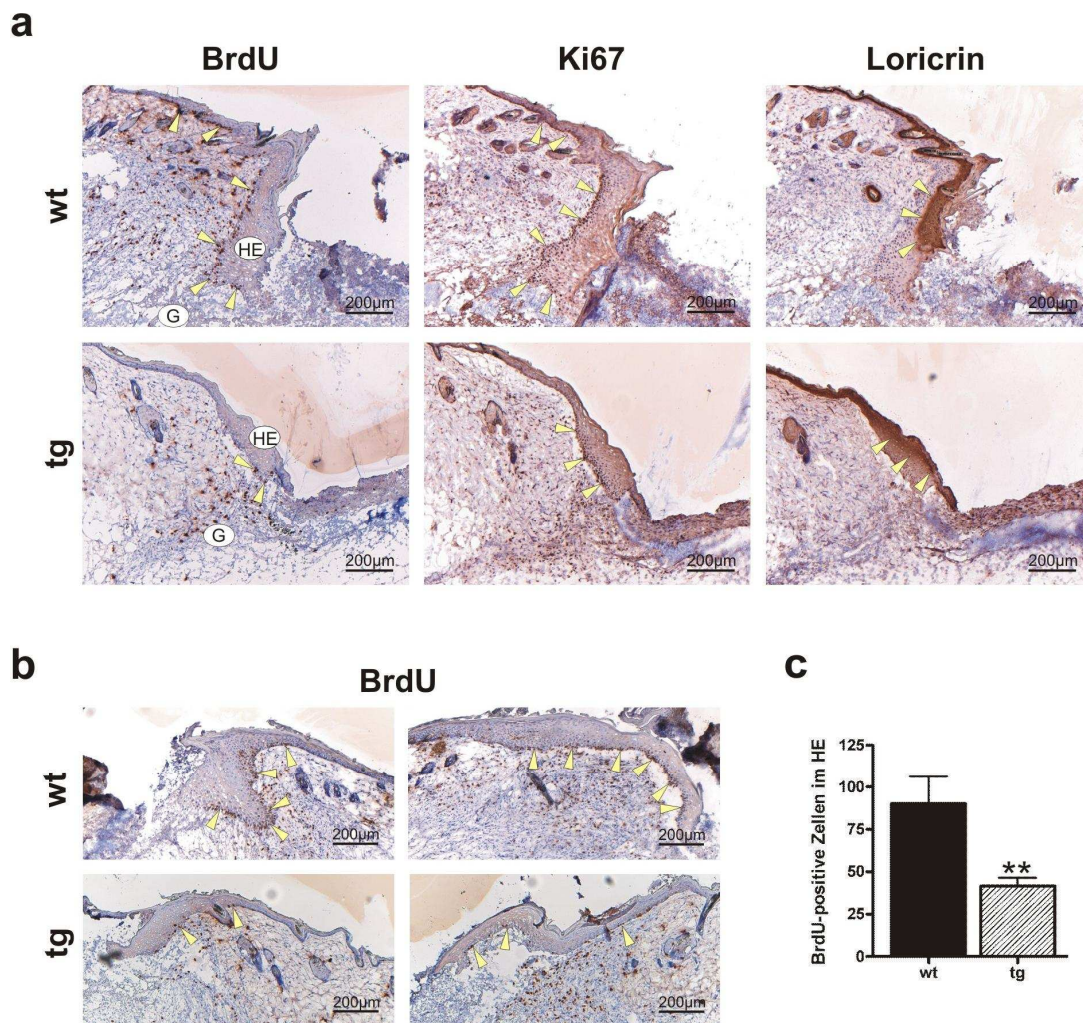


#### **4.1.2 Neopitheliale Wundränder transgener Tiere sind durch eine verminderte Zahl teilungsaktiver Zellen charakterisiert**

Zur weiteren Charakterisierung wurden histologische Schnitte aus Tag 5-Wunden immunhistochemisch gegen den Proliferationsmarker Ki67 und den Differenzierungsmarker Loricrin gefärbt. Unterstützend ist einigen Tieren das synthetische Nukleosid 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) appliziert worden, das aufgrund struktureller Analogie zu Thymidin in sich replizierenden Zellen als Basenderivat in die DNA eingebaut wird. Es ist anschließend immunhistochemisch detektierbar [de Fazio *et al.* 1987].

Im Vergleich der BrdU- und Ki67-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Zahl Ki67-positiver Zellen deutlich überwiegt, diese jedoch in direkter Relation zu den in geringerer Zahl positiv gegen BrdU gefärbten Zellen stand. Auffällig hingegen war, dass obwohl auch in transgenen Wunden aktiv proliferierende basale und suprabasale Zellen im HE detektierbar waren, die Anzahl gefärbter Zellen im HE dieser heilungsdefizienten Wunden jedoch deutlich geringer war als in normal heilenden Wunden nicht-transgener Geschwister (Abb. III.17). Nach Auszählung BrdU-positiver Zellen des HE konnte diese Beobachtung als statistisch signifikant bestätigt werden (Abb. III.17 c).

Wie zu erwarten konnte in der Parallelfärbung gegen Loricrin eine deutliche Abtrennung proliferierender BrdU- und Ki67-positiver Keratinozyten von bereits ausdifferenzierenden Zellen beobachtet werden. Aus dem Vergleich Loricrin-positiver Zellen transgener sowie nicht-transgener Tiere gingen keine gravierenden Unterschiede hervor, wenn auch in WT-Tieren die immunpositive Färbung in Keratinozyten distaler Zellschichten deutlich schärfer von darunterliegenden suprabasalen Lagen abgegrenzt war. Die Verteilung Loricrin-positiver Keratinozyten schien in einigen, aber nicht allen Wunden transgener Tiere diffuser verteilt (Abb. III.17 a). Reduzierte Neopithelien verbunden mit deutlich verzögerter Reepithelialisierung der Wunden transgener Tiere bestätigen letztlich die in der Zellkultur gewonnenen Ergebnisse einer gestörten Keratinozytenproliferation und -migration.



**Abb. III.17: Immunhistochemische Färbung gegen BrdU, Ki67 und Loricrin in Tag 5-Wunden**  
 Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3 und 13a wurden verletzt. Zur Visualisierung proliferierender Zellen ist den Tieren 6h vor Entnahme der Wunden 1mg BrdU i.p. appliziert worden. Aus den entnommenen Wunden wurden Gefrierschnitte (8µm) hergestellt, die mit spezifischen Antikörpern gegen BrdU, Ki67 und Loricrin gefärbt wurden. Dargestellt sind repräsentative Präparate, angefertigt aus einem der ersten 10 Schnitte nach dem Anschneiden des Blockes. **(a)** Serienschritte zeigen die Abgrenzung proliferierender von terminal differenzierenden Keratinozyten. **(b)** Eine zusätzliche Auswahl gegen BrdU gefärbter hyperproliferierender Epithelien (HE), aus denen neben weiteren Beispielen (n=8) die Zahl BrdU- positiver Zellen des HE quantifiziert wurde **(c)**. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. \*\*  $p < 0,01$  (ungepaarter t-Test).

#### 4.2 Die verzögerte Wundheilung in der transgenen Maus ist charakterisiert durch eine verstärkte und verlängerte Entzündung

Der Prozess der Wundheilung stellt einen dynamischen Komplex mehrerer konzentriert ablaufender Heilungsphasen dar. Als einer der ersten Abschnitte gilt dabei die akute Entzündungsphase als potenter Initiator des Regenerationsprozesses. Um dieser Funk-

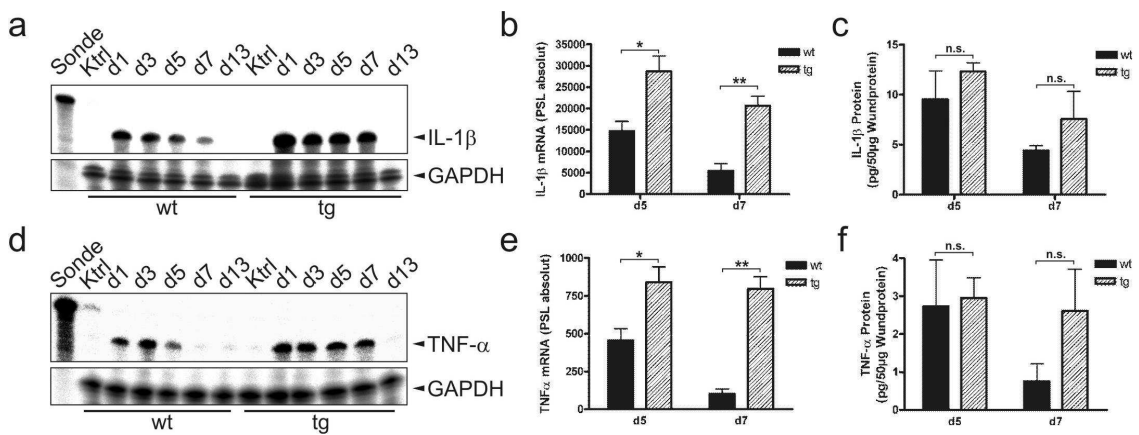
tion gerecht zu werden, ist eine engmaschige Kontrolle des Entzündungsprozesses von herausragender Bedeutung. Eine Fehlregulation dieser Entzündungsphase steht oft in Assoziation mit massiven Wundheilungsstörungen. Es existiert eine Vielzahl von Studien, in denen besonders für den diabetisch-gestörten Heilungsprozess eine deutlich überschießende und chronifizierte Entzündung beschrieben ist [Loots *et al.* 1998; Wetzler *et al.* 2000a; Goren *et al.* 2003a; Kämpfer *et al.* 2005]. In Kenntnis dieser Studien war es daher von großem Interesse, die Entzündungssituation im generierten transgenen Mausmodell detailliert zu untersuchen.

#### **4.2.1 Verstärkte und lang anhaltende Expression klassischer proinflammatorischer Zytokine in Wunden transgener Tiere**

Zur eingehenden Charakterisierung der Entzündungssituation im transgenen Mausmodell sind zunächst die mRNA-Spiegel der prototypischen proinflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  ermittelt worden. Neben einer regulatorischen Beeinflussung der Immunreaktion im Wundareal sind diese Faktoren in verschiedene heilungsrelevante Prozesse involviert. Ihr Expressionsmuster während des Heilungsprozesses ist im Tiermodell und im Menschen gut charakterisiert, als sekretorische Quellen konnten neben residenten Zelltypen (u. a. Keratinozyten) vor allem neutrophile polymorphkernige Leukozyten (PMN) und Makrophagen (M $\phi$ ) identifiziert werden, die in das Wundareal infiltrieren [Feiken *et al.* 1995; Hübner *et al.* 1996; Grellner *et al.* 2000; Bryan *et al.* 2005].

In Korrelation mit bereits publizierten Daten [Hübner *et al.* 1996; Wetzler *et al.* 2000a; Goren *et al.* 2003a; Bryan *et al.* 2005] konnte in nicht-transgenen Tieren der Linien 3, 12 und 13a im Wundgewebe eine massive Induktion der mRNA-Spiegel von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in der Entzündungsphase detektiert werden (Abb. III.18 a/d). Nach Abklingen der initialen Entzündungsantwort sank, wie für eine normale Heilungssituation erwartet, der Spiegel bereits ab dem 5. Tag nach Verwundung in Richtung des basalen Expressionsniveaus. Interessanterweise stellte sich die Situation in heilungsdefizienten transgenen Mäusen dagegen deutlich anders dar. Die gestörte Wundheilung in den SOCS3-überexprimierenden Mauslinien war charakterisiert durch eine massiv verstärkte und bis in späte Phasen des Heilungsverlaufes drastisch verlängerte mRNA-Expression der untersuchten Zytokine. So konnte im Wundgewebe transgener Tiere in Analogie zur

Expressionskinetik in Wunden diabetischer *db/db*- und *ob/ob*-Mäuse für die Tage 5 und 7 nach Verwundung signifikant erhöhte mRNA-Spiegel für IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  detektiert werden (Abb. III.18 b/e) [Wetzler *et al.* 2000a; Goren *et al.* 2003a]. Mit Abschluss der Wundheilung fielen auch im transgenen Tier die mRNA-Spiegel der untersuchten Zytokine. Am 13. Tag nach Verwundung war sowohl in nicht-transgenen als auch in transgenen Wunden keine Expression mehr detektierbar.



**Abb. III.18: Expression klassischer proinflammatorischer Zytokine im Wundgewebe**

Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3, 12 und 13a wurden verletzt. Die Wunden wurden entnommen und zur Herstellung von Gesamt-RNA- und Gesamtproteinlysate aufgearbeitet. (a+d) Jeweils 10 $\mu$ g Gesamt-RNA wurden in einer RNase-Verdauungsanalyse eingesetzt, um die Expressionskinetiken der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  über den Heilungsverlauf zu ermitteln. Dargestellt sind repräsentative Serien der Linie 13a (n=3 Wunden/Zeitwert). Als Größenmarker diente 1kcpm der Sonde, zur Ladekontrolle wurde GAPDH hybridisiert. Ktrl: unverletzte Haut; d1-d13: Tage 1-13 nach Verletzung. (b+e) Die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  wurde für die Tage 5 (d5) und 7 (d7) nach Verwundung statistisch ausgewertet. Jeder Zeitwert repräsentiert 12 Wunden (n=12) aus je 4 verschiedenen Tieren der Linien 3, 12 und 13a. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. n.s. nicht signifikant,  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (ungepaarter t-Test). PSL: *photon stimulated luminescence* (c+f) ELISA-Messung von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  aus 50 $\mu$ g Gesamtprotein aus Tag 5 (d5)- und Tag 7 (d7)-Wunden. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 Wunden verschiedener Tiere (n=4). n.s. nicht signifikant,  $p > 0,05$

Im Anschluss an die mRNA-Analytik wurde die Proteinexpression von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  an den Tagen 5 und 7 nach Verletzung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die messbaren Proteinmengen in transgenen Wunden in Kenntnis der massiv induzierten mRNA-Transkripte nicht vergleichbar induziert waren, wenn auch zumindest für den 7. Tag nach Verletzung deutliche Unterschiede zwischen nicht-transgenen und transgenen Tieren für beide Zytokine erkennbar waren (Abb. III.18 c/f).

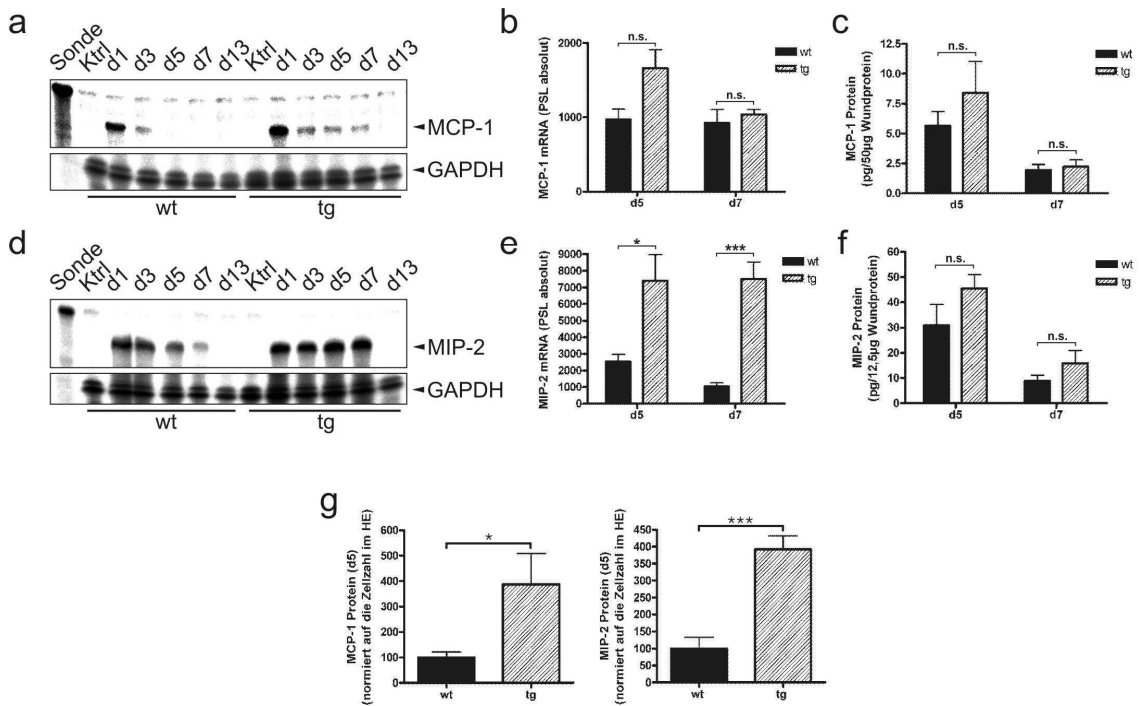


#### 4.2.2 Expression und Lokalisierung chemotaktischer Zytokine

Es ist bekannt, dass in das Wundgebiet infiltrierende PMN und M $\phi$  potente Produzenten proinflammatorischer Zytokine darstellen [DiPietro 1995; Hübner *et al.* 1996]. Aus den Erkenntnissen weiterer *in vitro* und *in vivo* Analysen in verschiedenen Mausmodellen und im humanen Organismus weiß man, dass Keratinozyten zur Population immunmodulatorischer Zellen zu zählen sind, die mit hoher Potenz zur Sekretion der auf Leukozyten chemotaktisch-wirkenden Zytokine der CC- und CXC-Familien in der Lage sind (vgl. auch Abb. III.29) [Wetzler *et al.* 2000a/b; Gillitzer und Goebeler 2001; Goren *et al.* 2003a; Benoit *et al.* 2004; Cataisson *et al.* 2006; Tokura *et al.* 2008]. Daher lag es nahe, die Expression des auf PMN-chemotaktisch wirkenden *macrophage inflammatory protein* (MIP)-2 (funktionell homolog zu humanem IL-8) und des primär auf Monozyten wirkenden *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1/CCL-2 inklusive der Lokalisierung der entsprechenden sezernierenden Zellen zu ermitteln.

Zur Untersuchung der mRNA- und Proteinexpressionsspiegel wurden Wundgewebe transgener und nicht-transgener Tiere der Linien 3, 8, 12 und 13a analysiert. Dabei konnte in WT-Tieren eine starke und temporär eng kontrollierte Induktion von MCP-1/CCL-2 mRNA detektiert werden (Abb. III.19 a/b). In Wunden transgener Tiere war dagegen erneut die Tendenz zu verlängerter Expression erkennbar. Sowohl auf Protein-niveau als auch auf mRNA-Ebene konnten in heilungsdefizienten Wunden noch am 5. Tag nach Setzen der Wunden erhöhte Mengen an MCP-1/CCL-2 gemessen werden. Am 7. Tag nach Verwundung war im Mittel jedoch kein gravierender Unterschied zwischen normal heilenden Wunden und denen transgener Tiere existent.

Wesentlich deutlicher zeigten sich jedoch Unterschiede in der Expression von MIP-2/CXCL-2 mRNA zwischen den verschiedenen Genotypen. Obwohl die Induktion der mRNA in nicht-transgenen Tieren bis zum 7. Tag nach Verletzung detektierbar war, konnten in transgenen Wunden für die Tage 5 und 7 signifikant höhere Mengen an MIP-2/CXCL-2-Transkripten aufgezeigt werden. Ebenso waren die messbaren MIP-2/CXCL-2-Proteinkonzentrationen im heilungsdefizienten Wundgewebe transgener Tiere an den Tagen 5 und 7 nach Verwundung tendenziell höher als in normal heilenden Wunden nicht-transgener Tiere.



**Abb. III.19: Expressionskinetik chemotaktischer Zytokine im Wundgewebe**

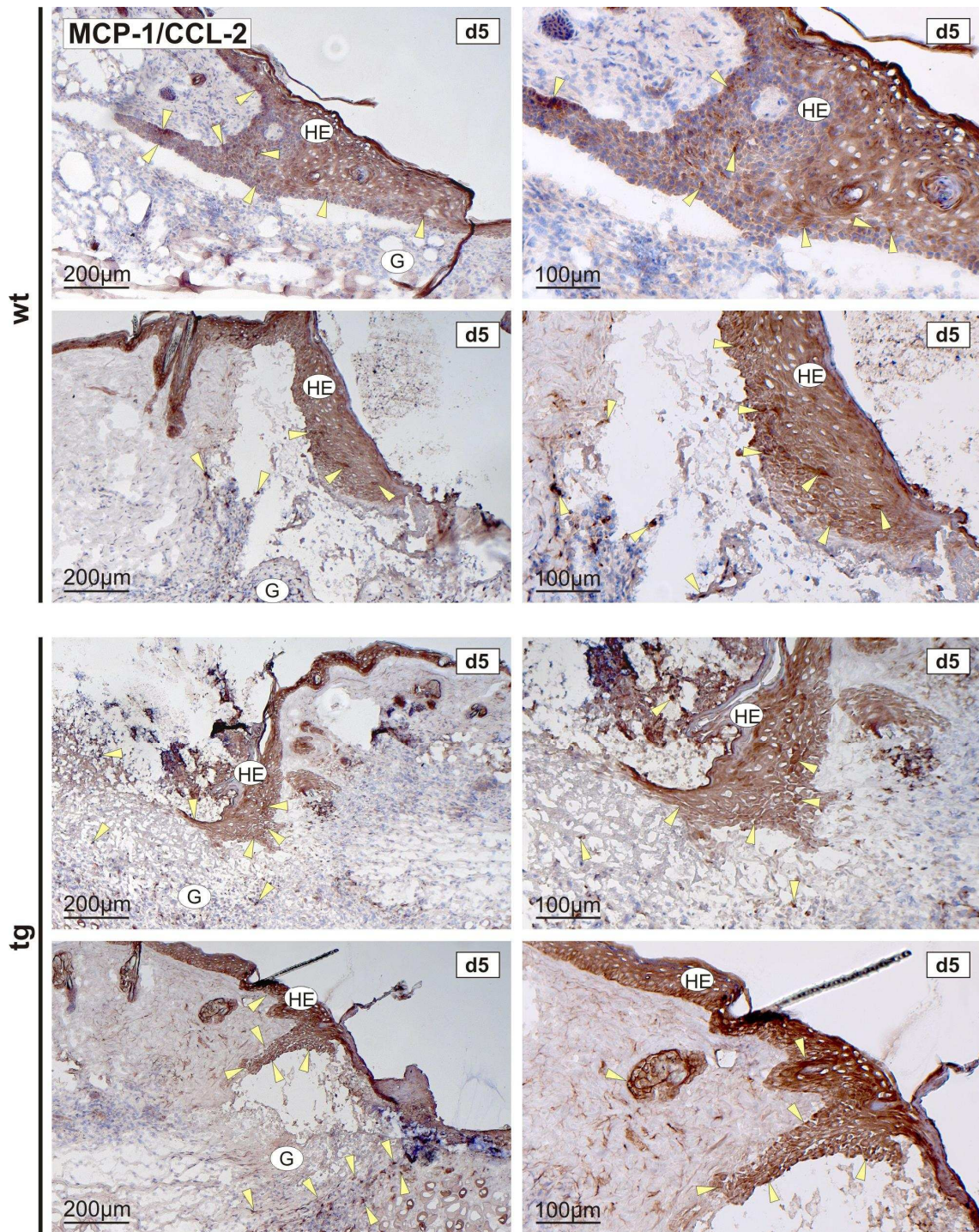
Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3, 12 und 13a wurden verletzt. Die Wunden wurden entnommen und zur Herstellung von Gesamt-RNA- und Gesamtproteinlysat aufgearbeitet. (a+d) In einer RNase-Verdauerschutzanalyse wurden 5µg (MIP-2/CXCL-2) bzw. 10µg (MCP-1/CCL-2) Gesamt-RNA eingesetzt, um die Expressionskinetiken der Chemokine über den Heilungsverlauf zu ermitteln. Dargestellt sind repräsentative Serien der Linie 13a (n=3 Wunden/Zeitwert). Als Größenmarker diente 1kcpm der markierten Sonde, zur Ladekontrolle wurde GAPDH hybridisiert. Ktrl: unverletzte Haut; d1-d13: Tage 1-13 nach Verletzung. (b+e) Die mRNA-Expression der Chemokine MCP-1/CCL-2 und MIP-2/CXCL-2 wurde für die Tage 5 (d5) und 7 (d7) nach Verwundung statistisch ausgewertet. Jeder Zeitwert repräsentiert 12 Wunden (n=12) aus je 4 verschiedenen Tieren der Linien 3, 12 und 13a. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. n.s. nicht signifikant, p>0,05; \* p<0,05; \*\* p<0,01 (ungepaarter t-Test). PSL: *photon stimulated luminescence* (c+f) ELISA-Messungen aus 50µg Wundprotein (MCP-1/CCL-2) bzw. 12,5µg Wundprotein (MIP-2/CXCL-2) aus Tag 5 (d5)- und Tag 7 (d7)-Wunden. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 5 Wunden verschiedener Tiere (n=5). n.s. nicht signifikant, p>0,05 (g) Die unter (c+f) dargestellten Proteinmengen aus Tag 5-Wunden wurden auf die durchschnittliche Anzahl an Keratinozyten in den hyperproliferierenden Epithelrändern (Tag 5) transgener und nicht-transgener Mäuse projiziert, da Wundrandkeratinozyten in dieser Heilungsphase die sekretorischen Hauptquellen der Chemokine MCP-1/CCL-2 und MIP-2/CXCL-2 im Wundareal darstellen. Dabei wurde der Mittelwert aus Wunden nicht-transgener Tiere auf 100 normiert, der Mittelwert aus transgenen Wunden entsprechend extrapoliert und mit dem Faktor 2,6 multipliziert, der sich aus dem Verhältnis der Keratinozytenzahl im HE transgener und nicht-transgener Tiere ergibt (vgl. Abb. III.15).

Im Anschluss an die Analyse der Expressionskinetiken sind immunhistologische Färbungen angefertigt worden. Zur Klärung der Frage, ob die Expression des Transgens in Keratinozyten möglicherweise in Assoziation zur erhöhten Chemokinkonzentration im Wundareal zu betrachten ist, sind Tag 5-Wunden zur Analyse herangezogen worden. Dabei konnte in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten gezeigt werden, dass neben infiltrierenden Makrophagen vor allem Keratinozyten des Wundrandes und dort speziell Zellen des hyperproliferierenden Epithels als zelluläre Quellen von MCP-1/

CCL-2 identifiziert werden konnten und somit maßgeblich an der Rekrutierung weiterer Monozyten/Makrophagen beteiligt waren (Abb. III.20).

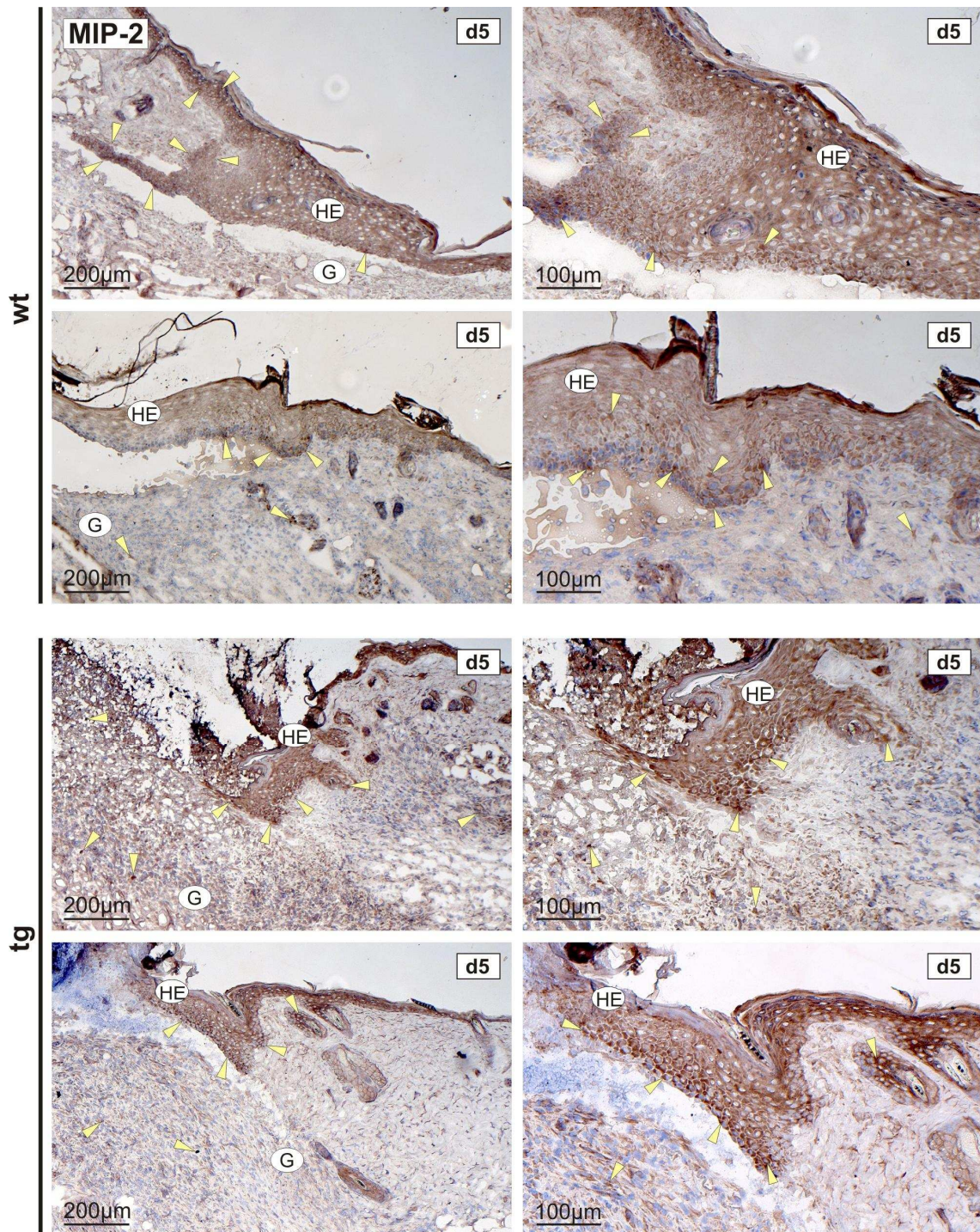
Die immunhistochemische Färbung gegen MIP-2/CXCL-2 stellte sich interessanterweise sowohl in Tag 5-Wunden transgener als auch nicht-transgener Tiere etwas anders dar, als bisher bekannt. Es konnten weniger die epidermalen Zellen der äußeren Haarwurzelscheide als potente zelluläre Quellen des Chemokins MIP-2/CXCL-2 identifiziert werden, sondern vielmehr - in Analogie zur Lokalisierung MCP-1/CCL-2 synthetisierender Zellen - Wundrandkeratinozyten sowie Zellen des HE.

Auffällig war weiterhin, dass sich, obwohl auch im Granulationsgewebe einige immunpositive Zellen lokalisiert waren, die Expressionsdichte der Chemokine im HE wesentlich kompakter darstellte, womit Keratinozyten der Wundränder offensichtlich die dominierende sekretorische Quelle während dieser Heilungsphase darstellten. Daraus ergibt wiederum sich eine interessante Schlussfolgerung, denn es ist zudem zu beachten, dass trotz der deutlich reduzierten Neoepithelien sogar tendenziell höhere Spiegel der Chemokine MCP-1/CCL-2 und MIP-2/CXCL-2 im transgenen Wundgewebe gemessen wurden als in den Wunden nicht-transgener Tiere. Angenommen, die komplette Syntheseleistung zur Bereitstellung dieser Chemokine ließe sich allein auf Keratinozyten des HE reduzieren, ergäben sich drastische Unterschiede in der Produktivität zwischen den hypertrophen Epithelrändern nicht-transgener Tiere und denen der atrophischen Randbereiche transgener Geschwister (Abb. III.19 g). Daraus ließe sich ableiten, dass transgene Keratinozyten *in vivo* deutlich größere Mengen chemotaktischer Zytokine im Wundareal bereitstellen als Zellen nicht-transgener Tiere. Obwohl SOCS3 als negativer Regulator einer exzessiven proentzündlichen Signaltransduktion bekannt ist, könnte dies dennoch auf eine direkt oder indirekt vermittelte funktionelle Verknüpfung zwischen der konstitutiven SOCS3-Expression einerseits und einem *in vivo* tendenziell verstärkt-proentzündlichen Keratinozyten-Phänotyp andererseits zurückzuführen sein.



**Abb. III.20: Lokalisierung MCP-1/CCL-2-positiver Zellen im Wundareal 5 Tage nach Verletzung**

Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3 und 13a wurden verletzt. Fünf Tage nach Verletzung wurden aus den Wunden Gefrierschnitte (8µm) hergestellt, um unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers MCP-1/CCL-2-positive Zellen zu identifizieren. Zellkerne wurden zur besseren Kontrastierung mit Hämatoxylin gegengefärbt. Dargestellt sind Übersichts- (links) und Detailaufnahmen (rechts) repräsentativer Präparate. Pfeile kennzeichnen immunpositive Zellen des hyperproliferierenden Epithels und Zellen des Granulationsgewebes. HE: hyperproliferierendes Epithel, G: Granulationsgewebe.



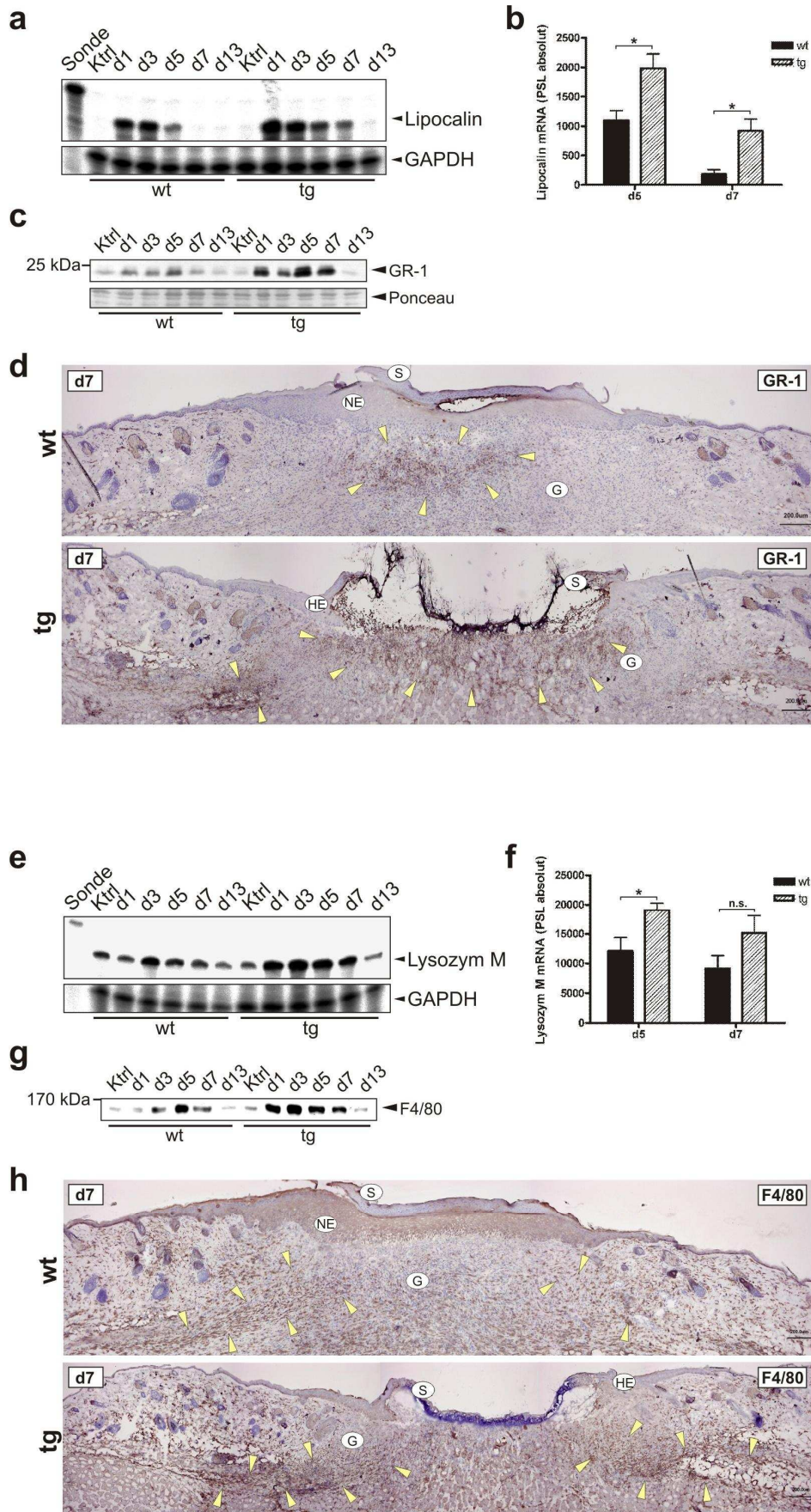
**Abb. III.21: Lokalisierung MIP-2/CXCL-2-positiver Zellen im Wundgewebe 5 Tage nach Verletzung**  
 Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3 und 13a wurden verletzt und 5 Tage nach Verwundung getötet. Aus den Wunden wurden Gefrierschnitte (8µm) hergestellt, um unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers MIP-2/CXCL-2-positive Zellen zu identifizieren. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Dargestellt sind Übersichts- (links) und Detailaufnahmen (rechts) repräsentativer Schnitte. Pfeile kennzeichnen immunpositive Zellen des hyperproliferierenden Epithels und Zellen im Granulationsgewebe. HE: hyperproliferierendes Epithel, G: Granulationsgewebe.

#### 4.2.3 Die verzögerte Wundheilung in der transgenen Maus wird von einer anhaltenden Präsenz infiltrierender Immunzellen begleitet

Die chemotaktischen Eigenschaften von MCP-1/CCL-2 und MIP-2/CXCL-2 auf Neutrophile und Makrophagen sind für den Prozess der Wundheilung im murinen und humanen Organismus vielfach beschrieben [DiPietro *et al.* 1995; Engelhardt *et al.* 1998; Cataisson *et al.* 2006]. Trotz der im Vergleich zur mRNA-Expression weniger drastischen Erhöhung der Proteinspiegel der untersuchten Chemokine in den Wunden transgener Tiere war es von Interesse, zu ermitteln, ob sich auch eine geringe Erhöhung der Verfügbarkeit dieser Mediatoren in einer verstärkten Präsenz von Leukozyten äußern würde. Zu diesem Zweck wurden die Immunzellpopulationen in den Wunden transgener und nicht-transgener Tiere der Linien 3, 12 und 13a unter Ermittlung der Expressionskinetiken PMN-spezifischer Antigene (Lipocalin, GR-1) und Makrophagen-spezifischer Marker (Lysozym M, F4/80) analysiert, deren Spiegel aufgrund der konstitutiven Expression ein Maß für die Zahl der Immunzellen im Gewebe darstellt. Im Anschluss wurden zur Verifizierung der generierten Daten histologische Serienschnitte immunhistochemisch gegen die erwähnten Marker gefärbt.

Die Analyse ergab auf mRNA-Niveau massiv induzierte Expressionsspiegel an Lipocalin und Lysozym M, wobei sich diese in heilungsdefizienten Wunden transgener Tiere der Tage 5 und 7 nach Verletzung drastisch von denen nicht-transgener Tiere unterschieden (Abb. III.22 a/b + e/f). Beide Marker waren in Wunden transgener Tiere gegenüber Wunden nicht-transgener Mäuse deutlich erhöht. Unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen selektive Oberflächenantigene konnten diese Beobachtungen auch auf Proteinebene bestätigt werden. Diese Daten unterstreichen klar eine über die physiologisch-relevante akute Entzündungsphase hinaus anhaltende Präsenz von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im Wundareal und weisen auf Parallelen zur diabetisch-gestörten Heilungssituation hin [Wetzler *et al.* 2000a; Goren *et al.* 2003a].

In Übereinstimmung mit den RNA- und Proteindaten konnte abschließend auch immunhistochemisch eine deutlich erhöhte Anzahl an Makrophagen und Neutrophilen in Tag 7-Wunden transgener Tiere festgestellt werden (Abb. III.22 d/h und Abb. III.23). Dabei fiel auf, dass Makrophagen aus den Randbereichen in das Granulationsgewebe eindringen, wogegen neutrophile Granulozyten eher zentral unter der Neoepidermis und im Wundschorf lokalisiert waren.



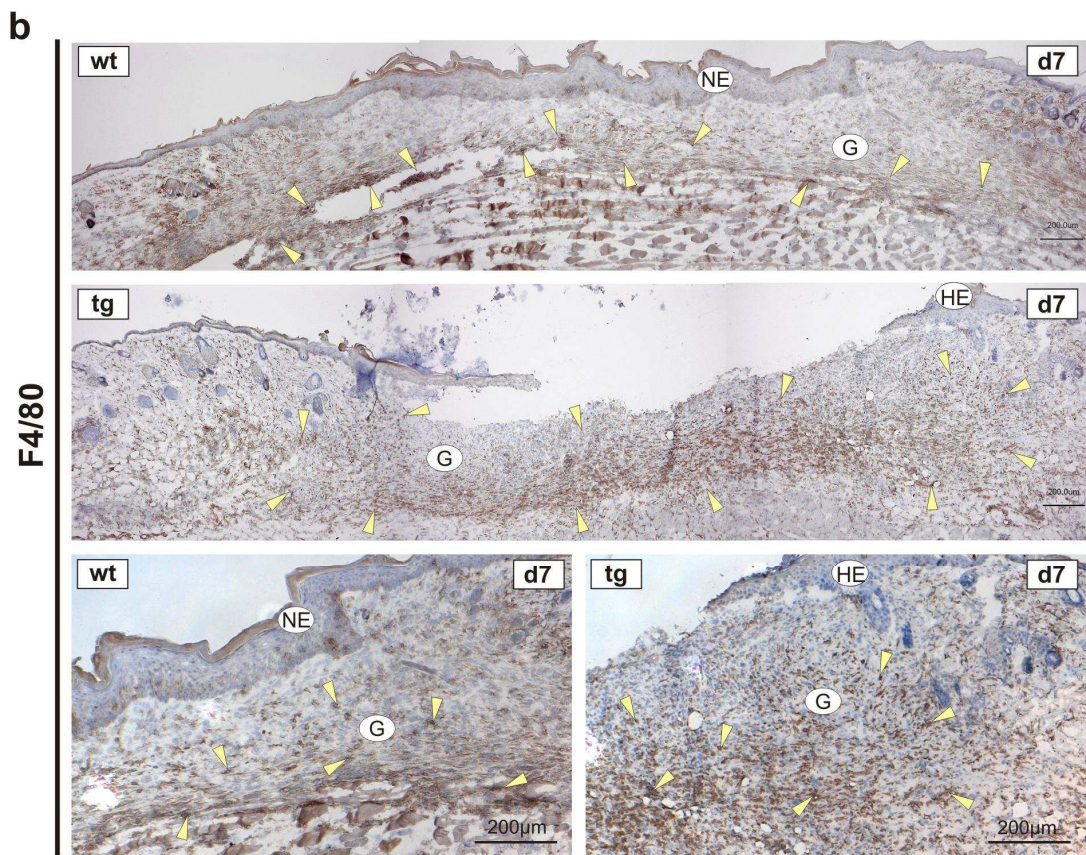
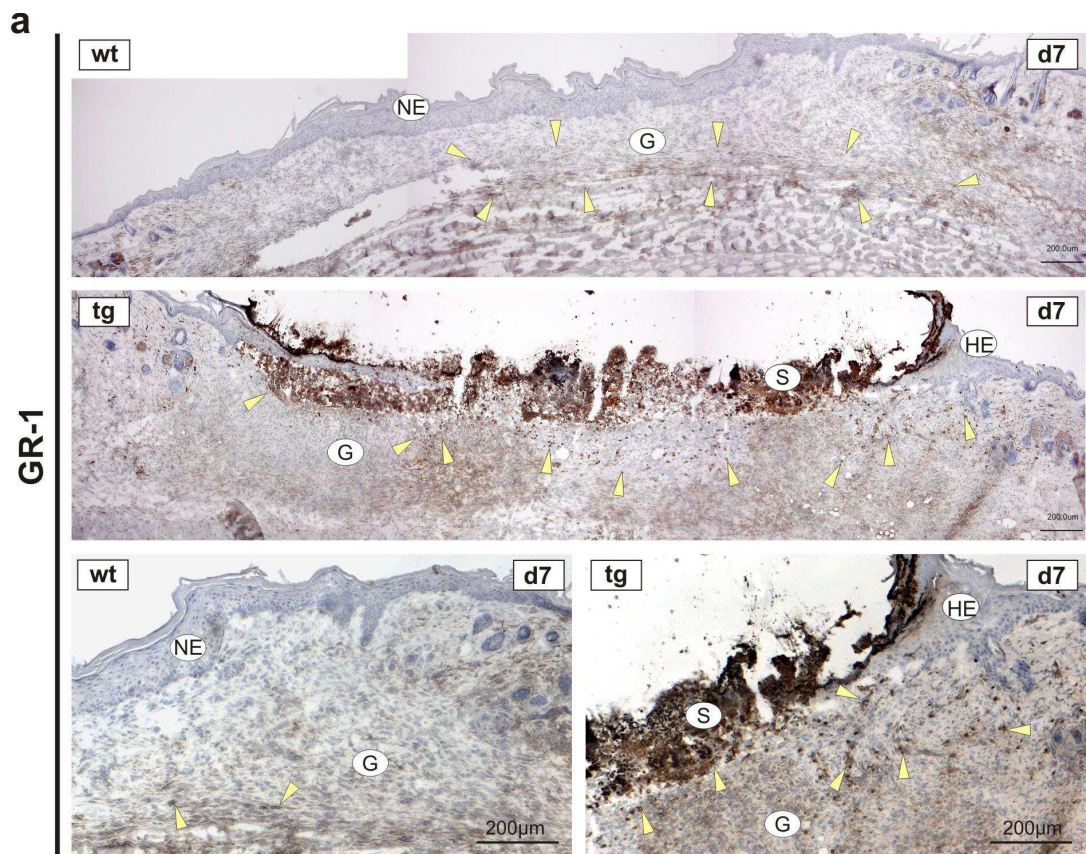
**Abb. III.22: Anhaltende Präsenz von Immunzellen in Wunden transgener Tiere (Seite 102)**

Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3, 12 und 13a wurden verletzt. Die Wunden wurden entnommen und zur Herstellung von Gesamt-RNA- und Gesamtproteinlysate sowie zur Anfertigung von Gefrierschnitten (8µm) aufgearbeitet. (a+e) Jeweils 7µg (Lipocalin) bzw. 5µg Gesamt-RNA (Lysozym M) wurden in einer RNase-Verdauungsanalyse eingesetzt, um die Expressionskinetiken des für neutrophile Granulozyten-spezifischen Markers Lipocalin und des für Monozyten/Makrophagen-spezifischen Markers Lysozym M über den Heilungsverlauf zu ermitteln. Dargestellt sind repräsentative Serien der Linie 13a (n=3 Wunden/Zeitwert). Als Größenmarker diente jeweils 1kcpm der Sonde, zur Ladekontrolle wurde GAPDH hybridisiert. Ktrl: unverletzte Haut; d1-d13: Tage 1-13 nach Verletzung. (b+f) Die mRNA-Expression der Immunzellmarker Lipocalin und Lysozym M wurde für die Tage 5 (d5) und 7 (d7) nach Verwundung statistisch ausgewertet. Jeder Zeitwert repräsentiert 12 Wunden (n=12) aus 4 verschiedenen Tieren der Linien 3, 12 und 13a. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. n.s. nicht signifikant; p>0,05; \* p<0,05 (ungepaarter t-Test). PSL: *photon stimulated luminescence* (c+g) Jeweils 50µg (GR-1) bzw. je 25µg Gesamtprotein (F4/80) wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt. Im Immunoblot erfolgte der Nachweis spezifischer Immunzellmarker für Neutrophile (GR-1) und Makrophagen (F4/80; Nachweis unter nicht-reduzierenden Bedingungen). Eine Ponceau S-Färbung diente zur Ladekontrolle. Die direkte Ladekontrolle für das F4/80-Gel war aufgrund der nicht-reduzierenden Bedingungen technisch nicht realisierbar. Dargestellt sind repräsentative Wundserien der Linie 13a (n=2 Wunden/Zeitwert). (d+h) In Gefrierschnitten aus Tag 7-Wunden wurden neutrophile Granulozyten und Makrophagen über spezifische Antigene immunhistochemisch detektiert (PMN: GR-1, Mφ: F4/80; Pfeile). Zellkerne wurden zur Kontrastierung mit Hämatoxylin gegengefärbt. Dargestellt sind repräsentative Übersichtsaufnahmen, die aus mehreren Einzelfotos zusammengefügt wurden. NE: Neoepithel, HE: hyperproliferierendes Epithel, G: Granulationsgewebe, S: Schorf.

**Abb. III.23: Lokalisierung von Immunzellen in Tag 7-Wunden (Seite 104)**

Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3, 12 und 13a wurden verletzt. Die Wunden wurden 7 Tage nach Verletzung entnommen und zur Anfertigung von Gefrierschnitten (8µm) aufgearbeitet. Unter Verwendung zellspezifischer Antigene konnten (a) neutrophile Granulozyten (GR-1) und (b) Makrophagen (F4/80) im Wundareal immunhistochemisch lokalisiert werden. Dargestellt sind je eine repräsentative Übersichtsaufnahme sowie Detailaufnahmen einer nicht-transgenen und transgenen Wunde von Tieren der Linien 3 und 13a. Pfeile kennzeichnen immunpositiv gefärbte Zellen. NE: Neoepithel, HE: hyperproliferierendes Epithel, G: Granulationsgewebe, S: Schorf.





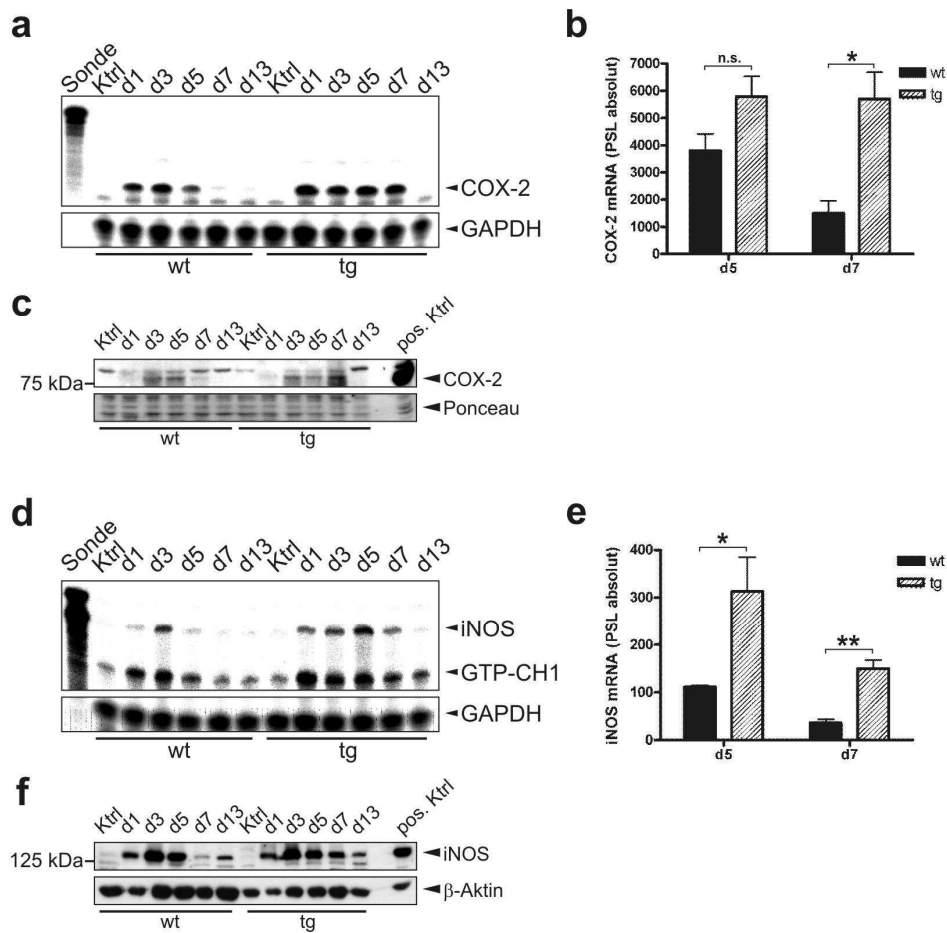
#### 4.2.4 Verstärkte und lang anhaltende Expression entzündungsrelevanter Enzyme in Wunden transgener Tiere: Cyclooxygenase (COX)-2 und induzierbare NO-Synthase (iNOS)

Die Entzündungsphase wird während des Wundheilungsprozess durch ein dichtes Netzwerk verschiedenster Mediatoren kommuniziert, in ihrem Ausmaß kontrolliert und zeitlich terminiert [Martin 1997; Werner und Grose 2003; Bryan *et al.* 2005]. Dabei spielen neben typischen Signalproteinen auch andere Substanzklassen eine Rolle. So sind beispielsweise verschiedene Eicosanoide in die Regulation inflammatorischer Prozesse involviert [Tilley *et al.* 2001], wobei bekannt ist, dass das bei Entzündung massiv induzierte Cyclooxygenase (COX)-2-Isoenzym eine zentrale Rolle bei der Synthese proinflammatorischer Prostaglandine einnimmt [Smith *et al.* 1996; Lee *et al.* 2003]. In Studien mit heilungsdefizienten, diabetischen *ob/ob*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die chronische Entzündungssituation in Wunden dieser Tiere durch eine drastische Induktion der COX-2 gekennzeichnet war [Kämpfer *et al.* 2005]. Als ein weiteres, in entzündliche Prozesse involviertes Enzym ist die induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (iNOS) bekannt [Bogdan 2001; Korhonen *et al.* 2005]. In der inflammatorischen Phase der Wundheilung ist dieses Enzym deutlich hochreguliert. Innerhalb des Wundareals gehören neben aktivierten Makrophagen vor allem Keratinozyten des HE zum Pool iNOS-synthetisierender Zellen [Frank *et al.* 1998a/b und 2002].

Zur abschließenden Beurteilung der Entzündungssituation im transgenen Mausmodell sind daher die Expressionskinetiken dieser beiden Enzyme sowie die Lokalisierung iNOS- und COX-2-exprimierender Zellen untersucht worden. Dabei konnte nicht unerwartet in Übereinstimmung mit den bisherigen Daten eine verlängerte Expression von COX-2 und iNOS in den Wunden transgener Tiere detektiert werden, die deutlich über die aus normaler Wundheilung bekannte Expressionsdauer hinaus persistierte (Abb. III.24). Während der COX-2 mRNA-Spiegel in den Wunden nicht-transgener Tiere bereits an Tag 7 nach Verwundung auf das basale Expressionsniveau zurückfiel, blieb er in Wunden transgener Tiere unverändert hoch und hob sich zum siebten Heilungstag signifikant vom Expressionsniveau normal heilender Wunden nicht-transgener Tiere ab. Diese mRNA-Daten konnten auf Proteinniveau bestätigt werden (Abb. III.24 a-c).

Sehr ähnlich stellten sich die mRNA-Expressionsspiegel der iNOS dar, die in Wunden transgener Tiere an den Tagen 5 und 7 nach Verwundung signifikant über dem Spiegel nicht-transgener Wunden lagen (Abb. III.24 d/e). In beiden Genotypen konnte dabei

eine Koregulation zwischen der iNOS und der GTP-Cyclohydrolase (GTP-CH)-1 bestätigt werden, einem Enzym, dass für die *de novo*-Synthese des iNOS-Kofaktors 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (6-BH<sub>4</sub>) essentiell ist und daher einer koregulatorischen Expression unterliegt [Frank *et al.* 1998a]. Abschließend konnte auch für die iNOS gezeigt werden, dass die Proteinkinetik dem mRNA-Expressionsmuster folgt (Abb. III.24 f).



**Abb. III.24: Regulation von COX-2 und iNOS im Heilungsverlauf transgener und nicht-transgener Tiere**

Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3, 12 und 13a wurden verletzt. Die Wunden wurden entnommen und zur Herstellung von Gesamt-RNA aufgearbeitet. (a+d) Jeweils 10µg (COX-2) bzw. 15µg Gesamt-RNA (iNOS/GTP-CH1) wurden in einer RNase-Verdauerschutzanalyse eingesetzt, um die mRNA-Expressionskinetiken der indizierten Enzyme über den Heilungsverlauf zu ermitteln. Dargestellt sind repräsentative Serien der Linie 13a (n=3 Wunden/Zeitwert). Als Größenmarker diente jeweils 1kcpm der Sonde, zur Ladekontrolle wurde GAPDH hybridisiert. Ktrl: unverletzte Haut; d1-d13: Tage 1-13 nach Verletzung. (b+e) Die mRNA-Expression von COX-2 und iNOS wurde für die Tage 5 (d5) und 7 (d7) nach Verwundung statistisch ausgewertet. Jeder Zeitwert repräsentiert 12 Wunden (n=12), je 3 aus 4 verschiedenen Tieren der Linien 3, 12 und 13a. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. n.s. nicht signifikant, p>0,05; \* p<0,05; \*\* p<0,01 (ungepaarter t-Test). PSL: *photon stimulated luminescence* (c+g) Jeweils 50µg Gesamtprotein wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt. Im Immunoblot erfolgte der Nachweis des COX-2- und iNOS-Proteins. Eine Ponceau S-Färbung diente im COX-2-Immunoblot zur Ladekontrolle, im iNOS-Blot wurden beta-Aktin-Spiegel zur Ladekontrolle ermittelt. Dargestellt sind repräsentative Wundserien der Linie 13a (n=2 Wunden/Zeitwert).

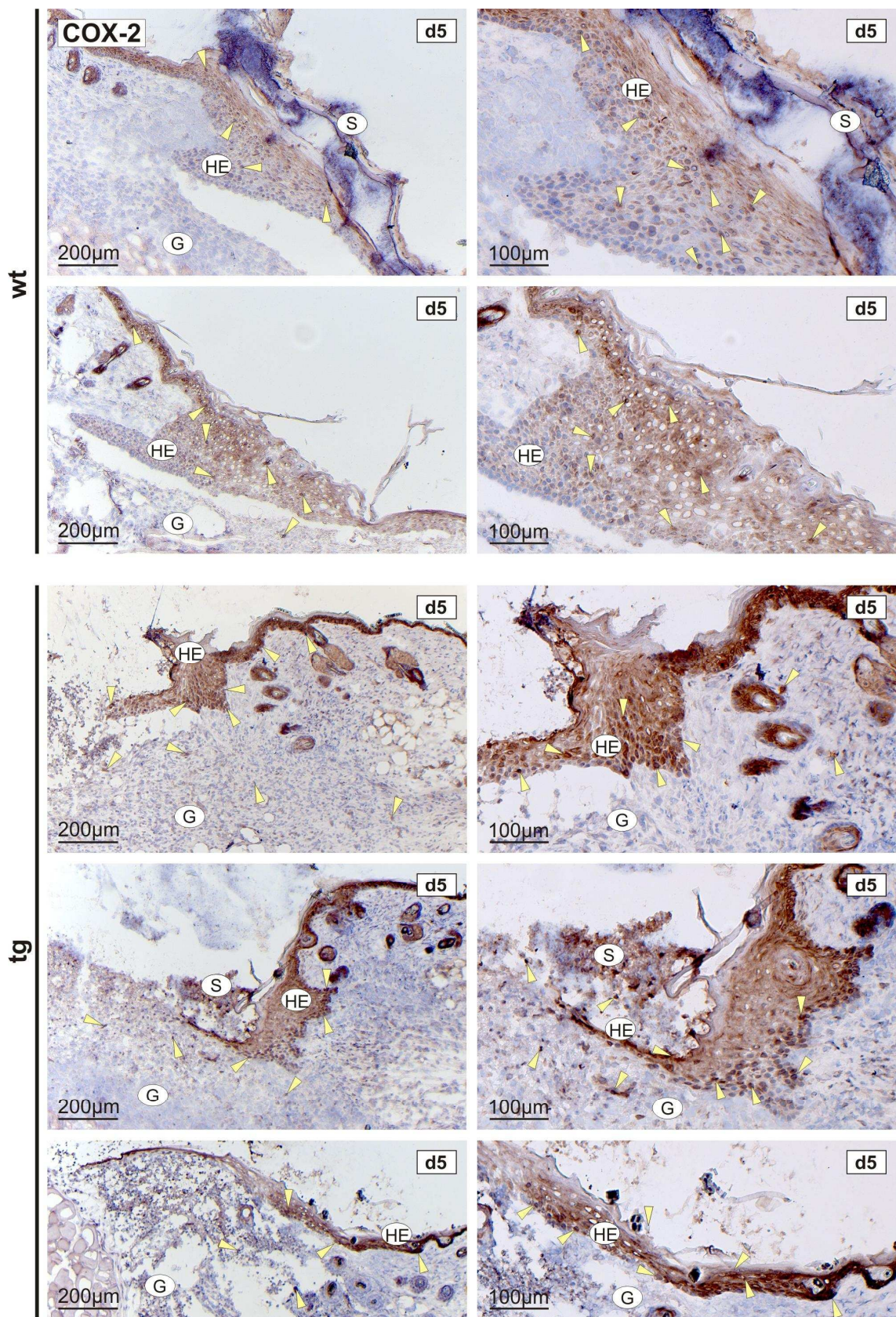
Immunhistochemische Färbungen von Tag 5-Wunden nicht-transgener und transgener Tiere gegen COX-2 und iNOS zeigten, dass neben infiltrierenden Zellen im Granulationsgewebe vor allem Keratinozyten des Wundrandes stark immunpositiv gefärbt waren (Abb. III.25 und Abb. III.26). Dabei fiel in der Färbung gegen COX-2 auf, dass während im HE nicht-transgener Tiere primär suprabasale Zellen deutlich gefärbt waren, die Färbung in Wunden transgener Tiere wesentlich intensiver auch in basalen Zellen des hyperproliferierenden Epithels sichtbar war (Abb. III.25). Dies ist besonders interessant, da bekannt ist, dass das COX-2 Isoenzym in den epidermalen Differenzierungsprozess involviert ist [Evans *et al.* 1993; Neufang *et al.* 2001]. Im Gegensatz dazu konnten in WT-Wunden primär proliferationsaktive basale Keratinozyten positiv gegen die induzierbare NO-Synthase gefärbt werden, wogegen im unterentwickelten HE transgener Wunden auch suprabasale Zellen anfärbbar waren (Abb. III.26). Immunpositive Signale im Granulationsgewebe sind vorwiegend auf infiltrierende Makrophagen und Neutrophile Granulozyten zurückzuführen, die als Hauptproduzenten der iNOS bekannt sind [Frank *et al.* 1998a; Reichner *et al.* 1999].

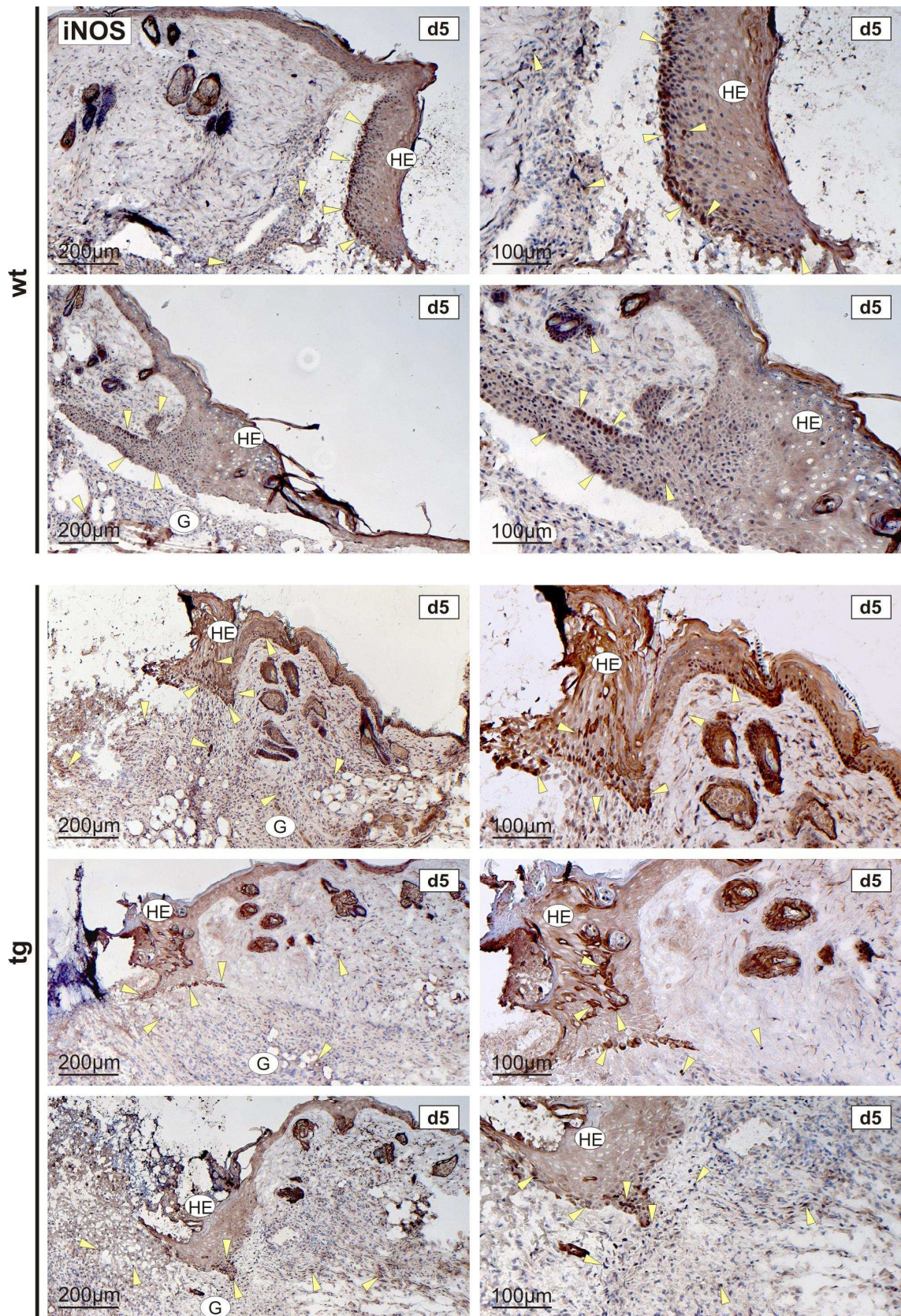
**Abb. III.25: Lokalisierung COX-2 exprimierender Zellen im Wundgewebe nicht-transgener und transgener Tiere 5 Tage nach Verwundung (Seite 108)**

Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3 und 13a wurden verletzt. Fünf Tage nach Verletzung wurden aus den Wunden Gefrierschnitte (8µm) hergestellt, um unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers COX-2-positive Zellen zu identifizieren. Zellkerne wurden zur besseren Kontrastierung mit Hämatoxylin gegengefärbt. Dargestellt sind Aufnahmen der Wundränder (links) und Detailaufnahmen (rechts) der HE repräsentativer Präparate. Pfeile kennzeichnen immunpositive Zellen des hyperproliferierenden Epithels des Granulationsgewebes. HE: hyperproliferierendes Epithel, G: Granulationsgewebe, S: Schorf

**Abb. III.26: Lokalisierung iNOS-exprimierender Zellen in Tag 5-Wunden nicht-transgener und transgener Tiere (Seite 109)**

Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3 und 13a wurden verletzt. Aus 5-Tage-Wunden wurden Gefrierschnitte (8µm) hergestellt, in denen unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers iNOS-exprimierende Zellen lokalisiert wurden. Zellkerne wurden zur besseren Kontrastierung mit Hämatoxylin gegengefärbt. Aufnahmen der Wundränder sind links, Detailaufnahmen der HE auf der rechten Seite dargestellt. Die aufgeführten Fotos zeigen repräsentative Präparate. Pfeile kennzeichnen immunpositive Zellen. HE: hyperproliferierendes Epithel, G: Granulationsgewebe





### 4.3 Die Rolle des Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ in der Wundheilung transgener Tiere

Eine Vielzahl physiologischer Substanzen und Mediatoren ist in die Initiierung und Kontrolle der Entzündungsphase involviert. Einige erweisen sich als Agonisten, andere fungieren als Antagonisten der inflammatorischen Antwort. Dabei geht man davon aus, dass für einen signifikanten Heilungsfortschritt die Wiederauflösung der akuten entzündlichen Phase von essentieller Bedeutung ist. Mehrere Arbeiten verweisen auf einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen einer chronischen Entzündungssituation und gestörter Wundheilung.

Zur Wiederauflösung der Entzündungsphase stehen mehrere Mechanismen in der Diskussion, wobei die Hemmung der Immunzellaktivierung und Herunterregulation der Expression proinflammatorischer und chemotaktischer Zytokine durch klassisch-antiinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-10 und TGF- $\beta$ 1 potente Strategien darstellen [Fadok *et al.* 1998; Sato, Y. *et al.* 1999; Ashcroft *et al.* 1999; Werner *et al.* 2000; Williams *et al.* 2004; Murray 2006].

Interessanterweise werden der Isoform TGF- $\beta$ 1 jedoch auch proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. So sezernieren unmittelbar nach einer Verwundung Blutplättchen immense Mengen an TGF- $\beta$ 1, das als potenter chemotaktischer Faktor Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Fibroblasten in das Wundareal rekrutiert und somit maßgeblich die Entzündungsphase initiiert [Wahl *et al.* 1987, 1993; Wahl 1992, 1994]. Zudem scheint TGF- $\beta$ 1 in der Haut eine Sonderstellung einzunehmen, da in letzter Zeit vermehrt Studien darauf hindeuten, dass in diesem Organ auch proinflammatorische Effekte auftreten können [Liu *et al.* 2001; Li *et al.* 2004; Wang *et al.* 2006]. Unterstützt werden diese Hypothesen durch ältere Arbeiten. So entwickeln beispielsweise TGF- $\beta$ 1-knock out-Mäuse einen multifokal-entzündlichen Phänotyp, der sich jedoch nicht auf die Haut erstreckt [Shull *et al.* 1992; Kulkarni *et al.* 1993].

Unabhängig von den immunregulatorischen Eigenschaften ist die selektiv-mitogene Wirkung auf verschiedene Zelltypen bekannt. TGF- $\beta$ 1 gilt als starkes Mitogen für Fibroblasten, hemmt jedoch gleichzeitig deutlich die Proliferation von Keratinozyten und Endothelzellen. Sowohl in Wundheilungsstudien mit SMAD3-knock out-Tieren, als auch in transgenen Mäusen, die einen dominant-negativen TGF- $\beta$ 1-Rezeptor in der Haut überexprimierten, konnte eine deutlich beschleunigte Reepithelialisierung beob-

achtet werden [Ashcroft *et al.* 1999; Amendt *et al.* 2002]. Aus diesen Gründen war es besonders in Bezug auf die Beobachtungen im generierten genetisch modifizierten Mausmodell interessant, die Expression dieses multifunktionellen Wachstumsfaktors in heilungsdefizienten Wunden transgener Mäuse zu charakterisieren.

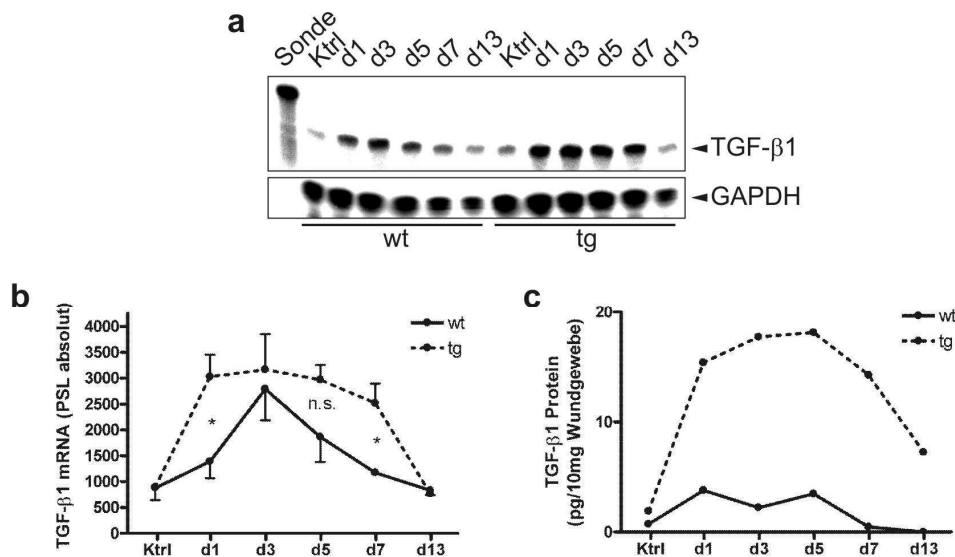
#### **4.3.1 Die Expression des klassischen antiinflammatorischen Zytokins TGF- $\beta$ 1 ist in Wunden transgener Tiere deutlich hochreguliert und folgt der veränderten Kinetik der Entzündungsreaktion**

Zur Untersuchung der TGF- $\beta$ 1-Expressionskinetik sind in Analogie zu den in Kapitel 4.2 untersuchten Entzündungsparametern Gesamt-RNA- und Gesamtproteinlysate aus Wunden erstellt und analysiert worden. Neben der standardisierten Analyse der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression über den gesamten Wundheilungsverlauf stellte sich die Ermittlung des Proteingehalts im Wundlysat als relativ komplex heraus. Zur möglichst quantitativen Solubilisierung hydrophober Proteine sind die extrahierten Wunden zunächst in 4M Guanidinhydrochlorid-Lysispuffer aufgearbeitet und anschließend gegen 0,01M HCL dialysiert worden. Dieser notwendige Schritt hatte jedoch auch zur Folge, dass latent gebundenes TGF- $\beta$ 1 freigesetzt und aktiviert wurde. Weiterhin hat sich herausgestellt, dass ein 20kDa IgG-Bindeprotein mit der ELISA-Messung interferiert, so dass das Dialysat zunächst hydrophilisiert, in ELISA-Puffer rekonstituiert und anschließend mit IgG-Agarose inkubiert werden musste [McDevitt *et al.* 2003]. Erst dann konnte die Messung von TGF- $\beta$ 1 im Sandwich-ELISA erfolgen.

Die Ermittlung der mRNA-Kinetik verlief dagegen problemlos. In zeitlicher Kohärenz zur Entzündungsreaktion konnte eine rasche Induktion der TGF- $\beta$ 1-mRNA-Spiegel mit einem Maximum am 3. Tag nach Verwundung in normal heilenden Wunden nicht-transgener Tiere detektiert werden (Abb. III.27 a/b). Interessanterweise erfolgte die Induktion in transgenen Tieren deutlich schneller. Bereits am ersten Tag nach Verwundung konnte verglichen mit nicht-transgenen Tieren ein 2,2-fach höherer Expressionsspiegel in Wunden transgener Tiere aufgezeigt werden. Bemerkenswert waren weiterhin die über einen großen Zeitraum nahezu konstant hohen Expressionsspiegel an TGF- $\beta$ 1-mRNA in den Wunden heilungsdefizienter Tiere, die selbst am siebten Tag nach Verwundung gegenüber Wunden nicht-transgener Tiere noch signifikant um den Faktor 2,1 erhöht waren. Wesentlich drastischer stellten sich die Expressionsunterschiede zwischen



normal heilenden und heilungsdefizienten Tieren auf Proteinniveau dar. Die analysierten Wunden transgener Tiere zeigten über den gesamten Heilungsverlauf deutlich erhöhte TGF- $\beta$ 1-Spiegel, wobei jedoch hinzuzufügen ist, dass es sich bei den in Abb. III.27c gezeigten Daten um jeweils nur eine Wundserie handelt. Eine statistische Auswertung war somit nicht möglich. Von zusätzlichen Tierversuchen zur Generierung weiterer Serien an Guanidinhydrochlorid-Wundlysaten wurde aus ethischen Gründen abgesehen. Weiterhin ist hinzuzufügen, dass aufgrund der besonderen Probenaufarbeitung vor der Messung im ELISA keine Aussagen zum Anteil an freiem und somit aktivem TGF- $\beta$ 1 am Gesamtgehalt der Wunde getroffen werden können. Dennoch stellte sich die Frage, weshalb trotz derart erhöhter Mengen an TGF- $\beta$ 1 die verzögert heilenden Wunden SOCS3-überexprimierender Mäuse durch eine so massiv erhöhte und persistente Entzündungssituation charakterisiert waren.

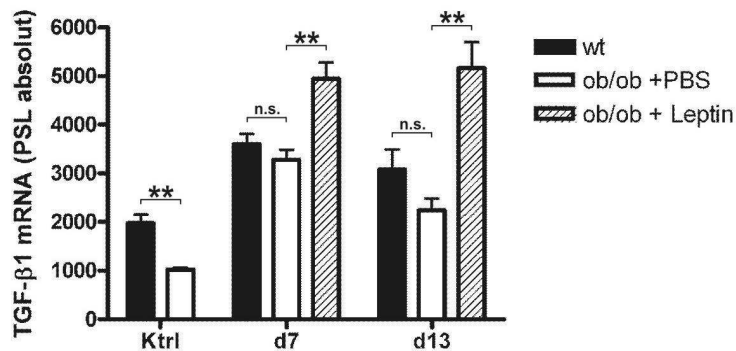


**Abb. III.27: Regulation der TGF- $\beta$ 1-Expression im Verlauf der Wundheilung**

Nicht-transgene Tiere (wt) und transgene Tiere (tg) der Linien 3, 12 und 13a wurden verletzt. **(a+b)** Die Wunden wurden entnommen und zur Herstellung von Gesamt-RNA-Lysat aufgearbeitet. Jeweils 15 $\mu$ g Gesamt-RNA wurden in einer RNase-Verdauerschutzanalyse eingesetzt. In **(a)** ist eine repräsentative Serie der Linie 13a dargestellt (n=3 Wunden/Zeitwert). Als Größenmarker diente 1kcpm der Sonde, zur Ladekontrolle wurde GAPDH hybridisiert. Unter **(b)** wurde die Expressionskinetiken der untersuchten Linien zusammengefasst und statistisch ausgewertet. Jeder Zeitwert entspricht 12 Wunden (n=12), je 3 Wunden aus 4 Tieren. Der Graph setzt sich aus Mittelwerten  $\pm$  SEM zusammen. n.s. nicht signifikant,  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$  (ungepaarter t-Test). PSL: *photon stimulated luminiscence* **(c)** Die Wunden wurden entnommen, gewogen und in 4M Guanidinhydrochlorid-Lysispuffer homogenisiert (10 $\mu$ l/mg Wundgewebe). Das Lysat wurde dialysiert, hydrophilisiert und in RD5-26 ELISA-Puffer rekonstituiert. Nach Neutralisierung des IgG-Bindeproteins wurden 50 $\mu$ l im ELISA eingesetzt. Jeder Messwert entspricht dem TGF- $\beta$ 1-Gehalt jeweils einer Wunde eines nicht-transgenen (wt) oder transgenen (tg) Tieres der Linie 3. Ktrl: unverletzte Haut; d1-d13: Tage 1-13 nach Verletzung.

### 4.3.2 Die Expression von TGF- $\beta$ 1-mRNA in der Spätphase der diabetisch-gestörten Wundheilung Leptin-defizienter *ob/ob*-Mäuse

Bisher konnte gezeigt werden, dass die gezielte epidermale Überexpression des *Suppressor of cytokine signaling 3* zu Wundheilungsstörungen führt, die Parallelen zu denen Leptin-defizienter, diabetischer *ob/ob*-Mäuse aufweisen. Charakteristisch für die gestört ablaufende Heilung im *ob/ob*-Mausmodell waren neben der überschießenden, chronischen Entzündung deutlich erhöhte Expressionsspiegel an SOCS3 in den atrophischen Neopithelien vor allem in späten Heilungsphasen (vgl. Kap. 1.3). Da bislang nur wenig Daten zur Expression von TGF- $\beta$ 1 in heilungsdefizientem Wundgewebe diabetischer *ob/ob*-Mäuse existieren, war es von Interesse, die Expressionsspiegel dieses Zytokins vor allem in den Heilungsphasen zu untersuchen, in denen die epitheliale SOCS3-Expression deutlich erhöht ist (Tag 7 und Tag 13). Möglicherweise bestanden auch in diesem Punkt Parallelen zur Situation im transgenen, SOCS3-überexprimierenden Mausmodell.



**Abb. III.28: TGF- $\beta$ 1-mRNA Expression in Wunden diabetischer *ob/ob*-Mäuse**

WT-Tiere des Stammes C57BL/6J und zwei Versuchsgruppen Leptin-defizienter, diabetischer *ob/ob*-Mäuse wurden verletzt. *ob/ob*-Mäusen einer Versuchsgruppe wurde einmal täglich (Tag 0 bis Tag 13) rekombinantes murines Leptin (2 $\mu$ g/g Körpergewicht in 500 $\mu$ l PBS), der zweiten Kontrollgruppe PBS appliziert. Die Wunden wurden entnommen und zur Herstellung von Gesamt-RNA-Lysat aufgearbeitet. Jeweils 15 $\mu$ g Gesamt-RNA wurden in einer RNase-Verdauungsanalyse eingesetzt, um die TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression in Wunden der Heilungstage 7 und 13 zu untersuchen. Unverletzte Kontrollhaut (Ktrl) diente als Bezugspunkt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Jeder Wert entspricht 9 Wunden (Kontrollhaut, n=9) bzw. 15 Wunden (d7 und d13, n=15) aus 3 bzw. 5 unterschiedlichen Tieren. n.s. nicht signifikant, p>0,05; \*\* p<0,01 (ungepaarter t-Test). PSL: *photon stimulated luminescence*

Die Vermutung, dass auch chronisch-entzündeten Wunden diabetischer *ob/ob*-Mäuse der Heilungstage 7 und 13 erhöhte mRNA-Expressionsspiegel an TGF- $\beta$ 1 aufweisen würden, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Die ermittelten absoluten Mengen an TGF- $\beta$ 1-mRNA wiesen keine signifikanten Unterschiede zu normal heilenden Wunden

aus WT-Tieren auf, in denen die Entzündungsphase bereits abgeschlossen war, wenngleich sie aufgrund des signifikant geringeren Basalspiegels in *ob/ob*-Mäusen noch immer deutlich stärker induziert waren (Abb. III.28).

Möglicherweise waren die verfügbaren Mengen dieses immunregulatorischen Faktors in Wunden der *ob/ob*-Mäuse dennoch zu gering und somit die Ursache für eine ineffiziente Kontrolle der massiven Entzündungsreaktion. Die Supplementierung des fehlenden Leptins durch intraperitoneale Applikation führte nicht nur zu einer in weiten Teilen normalisierten Wundheilung mit kontrollierter Entzündungsphase [Frank *et al.* 2000; Ring *et al.* 2000; Goren *et al.* 2003a], sondern auch zu einer signifikanten Hochregulation der TGF- $\beta$ 1-mRNA Expression (Abb. III.28).

#### **4.3.3 Isolierte primäre Keratinozyten aus transgenen und nicht-transgenen Tieren reagieren auf externes TGF- $\beta$ 1**

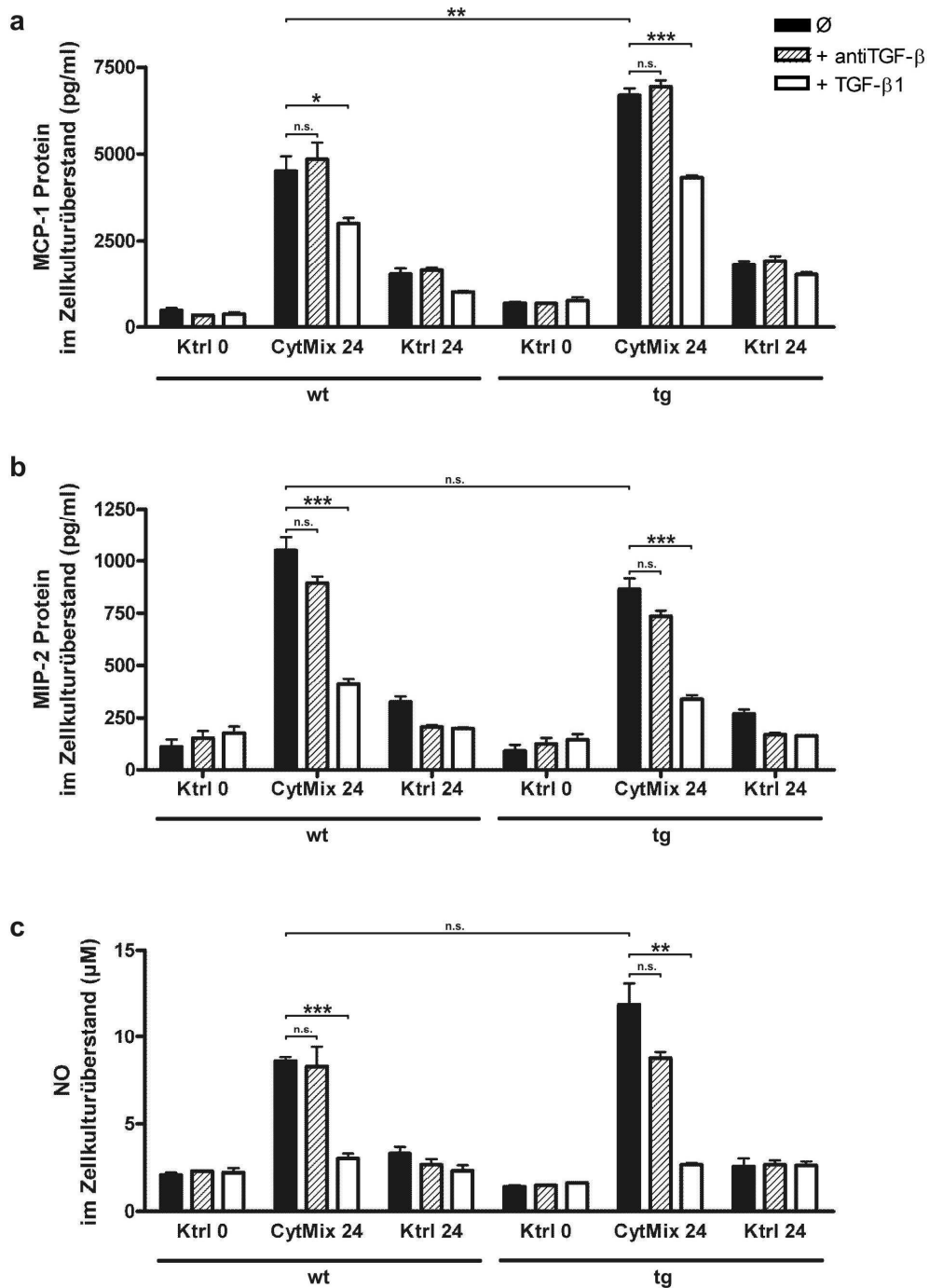
Es konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten des Wundrandes maßgeblich an der Synthese proinflammatorischer Mediatoren und somit an der Initiierung und Aufrechterhaltung der Entzündungsphase beteiligt sind (vgl. Kap. 4.2.2 - 4.2.4). Ebenso ist bekannt, dass Keratinozyten zur Population TGF- $\beta$ 1-synthetisierender Zellen im Wundareal zählen sind [Schmid *et al.* 1993; Frank *et al.* 1996; Theoret *et al.* 2002; Amjad *et al.* 2007]. Aktuelle Studien weisen sogar auf erhöhte TGF- $\beta$ 1-Syntheseraten in Zellen des epidermalen Kompartiments chronischer, diabetischer Ulzerationen hin [Galkowska *et al.* 2006].

Aus diesem Kontext heraus ergaben sich zwei Hypothesen, die zur Erklärung der chronischen Entzündungssituation in Wunden transgener Tiere aufgestellt wurden. Einerseits könnte man ausgehend von einer gegenregulatorischen allgemeinen Hochregulation der TGF- $\beta$ 1-Verfügbarkeit im Wundareal mit dem Ziel der Dämpfung der Entzündungsreaktion postulieren, dass die Empfindlichkeit genetisch veränderter, SOCS3-überexprimierender Keratinozyten gegenüber TGF- $\beta$ 1 herabgesetzt sein könnte - mit der Folge einer Resistenz gegenüber dessen antientzündlichen Eigenschaften. Andererseits wäre in Anbetracht der potenten chemotaktischen Eigenschaften des Wachstumsfaktors denkbar, dass eine unter Umständen gesteigerte TGF- $\beta$ 1-Freisetzung aus transgenen Wundrandkeratinozyten an einer fortdauernden Rekrutierung inflammatorischer Immunzellen in Frage beteiligt sein könnte.

Zur Klärung dieser Fragestellung sind primäre Keratinozyten aus transgenen Mäusen und nicht-transgenen Geschwistertieren der Linie 3 kultiviert und mit einem Mix aus wundheilungsrelevanten, proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) stimuliert worden, um die Sekretion entzündlicher Mediatoren (MCP-1/CCL-2, MIP-2/CXCL-2, NO) in den Zellkulturüberstand zu induzieren. Dazu sind drei verschiedene Versuchsbedingungen definiert worden. Neben der Stimulation mit Zytokinmix (ZM) wurden parallel dazu Zellpopulationen mit einer Kombination aus ZM und TGF- $\beta$ -neutralisierendem Antikörper beziehungsweise mit ZM und rekombinantem TGF- $\beta$ 1 stimuliert.

Durch die Zugabe von ZM konnte sowohl in WT-Zellen als auch in transgenen Keratinozyten die Sekretion der drei untersuchten Entzündungsmediatoren induziert werden, wobei die Konzentration an Stickstoffmonoxid (gemessen als Nitrit) im Überstand SOCS3-überexprimierender Zellen gegenüber WT-Zellen tendenziell und die Konzentration von MCP-1/CCL-2 signifikant erhöht waren (Abb. III.29). Interessanterweise konnte durch den Zusatz des neutralisierenden TGF- $\beta$ -Antikörpers keine weitere Konzentrationserhöhung der untersuchten Signalstoffe im Zellkulturüberstand induziert werden. Dieser Fakt impliziert, dass die isolierten primären Zellen unter den gegebenen Umständen im Zeitraum von 24h wenn überhaupt, dann nur geringe Mengen an TGF- $\beta$  autokrin in das umgebende Medium sezerniert hatten. Die Hypothese einer gesteigerten TGF- $\beta$ 1-Sekretion transgener Keratinozyten konnte somit *in vitro* nicht aufrechterhalten werden.

Dennoch führte der Zusatz von rekombinantem TGF- $\beta$ 1 in allen Fällen signifikant zur Verringerung der ins Medium abgegebenen Mengen proentzündlicher Mediatorstoffe. Sowohl nicht-transgene als auch transgene Keratinozyten reagierten mit vergleichbarer Empfindlichkeit auf externes TGF- $\beta$ 1 mit einer Dämpfung der inflammatorischen Antwort auf die Stimulation mit ZM. Dieser *in vitro* Befund unterstützt somit den antiinflammatorischen Charakter des *Transforming growth factor- $\beta$ 1* auf Keratinozyten.



**Abb. III.29: Kultivierte primäre Keratinozyten sezernieren NO, MCP-1/CCL-2 und MIP-2/CXCL-2 und reagieren auf externes TGF-β1**

Primäre Keratinozyten wurden aus nicht-transgenen (wt) und transgenen (tg) neugeborenen Mäusen im Alter von 1-3 Tagen isoliert und kultiviert. Ab Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurden die Zellen über 24h gehungert und anschließend stimuliert: (i) Zytokinmix (TNF-α 50ng/ml, IFN-γ 20ng/ml, IL-1β 40ng/ml; schwarze Balken), (ii) Zytokinmix plus neutralisierenden anti-TGF-β1, β2 und β3-Antikörper (10µg/ml; gestreifte Balken), (iii) Zytokinmix plus rekombinantes TGF-β1 (5ng/ml; weiße Balken). Nach 24h wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen lysiert. Anschließend wurden im Überstand die Konzentration von (a) MCP-1/CCL-2 und (b) MIP-2/CXCL-2 (ELISA) sowie von (c) NO (gemessen als Nitrit im Griess-Assay) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen. n.s. nicht signifikant, p>0,05; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001(ungepaarter t-Test)

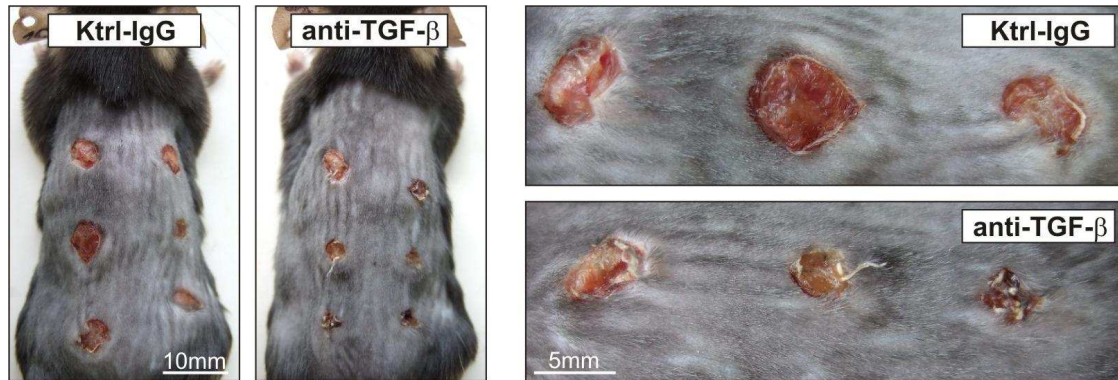
#### **4.3.4 Die Applikation eines neutralisierenden anti-TGF- $\beta$ Antikörpers führt makroskopisch zu einer deutlich verbesserten Wundheilungssituation im transgenen Tier 5 Tage nach Verwundung**

Nachdem die Responsivität sowohl nicht-transgener als auch transgener Keratinozyten auf TGF- $\beta$ 1 im Zellkulturexperiment aufgezeigt werden konnte, stellte sich erneut die Frage nach der Ursache der übermäßig betonten inflammatorischen Antwort im Wundareal transgener Tiere trotz hoher TGF- $\beta$ 1-Expressionsspiegel. Möglicherweise waren die verfügbaren Mengen an TGF- $\beta$ 1 für eine effiziente Kontrolle der Entzündungsreaktion in der Wunde nicht ausreichend. Geringere Mengen hätten im Gegenzug jedoch auch zu einer weitaus dramatischeren Entzündungssituation führen können. Andererseits war der Gehalt tatsächlich frei verfügbaren Wachstumsfaktors noch immer unklar, so dass durchaus die Möglichkeit bestand, dass ein Großteil des im Wundgewebe gemessenen TGF- $\beta$ 1 latent gebunden und somit inaktiv vorlag.

Zur Klärung dieser Fragestellungen sind nicht-transgene und transgene Mäuse der Linien 3 und 13a verwundet worden. Dabei wurde den Tieren beginnend mit dem Tag der Verwundung ein neutralisierender monoklonaler Antikörper gegen die Isoformen TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 einmal täglich i.p. appliziert (2mg/kg Körpergewicht, Klon 1D11). Ausgehend von einer hypothetisch hohen Verfügbarkeit an aktivem TGF- $\beta$ 1 in der Wunde, das die Entzündung jedoch nur begrenzt zu dämpfen vermag, konnten in diesem Versuch einerseits eine potenzierte Inflammation im Wundgewebe transgener Tiere und andererseits atrophische Veränderungen im Granulationsgewebe vermutet werden, die letztlich zu einer deutlich schlechteren Heilungsprognose führen würden. Im Gegensatz dazu sollten die Effekte eher marginal ausfallen, wenn der überwiegende Teil an TGF- $\beta$ 1 latent gebunden und somit inaktiv vorlag. Kontrolltieren beider Gruppen ist ein pharmakologisch irrelevanter, monoklonaler IgG<sub>1</sub>-Kontrollantikörper (Ktrl-IgG; Klon 11711.11) nach identischem Schema injiziert worden. Am 5. Tag nach Verwundung wurden die Tiere getötet und die Wunden extrahiert.

In absolutem Gegensatz zu den Erwartungen konnte nach Neutralisierung von TGF- $\beta$  in transgenen Mäusen bereits nach 5 Heilungstagen makroskopisch ein deutlich verbesserter Heilungszustand festgestellt werden (Abb. III.30). Entsprechend der Wundphänotyp der mit Ktrl-IgG behandelten transgenen Tiere erwartungsgemäß dem äußerlichen Wundbild unbehandelter transgener Tiere (vgl. Abb. III.14 a), war vor allem der sichtbare

Wunddurchmesser anti-TGF- $\beta$ -behandelter transgener Tiere durchaus mit dem normal heilender nicht-transgener Tiere vergleichbar. Innerhalb der Versuchsgruppen nicht-transgener Tiere waren die Unterschiede bis zum 5. Tag nach Verwundung jedoch nur marginal.



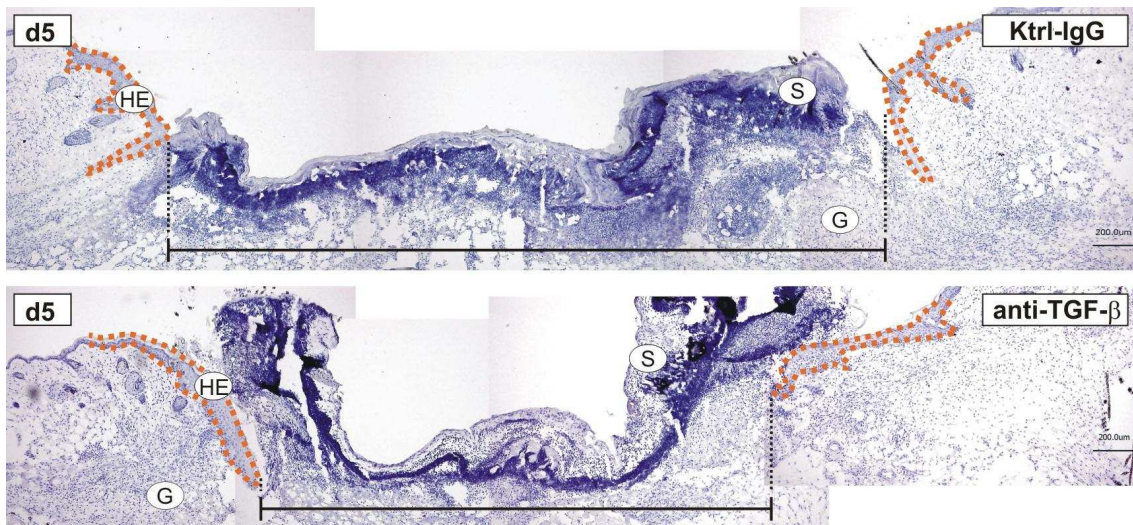
**Abb. III.30: Die systemische Neutralisierung von TGF- $\beta$  beschleunigt die Wundheilung im transgenen Tier**

In den Rücken transgener Tiere wurden 6 Exzisionswunden gesetzt. Dabei wurden 2 Versuchsgruppen gebildet. Einer Gruppe ist täglich, beginnend mit dem Tag der Verwundung bis zum 4. Heilungstag, ein neutralisierender, monoklonaler Antikörper gegen TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 i.p. appliziert worden (anti-TGF- $\beta$ ; Klon 1D11; 2mg/kg Körpergewicht). Tieren der zweiten Gruppe wurde ein pharmakologisch irrelevanter Kontrollantikörper desselben Isotyps injiziert (Ktrl-IgG; Klon 11711.11; 2mg/kg Körpergewicht). Diese Gruppe diente als Kontrollgruppe. Am 5. Tag nach Verwundung wurde der Rücken der Tiere fotografiert. Zu sehen sind links je eine repräsentative Übersichtsaufnahme aus beiden Gruppen (Linie 13a) und rechts die vergrößerte Gegenüberstellung.

Offensichtlich traf keine der eingangs erwähnten Vermutungen zu. Nach der Deutlichkeit der allein makroskopisch sichtbaren Effekte war vielmehr davon auszugehen, dass ein nicht unerheblicher Teil des gemessenen TGF- $\beta$ 1 in der Wunde in aktivierter Form vorliegen sollte, wobei dessen Neutralisierung die Heilungssituation zumindest bis zum 5. Tag nach Verletzung deutlich verbessert. Überwogen im lebenden Organismus letztlich doch die proinflammatorischen Eigenschaften des Wachstumsfaktors oder konnte diese Beobachtung möglicherweise auf eine gesteigerte Reepithelialisierungskapazität zurückgeführt werden, wie sie in einigen Studien mit ähnlichem Ansatz bereits beschrieben ist [Ashcroft *et al.* 1999; Amendt *et al.* 2002]? Im nächsten Schritt sollte daher die Wundmorphologie histologisch untersucht werden.

#### 4.3.5 Die Wunden Antikörper-behandelter transgener Tiere zeigen einen geringeren Wunddurchmesser bei unverändert atrophischen epithelialen Wundrändern

Zur Untersuchung wundmorphologischer Veränderungen sind histologische Präparate angefertigt und zunächst mit Hämatoxylin-Lösung gefärbt worden. Dabei konnten bezüglich der neoepithelialen Wundränder entgegen der Vermutung keine Unterschiede zwischen anti-TGF- $\beta$ - und Ktrl-IgG -behandelten Tieren festgestellt werden. Wie aus vorangegangenen Wundheilungsstudien mit transgenen SOCS3-überexprimierenden Mäusen hervorging (vgl. Abb. III.16), konnten völlig unabhängig von der Antikörperbehandlung ausschließlich unterentwickelte epitheliale Wundränder beobachtet werden (Abb. III.31). Dennoch waren die anti-TGF- $\beta$ -behandelten Wunden im Querschnitt deutlich stärker kontrahiert, die führenden Epithelzungen waren entsprechend weniger weit voneinander entfernt (Pfeile).



**Abb. III.31: Histologischer Wundquerschnitt von Tag-5-Wunden transgener Tiere nach anti-TGF $\beta$ - und Kontroll-IgG-Behandlung**

In den Rücken transgener Tiere zweier Versuchsgruppen wurden Exzisionswunden gesetzt. Einer Gruppe ist täglich, beginnend mit dem Tag der Verwundung bis zum 4. Heilungstag, ein neutralisierender, monoklonaler Antikörper gegen TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 i.p. appliziert worden (anti-TGF- $\beta$ ). Tiere der zweiten Gruppe erhielten einen pharmakologisch-irrelevanten Kontrollantikörper (Ktrl-IgG). Aus Tag 5-Wunden (d5) sind histologische Präparate (8 $\mu$ m) angefertigt und angefärbt worden (Hämatoxylin). Dargestellt sind Übersichtsaufnahmen repräsentativer Wunden (Linie 13a, mediane Schnittebene), die aus mehreren Teilaufnahmen zusammengesetzt sind. Markierungen (orange) kennzeichnen die Epithelzungen, die Balken verweisen auf den Abstand der epithelialen Wundränder. HE: hyperproliferierendes Epithel, G: Granulationsgewebe, S: Schorf.

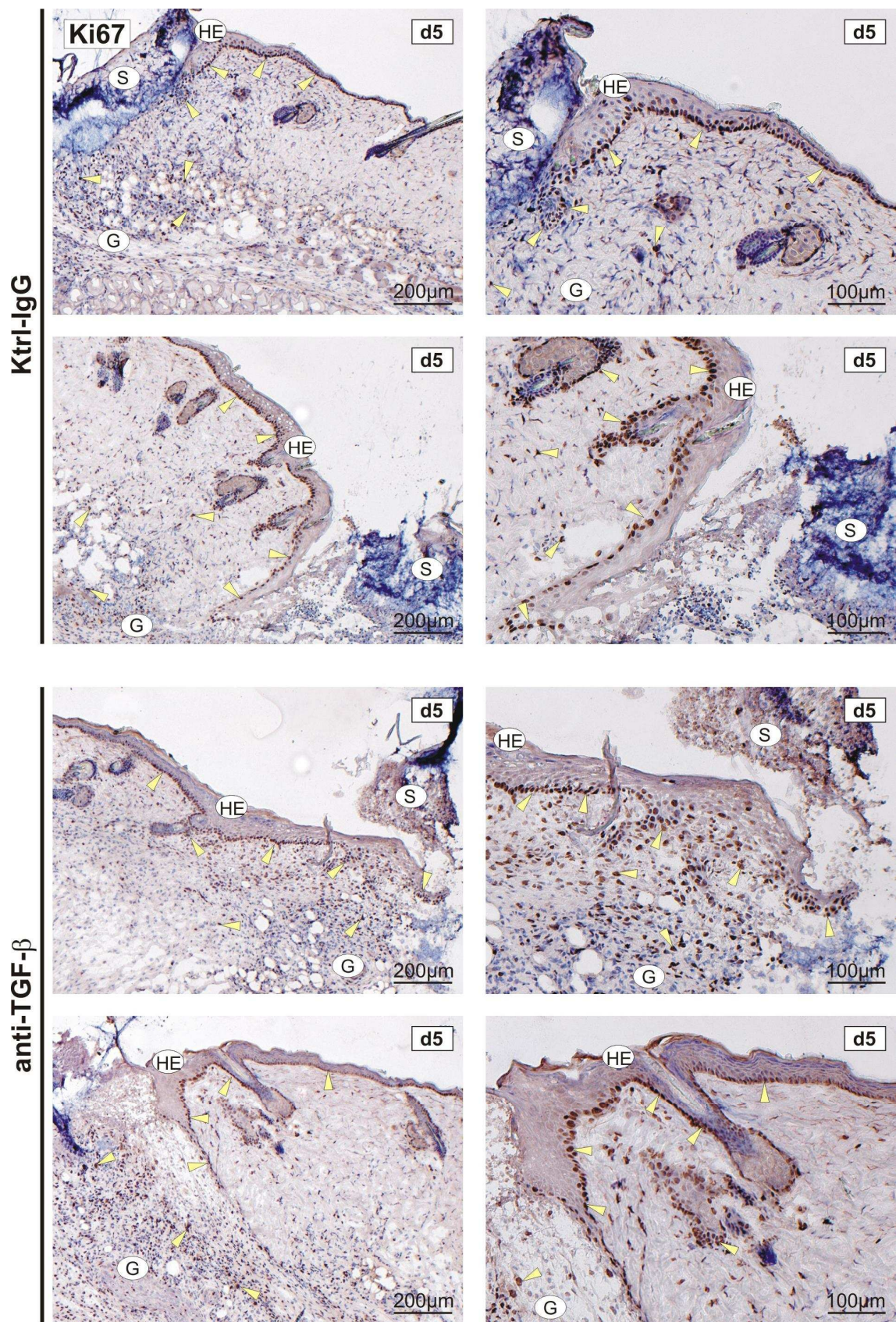
Diese Beobachtungen konnten durch immunhistochemische Färbung der Tag 5-Wunden antikörperbehandelter transgener Tiere gegen den Proliferationsmarker Ki67 bestätigt



werden (Abb. III.32). In Analogie zu den in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Ergebnissen waren im epidermalen Kompartiment vor allem basale und einige suprabasale Zellen der dystrophischen HE und der Haarfollikel positiv gefärbt. Die Anzahl und Verteilung proliferierender Keratinozyten war dabei im transgenen Tier zum untersuchten Zeitpunkt unabhängig von der Art der Antikörperbehandlung.

**Abb. III.32: Immunhistochemische Färbung gegen Ki67 in Tag 5-Wunden antikörperbehandelter transgener Tiere**

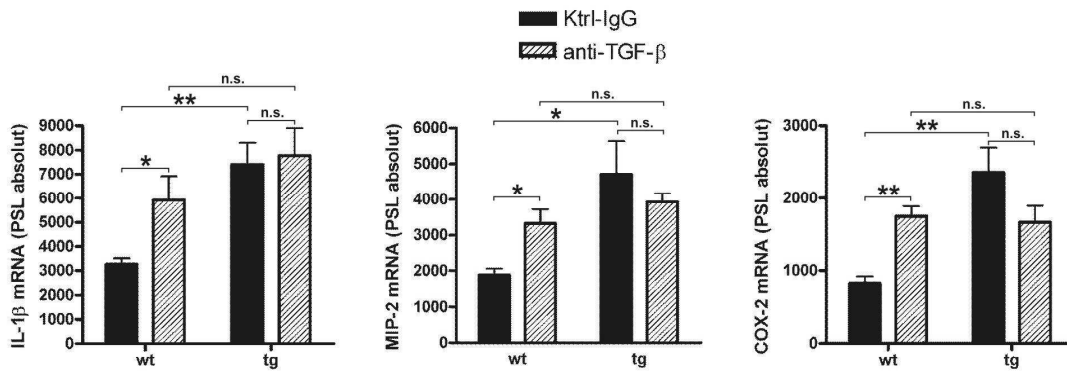
In den Rücken transgener Tiere zweier Versuchsgruppen wurden Exzisionswunden gesetzt. Einer Gruppe ist täglich, beginnend mit dem Tag der Verwundung bis zum 4. Heilungstag, ein neutralisierender, monoklonaler Antikörper gegen TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 i.p. appliziert worden (anti-TGF- $\beta$ ). Tiere der zweiten Gruppe erhielten einen pharmakologisch-irrelevanten Kontrollantikörper (Ktrl-IgG). Aus Tag 5-Wunden (d5) sind histologische Präparate (8 $\mu$ m) angefertigt und immunhistochemisch gegen den Proliferationsmarker Ki67 gefärbt worden. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. Pfeile kennzeichnen stark immunpositiv gefärbte Zellen. Dargestellt sind je zwei repräsentative Beispiele der Wundrandbereiche beider Behandlungsgruppen (linke Seite) und vergrößerte Aufnahmen der HE (rechte Seite) (Linien 3 und 13a).



#### **4.3.6 Im Gegensatz zu nicht-transgenen Tieren bleibt die Entzündungssituation in Wunden transgener Tiere trotz TGF- $\beta$ -Neutralisierung unverändert**

Zur abschließenden Bewertung des Tierversuches und indirekten funktionellen Überprüfung der biologischen Wirksamkeit des applizierten anti-TGF- $\beta$ -Antikörpers ist die Entzündungsreaktion im Wundareal analysiert worden. Wie bereits zu Beginn des Kapitels 4.3 beschrieben werden die immunregulatorischen Eigenschaften des *Transforming growth factor- $\beta$ 1* für bestimmte Phasen der kutanen Wundheilung und deren Konsequenzen für den Heilungserfolg kontrovers diskutiert. Obwohl die Zellkulturergebnisse aus Kapitel 4.3.3 deutlich auf einen entzündungsdämpfenden Phänotyp des Wachstumsfaktors verwiesen, resultierte die systemische Neutralisierung dieses Faktors in einem verbesserten Heilungszustand von Wunden, deren Abheilung ohne immunologischen Eingriff deutlich verzögert und durch überschießende Entzündung charakterisiert wäre. Zur Aufklärung der Entzündungssituation im durchgeführten Tierversuch sind Gesamt-RNA-Wundlysate aus den Wunden erstellt und die mRNA-Expressionsspiegel ausgewählter entzündungsrelevanter Faktoren (IL-1 $\beta$ , MIP-2/CXCL-2, COX-2) analysiert worden. Zusätzlich dazu sind immunhistochemische Färbungen gegen immunzell-spezifische Antigene angefertigt worden, um das Ausmaß infiltrierender neutrophiler Granulozyten und Makrophagen beurteilen zu können.

In Übereinstimmung zu den Ergebnissen aus Kap. 4.2 waren innerhalb der IgG-Kontrollgruppe die mRNA-Spiegel aller untersuchten Entzündungsmarker in den Wunden transgener Tiere deutlich erhöht. Sie unterschieden sich um den Faktor 2-3 signifikant von den Expressionsspiegeln nicht-transgener Vergleichstiere und verwiesen auf die pharmakologische Irrelevanz des injizierten IgG<sub>1</sub>-Kontrollantikörpers. Weiterhin konnte in nicht-transgenen Mäusen eine klare Steigerung der Entzündungsantwort durch Neutralisierung der TGF- $\beta$ -Isoformen induziert werden. Die mRNA-Expression der Entzündungsmarker IL-1 $\beta$ , MIP-2/CXCL-2 und COX-2 war nach TGF- $\beta$ -Neutralisierung signifikant erhöht. Diese Daten sprechen erneut, wenn auch indirekt, für einen allgemein entzündungsdämpfenden Phänotyp der primär immunregulatorisch aktiven TGF- $\beta$ 1-Isoform und bestätigen somit das Ergebnis der aus Keratinozyten generierten *in vitro*-Daten (vgl. Abb. III.29).



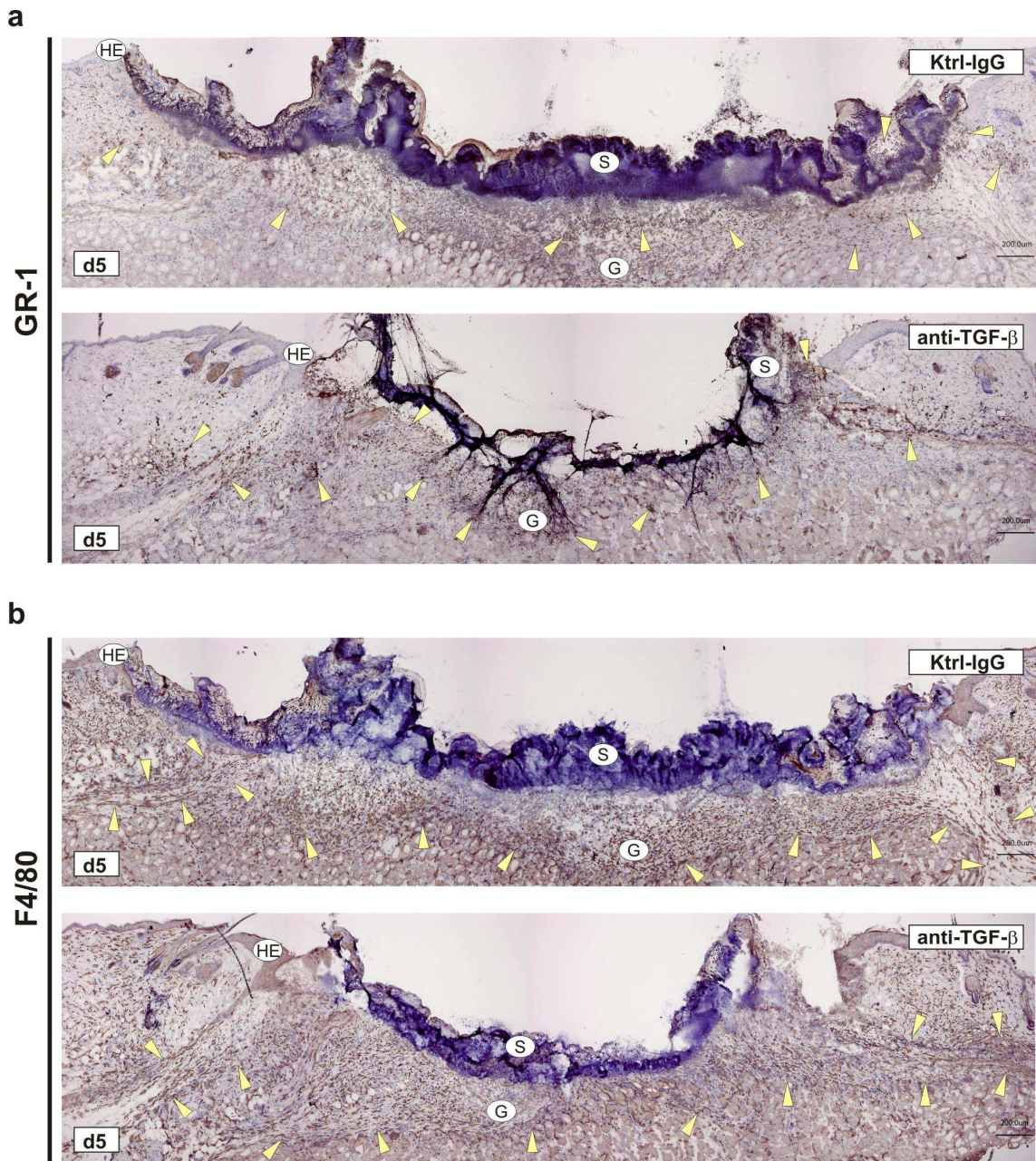
**Abb. III.33: mRNA-Expressionspiegel ausgewählter Entzündungsmarker in Tag 5-Wunden anti-TGF-β und Ktrl-IgG-behandelter Tiere**

Nicht-transgene (wt) und transgene Tiere (tg) wurden verletzt (Linien 3 und 13a). Es wurden je 2 nicht-transgene und 2 transgene Versuchsgruppen gebildet. Je einer Gruppe ist täglich ein neutralisierender, monoklonaler Antikörper gegen TGF-β1, β2 und β3 i.p. appliziert worden (anti-TGF-β). Tiere der jeweils zweiten Gruppe erhielten einen pharmakologisch-irrelevanten Kontrollantikörper (Ktrl-IgG) und bildeten die Kontrollgruppe. Am 5. Tag nach Verletzung sind die Wunden extrahiert und RNA-Gesamtlysat erstellt worden. Unter Verwendung spezifischer antisense-RNA-Sonden sind die mRNA-Expressionspiegel der Entzündungsmarker IL-1β (aus 10µg RNA), MIP-2/CXCL-2 (aus 5µg RNA) und COX-2 (aus 10µg RNA) in den Wunden ermittelt worden. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 12 Wunden (n=12; je 3 aus 4 verschiedenen Tieren).

Wesentlich komplexer war dagegen die Interpretation der mRNA-Daten, die aus Wunden SOCS3-überexprimierender Tiere gewonnen wurden. Im Gegensatz zur Situation in nicht-transgenen Tieren konnte in transgenen Tieren trotz Applikation des TGF-β-neutralisierenden Antikörpers keine Steigerung der mRNA-Spiegel für IL-1β, MIP-2/CXCL-2 und COX-2 induziert werden. Die Entzündungssituation blieb abgesehen von kleineren nicht signifikanten Schwankungen nahezu unbeeinflusst hoch, was theoretisch verschiedene Gründe haben konnte. Begründet durch die Tatsache, dass innerhalb der anti-TGF-β-Gruppe die mRNA-Spiegel der untersuchten Entzündungsmarker jedoch nahezu gleich hoch waren, ist nicht unwahrscheinlich, dass es sich dabei um einen maximal erreichbaren Entzündungszustand handelt, der nicht weiter potenzierbar war. Wesentlich überraschender war jedoch insgesamt betrachtet die Tatsache, dass in heilungsdefizienten transgenen Mäusen die Neutralisierung von TGF-β eine deutliche Verbesserung des Wundheilungszustands im untersuchten Zeitraum von fünf Heilungstagen bedingte - und dies völlig unbeeinflusst von einer nach wie vor massiven Entzündung im Wundgewebe.

Abschließend konnte auch in immunhistochemischen Färbungen gegen die Immunzellmarker GR-1 (PMN) und F4/80 (Mφ) in Tag 5-Wunden transgener Tiere bestätigt werden, dass die inflammatorische Antwort unabhängig vom injizierten Antikörper ver-

gleichbar war (Abb. III.34). Die Zahl und Verteilung immunpositiv gefärbter Zellen wies keine wesentlichen Unterschiede auf.



**Abb. III.34: Immunhistochemische Färbung gegen GR-1 und F4/80 in Tag 5-Wunden anti-TGF-β und Ktrl-IgG behandelter transgener Tiere**

In den Rücken transgener Tiere zweier Versuchsgruppen wurden Exzisionswunden gesetzt. Einer Gruppe ist ein neutralisierender, monoklonaler Antikörper gegen TGF-β1, β2 und β3 appliziert worden (anti-TGF-β). Tiere der zweiten Gruppe erhielten einen pharmakologisch-irrelevanten Kontrollantikörper (Ktrl-IgG). Aus Tag 5-Wunden (d5) sind histologische Präparate (8µm) angefertigt und immunhistochemisch (a) gegen Marker Neutrophiler Granulozyten (GR-1) und (b) gegen das Makrophagenantigen F4/80 gefärbt worden. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. Pfeile kennzeichnen stark immunpositiv gefärbte Zellen. Dargestellt sind repräsentative Übersichtsaufnahmen beider Behandlungsgruppen (Linie 13a), die aus mehreren Einzelaufnahmen zusammengesetzt wurden.

## IV DISKUSSION

### 1 SOCS3 im Wundheilungsprozess stoffwechselgesunder und diabetischer Mäuse

Es ist bekannt, dass die akute Entzündungsphase der ersten Heilungstage neben ihrer Funktion in der Abwehr pathogener Erreger eine unterstützende Rolle in der Initiierung des Heilungsgeschehens und der Regulation von Zellmigration und -proliferation einnimmt [Martin 1997; Singer und Clark 1999]. Infiltrierende Leukozyten und gewebsständige Immunzellen sezernieren gemeinsam mit residenten Zellen (Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen) ein großes Spektrum potenter Zytokine und Wachstumsfaktoren und generieren somit die kommunikative Plattform für komplexe interzelluläre Interaktionen und Regelkreise [Werner und Grose 2003; Park und Barbul 2004; Martin und Leibovich 2005; Eming *et al.* 2007]. In der Vergangenheit konnte jedoch wiederholt aufgezeigt werden, dass ein Entgleisen der inflammatorischen Antwort oft in Assoziation zu chronischen Wundheilungsstörungen steht [Rosner *et al.* 1995; Loots *et al.* 1998; Wetzler *et al.* 2000a; Diegelmann 2003; Goren *et al.* 2003a; Kämpfer *et al.* 2005]. Daher rücken neben Mechanismen, die den Influx und die lokale Präsenz proentzündlicher Zellen regulieren [Wetzler *et al.* 2000a; Gillitzer und Goebeler 2001; Goren *et al.* 2003a], zunehmend Proteine aus der Familie der *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) in den Fokus der Pathogenese chronischer Heilungsstörungen (vgl. Kap. I.4). Mit der Entdeckung von SOCS1 im Jahr 1997 festigte sich das Wissen über diese Proteinfamilie und bestätigt die Vermutung, dass Proteine der SOCS-Familie aufgrund ihrer potenten inhibitorischen Eigenschaften innerhalb der negativen Rückkopplungsschleife des Zytokinsignalwegs eine Schlüsselposition in der intrazellulären Kontrolle der Entzündungsantwort einnehmen [Starr *et al.* 1997; Endo *et al.* 1997; Naka *et al.* 1997; Kubo *et al.* 2003; Wormald und Hilton 2004; Yoshimura *et al.* 2005 und 2007].

Die hohe Relevanz einer stringenten intrazellulären Kontrolle zytokinvermittelter biologischer Prozesse wird in einer Vielzahl verschiedener Arbeiten bestätigt, in denen Veränderungen der Expressionsspiegel von STAT3/ SOCS3 eng mit der Pathophysiologie entzündlicher Erkrankungen wie *Colitis ulcerosa*, *Morbus Crohn* oder rheuma-

toider Arthritis in Verbindung gebracht werden (vgl. Kap. I.4.2) [Suzuki *et al.* 2001; Shouda *et al.* 2001; Lovato *et al.* 2003]. Unterstützung finden diese Erkenntnisse in Arbeiten, in denen eine wirkungsvolle Antagonisierung proinflammatorischer Signalkaskaden durch die Applikation von homologem SOCS3 realisiert werden konnte. So gelang es durch die periartikuläre Injektion eines SOCS3-Adenovirus', den Schweregrad einer kollageninduzierten Arthritis im Mausmodell drastisch zu senken [Shouda *et al.* 2001]. Die Applikation eines membrangängigen SOCS3-Derivates schützte in einem weiteren Tiermodell vor akutem Organversagen, das infolge einer LPS-induzierten, massiven Entzündungsreaktion letal gewesen wäre [Jo *et al.* 2005].

Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass auch die Akutphase des kutanen Wundheilungsprozesses von einer drastischen Induktion des regulatorischen Proteins SOCS3 begleitet wird (Abb. III.1). Diese steht klar in zeitlicher Korrelation zur initialen Entzündungsreaktion und ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Dämpfung der Inflammation beteiligt, deren diskontinuierliche Terminierung eine grundlegende Voraussetzung für den Übergang in die sich anschließende und bereits parallel eingeleitete Heilungsphase darstellt [Martin 1997; Singer und Clark 1999; Falanga 2005].

Entgegen der Annahme, dass vorwiegend infiltrierende Immunzellen als stark Zytokin-responsive Zellen für die ausgeprägte SOCS3-Induktion im Wundareal verantwortlich seien, zeigten sich Keratinozytensubpopulationen der Wundränder als die prädominierende SOCS3-exprimierende Zellpopulation in der Akutphase der Heilung (Abb. III.2). Unterstützt wird diese Beobachtung durch mehrere *in vitro* Studien, in denen diverse heilungsrelevante Mediatoren wie IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\alpha$ , HGF, EGF und NO eine Induktion von SOCS3 in primären humanen und murinen Keratinozyten und in Zellen der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT hervorriefen [Yamasaki *et al.* 2003; Tokumaru *et al.* 2005a; Goren *et al.* 2006a]. Auch konnten in Hautbiopsien von Patienten mit Atopischer Dermatitis erhöhte Expressionsspiegel von SOCS3 in epidermalen Läsionen nachgewiesen werden, was darüber hinaus die postulierte kausale Verbindung zwischen einer SOCS3-Fehlregulation im epidermalen Kompartiment und pathologischen Veränderungen in der Haut bekräftigt [Horiuchi *et al.* 2006; Ekelund *et al.* 2006]. Unter diesem Gesichtspunkt ist besonders interessant, dass auch im diabetisch-gestörten Heilungsverlauf Leptin-defizienter *ob/ob*-Mäuse erhöhte SOCS3-Spiegel in Wundrandkeratinozyten sowie im atrophischen Neoepithel detektiert werden konn-

ten, die im völligen Gegensatz zum Heilungsgeschehen stoffwechselgesunder Tiere bis in späte Heilungsphasen deutlich erhöht blieben (Abb. III.3). Es ist bekannt, dass chronische Wundheilungsstörungen in diabetischen *db/db*- und *ob/ob*-Mäusen von einer verstärkten und lang anhaltenden Entzündung begleitet werden, die durch eine erhöhte Persistenz Neutrophiler Granulozyten und Makrophagen charakterisiert ist [Wetzler *et al.* 2000a; Kämpfer *et al.* 2005; Goren *et al.* 2003a, 2006b und 2007]. Diese Immunzellen repräsentieren im Wundareal die Hauptquelle proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IL-6 [DiPietro 1995; Feiken *et al.* 1995; Hübner *et al.* 1996]. Es ist daher anzunehmen, dass zwischen einer erhöhten und verlängerten Präsenz proentzündlicher Mediatoren und der beobachteten erhöhten Expression von SOCS3 ein kausaler Zusammenhang besteht, zumal die Substitution des fehlenden Leptins in der *ob/ob*-Maus neben einer deutlichen Verbesserung der Heilungssituation auch zu einer Dämpfung der Entzündungsreaktion führte, die von einer Normalisierung der SOCS3-Expression im Wundareal begleitet wurde [Frank *et al.* 2000; Goren *et al.* 2003a]. Letztlich verweisen bereits die in der Initialphase dieser Arbeit erhobenen Daten auf eine erhöhte Relevanz des *suppressor of cytokine signaling 3* für die Regulation der entzündlichen Akutphase des Heilungsprozesses. Sie implizieren darüber hinaus eine mögliche Schlüsselposition des Proteins in der Kausalkette pathogener Veränderungen, die in der Genese chronischer Wundheilungsstörungen von Bedeutung sein könnten. Inwiefern dies letztlich der Fall ist, soll in Kapitel IV .3 anhand weiterer Daten diskutiert werden.

## **2 Das transgene Mausmodell: organspezifische SOCS3-Expression in basalen Keratinozyten**

### **2.1 Transgene Mäuse als Modellsysteme der biomedizinischen Forschung**

In der vorliegenden Arbeit ist auf Basis der Pronukleusinjektionstechnik erfolgreich ein transgenes Mausmodell etabliert worden, das nach dem *gain of function*-Prinzip SOCS3 in basalen Keratinozyten überexprimiert. Zur Klonierung des transgenen Konstruktes wurde dabei auf einen Vektor zurückgegriffen, der bereits die Promotorsequenz sowie das Splice- und Polyadenylierungssignal des bovinen Zytokeratin 5-Gens trug (Abb. III.4), wobei die Frage nach der biologischen Aktivität des bovinen Keratinpromotors



im murinen Organismus bereits positiv beantwortet werden konnte [Casatorres *et al.* 1994; Ramirez *et al.* 1994]. Darüber hinaus ist es mehrfach gelungen, unter Verwendung dieser Expressionskassette transgene Mäuse zu generieren, die als Basis ähnlich angelegter Wundheilungsstudien erfolgreich eingesetzt wurden [Mann *et al.* 2001; Amendt *et al.* 2002; Rico *et al.* 2005].

Die verwendete Methodik der Pronukleusinjektion stellt zwar die älteste, aber dennoch eine noch immer häufig eingesetzte Verfahrensweise dar, deren Vorteile in einer mehr als 20-jährigen Erfahrung und einem relativ geringen Klonierungsaufwand liegen. Ein bedeutender Nachteil liegt jedoch in der unvorhersehbaren randomisierten Integration des Transgens in variabler Kopienzahl, womit Positionseffekte nicht auszuschließen sind [Rülicke und Hübscher 2000; Wall 2001]. Um dennoch reproduzierbare Daten generieren zu können, sind insgesamt vier transgene Linien etabliert worden, wobei jede Linie *per definitionem* auf ein eigenes Foundertier zurückführt (Abb. III.6). Darüber hinaus wurden zwei verschiedene Inzuchtstämme (FVB/N und C57BL/6) als genetische Hintergründe gewählt, um die genetische Variabilität innerhalb des Tiermodells zumindest etwas zu streuen.

Auch wenn tierexperimentelle Studien mit genetisch modifizierten Mausmodellen in der biomedizinischen Forschung weit verbreitet sind, stellt sich grundsätzlich die Frage nach der Übertragbarkeit des verwendeten Modells auf das letztlich fokussierte humane Krankheitsbild. Es ist bekannt, dass das Mausgenom aufgrund einer geringeren Zahl repetitiver Sequenzen ca. 10% kleiner als das humane Genom ist [Mural *et al.* 2002]. Dennoch konnten Wissenschaftler des Unternehmens *Celera Genomics* vor wenigen Jahren eine beeindruckend hohe Übereinstimmungsrate der Gene des Mausechromosoms 16 und Chromosomen des humanen Genoms (3, 8, 12, 16, 21, 22) feststellen [Mural *et al.* 2002]. Von 731 Genen des murinen Chromosoms 16 konnten nur 14 nicht im menschlichen Chromosomensatz detektiert werden. Diese Erkenntnis spricht letztlich für die Labormaus als ein durchaus geeigneter Kompromiss auf der Suche nach einem Modelltiersystem mit geringen Haltungsansprüchen und gleichzeitig hoher Reproduktivität. Als lebender Organismus ermöglicht es letztlich einen wesentlich tieferen Einblick in die Funktionsweise eines komplexen biologischen Systems und besitzt daher gegenüber *in vitro*-Studien an isolierten kultivierten Zellen eine deutlich gesteigerte Aussagekraft.

## 2.2 Geno- und Phänotypisierung

### 2.2.1 Genotypisierung der transgenen Linien

Neben dem DotBlot-Verfahren stellt der Southern Blot die Methode der Wahl dar, auf deren Basis zuverlässig Aussagen zur Transgenität der Foundertiere getroffen werden können. Im Idealfall erhält man zusätzlich zum Genotyp Kenntnis über die ungefähre Zahl der integrierten Kopien und Hinweise zur Zahl der Integrationsorte sowie zur Orientierung so genannter *tandem-repeats* [Schneider und Wolf 2005]. In der vorliegenden Arbeit ist zur Bestimmung des Genotyps der Foundertiere ein Southern Blot durchgeführt worden, der durch eine PCR-Analyse unterstützt wurde (Abb. III.5). Leider war die Aussagekraft des durchgeführten Southern Blot limitiert, was wahrscheinlich auf eine begrenzte Empfindlichkeit der Sonde und eine nicht optimale Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel zurückzuführen ist. So kann die Zahl der integrierten Kopien nur abgeschätzt werden, da ausschließlich aus der Positivkontrolle, die sich aus 1ng *pBKS(+)**K5-SOCS3* ergab (ca. 100 Kopien), ein deutliches Signal resultierte. Bekanntlich steht jedoch die Zahl der Kopien nicht in Korrelation mit dem Ausmaß der Transgenexpression [Rülicke und Hübscher 2000], so dass detaillierte Informationen zur Kopienzahl von geringerer Relevanz sind.

Weiterhin konnte aufgrund des Fehlens so genannter *flanking bands* keine Aussage zur Zahl der Integrationsorte getroffen werden. Aufgrund des Transgentransmissionsmusters zwischen F1 und F4, das jeweils nahe an der nach Mendel zu erwartenden Häufigkeit von 50% lag, kann dennoch mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es bei den später verwendeten Linien 3, 8, 12 und 13a jeweils nur einen Integrationsort gab.

### 2.2.2 Charakterisierung der Transgenexpression

Aus den 14 Transgen-positiven Foundertieren wurden vier fertile, hemizygot-transgene Linien etabliert. Somit ist offensichtlich im Gegensatz zum systemischen SOCS3-Knockout weder der konditionelle epidermale Verlust des SOCS3-Gens, noch die epidermale Überexpression von SOCS3 letal [Roberts *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2008]. Des Weiteren wies keine der etablierten Linien morphologische Anomalien oder atypische Verhaltensmuster auf, die auf mögliche Insertionsmutationen hindeuten könnten. In

Analogie zur Haut konditioneller Keratin 5-*Cre*-vermittelter STAT3-Knockout-Mäuse entwickelte sich die Haut transgener Tiere normal (Abb. III.8) [Sano *et al.* 1999]. Ulzerationen und Störungen des Haarzyklus, wie sie im STAT3-Knockout-Tier ab der zweiten anagenen Phase beobachtet wurden, waren jedoch nicht zu verzeichnen [Sano *et al.* 1999]. Initiale mRNA-Expressionsstudien in Tieren der F2-Generation der Linien 3 (FVB/N) und 13a (C57BL/6) zeigten anhand markierter *antisense*-Sonden, die im Übergangsbereich von der kodierenden Sequenz zur 3'-UTR hybridisieren, eine deutliche SOCS3-Überexpression in der Haut transgener Tiere (Abb. III.7). Dabei ist zu vernachlässigen, dass die verwendete Sonde neben Transkripten des Transgens auch endogene SOCS3-mRNA detektiert, da bekannt ist, dass SOCS3 einer engen transkriptionellen Regulation unterliegt [Krebs und Hilton 2000; Greenhalgh und Hilton 2001]. Der basale Spiegel in der Haut nicht-transgener Tiere fiel folglich deutlich geringer aus und befand sich nahe an der Detektionsgrenze des Assays, was sich mit Erkenntnissen aus *in vitro*-Studien in primären Mauskeratinozyten und der HaCaT-Zelllinie deckt [Goren *et al.* 2006a]. In Übereinstimmung mit publizierten Daten zur Keratin 5-Expression und einer Arbeit, in der auf Basis desselben Promotors transgene Mäuse generiert wurden, konnten leicht erhöhte mRNA-Spiegel auch in Lunge und Milz detektiert werden (Abb. III.7) [Moll *et al.* 1982; Starr *et al.* 1997; Neufang *et al.* 2001; Rico *et al.* 2005]. Minimal erhöhte Spiegel im ZNS finden jedoch bislang keine Bestätigung in der Literatur.

Im Western Blot und anhand immunhistochemischer Färbungen der Rückenhaut neugeborener Mäuse sowie adulter Schwanzhaut konnte nachgewiesen werden, dass das mRNA-Transkript des Transgens tatsächlich in ein Protein übersetzt wird, welches mit ca. 30kDa dem zu erwartenden Molekulargewicht und letztlich dem der Positivkontrolle (HEK-Zellen, transfiziert mit muriner SOCS3-cDNA) entspricht (Abb. III.7). Zumindest wiesen ausschließlich Proben, in denen hohe SOCS3-mRNA-Mengen detektiert wurden, ebenso deutlich erhöhte Mengen an SOCS3-Protein auf. Das fast vollständige Ausbleiben einer STAT3-Aktivierung in isolierten transgenen primären Keratinozyten bewies letztlich die biologische Aktivität des transgenen Produktes, da SOCS3 als negativer Regulator der IL-6/gp130-vermittelten STAT3-Phosphorylierung hinreichend bekannt ist (Abb. III.10) [Yamasaki *et al.* 2003; Goren *et al.* 2006a; Zhang *et al.* 2006; Zhu *et al.* 2008]. Darüber hinaus konnten in transgenen Tieren verschiedener Linien

ausschließlich Zellen des epidermalen Kompartiments sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene als stark SOCS3-exprimierende Zellen identifiziert werden, was sich sehr gut mit dem zu erwartenden Expressionsschema und bereits publizierten Daten deckt (Abb. III.7/ Abb. III.8) [Amendt *et al.* 2002; Neufang *et al.* 2001; Cataisson *et al.* 2003].

### **3 Eine persistente Entzündungsreaktion als Merkmal einer gestörten Wundheilung: kausal, sekundär oder epiphänomenal?**

Eine akute Entzündungsreaktion während der Initialphase der kutanen Wundheilung gilt als logische Konsequenz einer Schädigung des Hautgewebes und wird zudem als wichtiger integraler Bestandteil des Heilungsgeschehens aufgefasst. Dabei wurde ihre physiologische Bedeutung in der Vergangenheit zunächst auf eine adäquate Erregerabwehr reduziert, um später die Hypothese aufzustellen, die unter maßgeblicher Beteiligung infiltrierender Immunzellen initiierte akute Entzündungsphase sei von essentieller Bedeutung für die Koordination heilungsrelevanter Prozesse (vgl. Kap. I.2.1) [DiPietro 1995a; Martin 1997; Singer und Clark 1999; Eming *et al.* 2007]. Allerdings scheint es dennoch berechtigt, die uneingeschränkte Gültigkeit dieser Auffassung in Frage zu stellen. So existieren einerseits mehrere Arbeiten, aus denen eindrucksvoll hervorgeht, dass in immunzelldefizienten oder stark immunzellsupprimierten Wunden ein Heilungserfolg keinesfalls zwangsläufig verzögert eintreten oder gar ausbleiben muss [Simpson und Ross 1972; Mori *et al.* 2002; Dovi *et al.* 2003; Martin *et al.* 2003]. Teilweise konnte nach systemischer Neutralisierung neutrophiler Granulozyten sogar eine drastische Beschleunigung der Reepithelialisierung beobachtet werden [Dovi *et al.* 2003]. Andererseits ist eine überschießende Entzündungsreaktion, die durch die Persistenz von Neutrophilen und mononukleären Zellen im Wundareal gekennzeichnet ist, sowohl im murinen als auch im humanen Organismus ein typisches Charakteristikum chronischer Wundheilungsstörungen (vgl. Kap. I.3) [Rosner *et al.* 1995; Loots *et al.* 1998; Wetzler *et al.* 2000a; Goren *et al.* 2003a; Diegelmann 2003]. Daraus folgt, dass das Wesen der Entzündungsantwort oft als janusköpfig beschrieben wird. Bemerkenswert ist, dass bislang trotz der zahlreichen Arbeiten, die auf einen destruktiven Grundcharakter einer chronifizierten Entzündung hinweisen, nur unzureichend geklärt ist, ob eine unkontrollierte Inflammation als Ursache oder Folge der Heilungsstörung zu werten ist.

Zusätzlich zu den bereits bekannten Charakteristika einer überschießenden Entzündung konnte in der vorliegenden Arbeit auf ein weiteres Merkmal heilungsdefizienter, diabetischer Wunden im insulinresistenten *ob/ob*-Mausmodell aufmerksam gemacht werden, welches sehr wahrscheinlich eine Schlüsselposition in der Ätiologie diabetischer Wundheilungsstörungen im Tiermodell einnimmt: Im Gegensatz zu stoffwechselgesunden Mäusen zeigten heilungsdefiziente Wunden diabetischer *ob/ob*-Mäuse eine deutlich verlängerte Expression von SOCS3, die sich nahezu ausschließlich auf Keratinozyten der unterentwickelten Epithelränder und der dystrophen Neopidermis zurückführen ließ (Abb. III.3). Basierend auf *in vitro*- und *in vivo*-Erkenntnissen, die SOCS3 als ein mit der Keratinozytenproliferation interferierendes Protein beschreiben [Goren *et al.* 2006a; Abb. III.2 ] sowie der Tatsache, dass Wundrandkeratinozyten aktiv in die Bereitstellung proentzündlicher Mediatoren involviert sind [Wetzler *et al.* 2000a/b; Gillitzer und Goebeler 2001; Goren *et al.* 2003a; Benoit *et al.* 2004; Cataisson *et al.* 2006; Tokura *et al.* 2008], ergaben sich zwei grundlegende Fragenkomplexe. Diese sollten helfen, die Rolle von SOCS3 in der Pathophysiologie diabetischer Wunden zu erörtern und zu verstehen:

1. Ist die in Wundrandkeratinozyten anhaltend erhöhte Expression von SOCS3 möglicherweise ein zentraler Baustein in der Pathogenese diabetischer Heilungsstörungen - und zwar eigenständig und unabhängig vom insulinresistenten Phänotyp der *ob/ob*-Maus? Wenn ja, wirkt sich dann eine SOCS3-Überexpression in Wundrandkeratinozyten stoffwechselgesunder Tiere im Bezug auf das Heilungsverhalten ähnlich aus?
2. Führt eine Dysbalance der intrazellulären SOCS3-Expression in Wundrandkeratinozyten der *ob/ob*-Maus unter Umständen direkt zu einer Modifizierung des Keratinozytenphänotyps hin zu einer proinflammatorisch-polarisierten Zelle, die in Folge maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses partizipiert oder ergibt sich die überschießende Inflammation sekundär aus einer gestörten und dadurch verzögerten Reepithelialisierung des Wundareals?

### 3.1 Die Wundheilungssituation im transgenen Mausmodell: Parallelen zu Merkmalen heilungsdefizienter diabetischer Wunden

Bezug nehmend auf den ersten Fragenkomplex konnte anhand des transgenen Mausmodells tatsächlich aufgezeigt werden, dass allein eine restriktive, epidermale Überexpression von SOCS3 in einer ansonsten stoffwechselgesunden Maus genügte, um einen Wundphänotyp zu erzwingen, der deutliche Parallelen zum Wundbild einer insulinresistenten *ob/ob*-Maus aufwies. So zeigten sich ähnlich der Morphologie diabetischer Wunden bereits am fünften Heilungstag deutliche Unterschiede in der Größe des HE transgener Tiere verglichen mit dem der Wildtyp-Geschwister (Abb. III.15/ Abb. III.16). Die absolute Keratinozytenzahl im HE transgener Mäuse war wie auch die Zahl BrdU-positiver Keratinozyten im HE dieser Tiere signifikant geringer und wies damit klar auf dystrophe Verhältnisse im Epithelrand hin (Abb. III.15/ Abb. III.17). Sich anschließende *in vitro*-Studien belegten auf der Basis isolierter primärer muriner Keratinozyten eine Reduktion der Zellteilungsaktivität konstitutiv-SOCS3-exprimierender Zellen um bis zu 43% und bestätigten somit Daten aus HaCaT-Keratinozyten (Abb. III.11) [Goren *et al.* 2006a]. In der Konsequenz verzögerte sich der Wundschluss in SOCS3-überexprimierenden Tieren gegenüber nicht-transgenen Geschwistertieren, deren Wunden bereits am siebten Tag nach Verletzung nahezu vollständig reepithelialisiert waren (Abb. III.14). Darüber hinaus konnte in TgN(K5SOCS3)-Mäusen eine verstärkte und lang anhaltende Präsenz neutrophiler Granulozyten und Makrophagen für den gestörten Heilungsverlauf attestiert werden (Abb. III.22/ Abb. III.23). Die Zahl der Neutrophilen blieb sogar bis zum siebten Heilungstag signifikant erhöht und spiegelte damit eine Situation wider, die erneut mit dem Erscheinungsbild heilungsdefizienter Wunden diabetischer Mäuse vergleichbar ist [Wetzler *et al.* 2000a; Goren *et al.* 2003a]. In Folge dessen war auch die Expression der prototypischen Entzündungsmarker Cyclooxygenase (COX)-2 und induzierbare NO-Synthase (iNOS) bis in späte Heilungsphasen signifikant erhöht, was die Existenz einer überzogenen inflammatorischen Antwort in den deutlich verzögert abheilenden Wunden transgener Mäuse zusätzlich bestätigt (Abb. III.24). Auffällig war die unterschiedliche Lokalisation COX-2-exprimierender Subpopulationen von Keratinozyten im HE transgener und nicht-transgener Mäuse. Die deutlich erhöhte Expression in basalen und suprabasalen SOCS3-überexprimierenden Keratino-

zyten könnte als zusätzliches Indiz einer vorzeitig initiierten Differenzierung gewertet werden, die jede weitere Zellteilung ausschließt, wenngleich aus Studien, die das COX-2-Isoenzym klar mit dem Differenzierungsprozess in Verbindung bringen, leicht kontroverse Erkenntnisse hervorgegangen sind [Evans *et al.* 1993; Neufang *et al.* 2001].

Es ist bereits mehrfach erwähnt worden, dass infiltrierende Leukozyten potente Produzenten proinflammatorischer Zytokine darstellen [DiPietro 1995; Hübner *et al.* 1996]. Dementsprechend folgte die Expressionskinetik der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in den Wunden transgener Tiere der verlängerten Präsenz der Immunzellen (Abb. III.18) und fügt sich - wie auch die verlängerte Verfügbarkeit chemotaktischer Zytokine (Abb. III.19) - weiter in das Gesamtbild einer fehlregulierten Inflammation ein, wie es von diabetisch-chronischen Wunden im Mausmodell bekannt ist. Dabei ist anzumerken, dass eine korrekte Bestimmung der Proteinkonzentration der Zytokine und Chemokine stark vom Vorhandensein des Wundschorfes auf der Wunde abhängig ist und durch einen Verlust desselben deutlich limitiert wird, da die Mehrheit neutrophiler Granulozyten im Schorf zu finden ist [Goren *et al.* 2003a].

Es kann somit zusammengefasst werden, dass eine erhöhte SOCS3-Expression in Keratinozyten auch in stoffwechselgesunden Mäusen zu einer Verzögerung der kutanen Wundheilung führt, wobei sich das Wundbild transgener Tiere durch Merkmale auszeichnet, die in ähnlicher Form für heilungsdefiziente chronische Wunden beschrieben sind. Dazu zählt die verlängerte und erhöhte Präsenz neutrophiler Granulozyten und Makrophagen sowie proinflammatorischer Mediatoren, die das typische Erscheinungsbild einer pathologisch-überschießenden Entzündungsreaktion vervollständigen. Zu klären bleibt nun die Frage nach der funktionellen Verknüpfung zwischen dem Transgen und dem Wundphänotyp, deren Mechanismus sich möglicherweise auf die Pathogenese der Heilungsstörung in der *ob/ob*-Maus übertragen lässt:

1. Existiert eine direkte Verbindung zwischen einer anhaltend erhöhten Verfügbarkeit von SOCS3 in Wundrandkeratinozyten und einer möglicherweise potenzierten Sekretionsleistung proinflammatorischer Mediatoren dieser Zellen?
2. Ergibt sich die überschießende Entzündung sekundär aus dem Defizit in der Reepithelialisierung transgener Wunden?

### 3.2 Die Entzündung als direkte Folge eines modifizierten Keratinozytenphänotyps?

Bekanntlich sind Keratinozyten maßgeblich an der Sekretion chemotaktischer Zytokine im Wundareal beteiligt, was in dieser Arbeit zweifelsfrei bestätigt werden konnte (Abb. III.20/ Abb. III.21/ Abb. III.29) [Wetzler *et al.* 2000a/b; Gillitzer und Goebeler 2001; Goren *et al.* 2003a; Benoit *et al.* 2004; Cataisson *et al.* 2006; Tokura *et al.* 2008]. Nach Auswertung der immunhistochemischen Färbungen (Abb. III.19 bis Abb. III.21) ergab sich für SOCS3-überexprimierende Wundrandkeratinozyten tatsächlich eine kritische Rolle bezüglich ihrer Potenz zur Aufrechterhaltung des Entzündungsgeschehens, denn trotz der um ein Vielfaches geringeren absoluten Zellzahl im HE transgener Wunden waren die MCP-1/ CCL-2 und MIP-2/CXCL-2-mRNA-Spiegel im Vergleich zur normal heilenden Wunde erhöht, was auf eine deutlich erhöhte Syntheseleistung transgener Keratinozyten zurückgeführt werden könnte. Obwohl SOCS3 als negativer Regulator einer exzessiven proentzündlichen Signaltransduktion bekannt ist, war nicht auszuschließen, dass eine anhaltende Fehlregulation der SOCS3-Expression eine modifizierte proinflammatorische Responsivität hervorrufen könnte. Möglich wäre zum Beispiel, dass langfristig pathologisch-erhöhte SOCS3-Spiegel die sensible Balance der Regulation inflammatorischer Signalkaskaden stören könnten. So wurde in humanen Monozyten kürzlich gezeigt, dass abnormale SOCS3-Spiegel im Gegensatz zu physiologischen Mengen dazu führen können, dass die über IL-10-vermittelte suppressive Wirkung auf die TNF- $\alpha$ -Produktion nach LPS-Stimulation wesentlich geringer ausfällt, wenngleich die Rolle von SOCS3 in der Kontrolle der antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-10 in Monozyten durchaus kontrovers diskutiert wird [Prele *et al.* 2006]. Messungen der Chemokinsekretion isolierter transgener Keratinozyten nach Stimulation mit Zytokinen ergaben jedoch im Vergleich zu nicht-transgenen Zellen nur für MCP-1/CCL-2 signifikant erhöhte Mengen des Chemokins im Überstand (Abb. III.29). Die Hypothese eines modifizierten, proentzündlich-ausgerichteten Keratinozytenphänotyps lässt sich somit *in vitro* nicht eindeutig bestätigen und scheidet als alleinige Ursache für die Erklärung der gestörten Wundheilung transgener Mäuse aus.



### 3.3 Defizite in der Wundreepithelialisierung als Ursache einer potenzierten Entzündung?

Es ist hinreichend bekannt, dass Proliferations- und Migrationsprozesse epidermaler Zellen maßgeblich an einer raschen und komplikationsfreien Abheilung kutaner Verletzungen beteiligt sind, da es gilt, das Wundareal schnellstmöglich durch ein strukturiertes Neoepithel zu verschließen und somit die Barrierefunktion der Haut rasch zu regenerieren [Martin 1997; Singer und Clark 1999; Falanga 2005]. Ebenso ist klar, dass jede Verzögerung in der Wiederherstellung dieser Barriere das Risiko einer zusätzlichen Traumatisierung des Wundareals durch biologische, chemische oder physikalische Noxen potenziert. So existieren beispielsweise mehrere Arbeiten, die eine Biofilmbildung in der offenen Wunde als typische und für den Heilungserfolg als durchaus kritisch zu bewertende Komplikation chronischer Wunden thematisieren [Edwards und Harding 2004; Bjarnsholt *et al.* 2007; James *et al.* 2008; Kim *et al.* 2008]. Interessant ist, dass eine mikrobielle Kontamination der Wunde nicht zwingend zur Ausprägung klinischer Anzeichen einer Infektion führen muss. Schließlich ergibt sich für alle Prozesse, die mit der Reepithelialisierung des Wundbereiches interferieren, eine kritische Schlüsselposition während des gesamten Heilungsprozesses.

Als Initiatoren und Regulatoren der Keratinozytenproliferation und -migration gelten Zytokine wie IL-6, verschiedene Vertreter der EGF-Familie (EGF, TGF- $\alpha$ , *heparin binding* (HB)-EGF-like factor) und Wachstumsfaktoren wie KGF und HGF, die von zahlreichen infiltrierenden Immunzellen aber auch residenten Zellen in das Wundgewebe sezerniert werden [Gniadecki 1998; Werner und Grose 2003; Santorro und Gaudino 2005; Li *et al.* 2006]. Dabei konnte wiederholt gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor STAT3, der über gp130-basierende Rezeptoren (IL-6-Rezeptorklasse) und auch über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) wie dem EGF-Rezeptor aktiviert werden kann, offensichtlich eine wichtige Position sowohl in der Transkription migrations- als auch proliferationsrelevanter Gene einnimmt [Zhong *et al.* 1994; Sano *et al.* 1999 und 2005; Hirano *et al.* 2000; Tokumaru *et al.* 2005a/b]. Darüber hinaus ist bekannt, dass STAT3 in kultivierten und basalen Keratinozyten exprimiert wird und dass SOCS3 als Bestandteil der negativen Rückkopplungsschleife in diesen Zellen in der Lage ist, die Aktivierung von STAT3 zu unterbinden (Abb. III.10) [Sano *et al.* 1999; Yamasaki *et al.* 2003; Quadros *et al.* 2004; Tokumaru *et al.* 2005a/b; Goren *et al.* 2003 und 2006a]. Im Um-

kehrschluss führte der epidermale SOCS3-Knockout zu einem offensichtlich STAT3-vermittelten, abnormen Proliferationsschub in Wundrandkeratinozyten, der später durch den simultanen Knockout von SOCS3 und gp130 größtenteils unterdrückt werden konnte [Zhu *et al.* 2008]. Auch werden in diesem Kontext in letzter Zeit zunehmend pathologische Veränderungen, die mit einer abnormalen Proliferationsaktivität epidermaler Zellen einhergehen (Psoriasis, Plattenepithelkarzinome), mit einer überdurchschnittlichen Verfügbarkeit an aktiviertem STAT3 in Verbindung gebracht [Quadros *et al.* 2004; Sano *et al.* 2005].

Trotz dieser zahlreichen Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen wundheilungsrelevanten Prozessen wie Keratinozytenproliferation und -migration einerseits und SOCS3 als potentem Regulator offensichtlich involvierter Signalkaskaden andererseits existieren keine Daten, die eine direkte kausale Verknüpfung zwischen erhöhter epidermaler Präsenz dieses Proteins und Wundheilungsstörungen herstellen. In dieser Arbeit konnte aufgrund der folgenden Erkenntnisse erstmals der Verdacht erhärtet werden, dass eine lang anhaltend erhöhte Expression von SOCS3 in Keratinozyten des Wundrandes als zentrales Element in der Kausalkette von Wundheilungsstörungen im *ob/ob*-Mausmodell gewertet werden muss:

- Immunhistochemische Färbungen gegen SOCS3 und Ki67 in benachbarten Serienschnitten stoffwechselgesunder und diabetischer Mäuse ließen vermuten, dass sich eine Koexpression beider Antigene in derselben Zelle ausschließt. Dies impliziert, dass eine stark SOCS3-positive Zelle mitotisch inaktiv ist (Abb. III.2/ Abb. III.3).
- Wundränder diabetischer *ob/ob*-Mäuse zeichneten sich neben der verlängerten Präsenz von SOCS3 durch eine ausgeprägte Atrophie des Neoepithels aus (Abb. III.3).
- Die Reepithelialisierung von Wunden transgener, SOCS3-überexprimierender Mäuse war deutlich retardiert (Abb. III.14/ Abb. III.16).
- Die absolute Keratinozytenzahl im HE transgener Mäuse war wie auch die Zahl BrdU-positiver Keratinozyten im HE dieser Tiere signifikant geringer als im HE der Wiltyp-Tiere (Abb. III.15/ Abb. III.17).
- *In vitro*-Studien auf Basis isolierter primärer muriner Keratinozyten belegten eine Reduktion der Zellteilungsaktivität konstitutiv-SOCS3-exprimierender Zellen um bis zu 43% (Abb. III.11).

- Die Migrationsaktivität isolierter transgener Keratinozyten war gemessen an der Zahl migrierender Zellen bis zum Faktor 5 geringer als die nicht-transgener Zellen (Abb. III.11).
- SOCS3-überexprimierende Keratinozyten zeigten Indizien einer verfrühten Ausdifferenzierung (Abb. III.12/ Abb. III.13).

Bezüglich der *in vitro*-Migrations- und Proliferationsuntersuchungen ist anzumerken, dass weder IL-6 noch TGF- $\alpha$  eine Steigerung der Migration/Proliferation im Vergleich zur Kontrollsituation unter Vollmedium (KGM) hervorrufen konnten. Die plausibelste Erklärung dieser Beobachtung liegt im Fehlen des BPE (boviner Hypophysenextrakt)-Zusatzes in den verwendeten KBM-Medien, die als Basismedien für die Stimulation mit IL-6 und TGF- $\alpha$  dienten. Bereits vor einigen Jahren konnten äußerst potente mitogene und synergistisch-motogene Eigenschaften für BPE aufgezeigt werden [Sarret *et al.* 1992]. Weiterhin ist anhand der geringeren Reduktion der Zellproliferation im Vergleich zur migratorischen Aktivität erkennbar, dass die JAK2/ STAT3-vermittelte Signaltransduktion, die im Mittelpunkt der Intervention durch SOCS3 steht, für die Initiierung und Regulation der Zellmigration von offensichtlich größerer Bedeutung ist als für die Transduktion mitogener Signale. Dies ist nicht abwegig, da bekannt ist, dass der RTK/Ras/Erk-Signalweg den potentesten mitogenen Signalweg darstellt [Khavari und Rinn 2007; McKay und Morrison 2007]. Möglicherweise spielt aber auch hier SOCS3 eine Rolle, denn es konnte gezeigt werden, dass SOCS3 trotz der ebenso bekannten potenten Hemmung der STAT5-Aktivierung in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus in der Lage ist, durch Hemmung des Ras-Inhibitors *p120RasGAP* eine Aktivierung der MAP-Kinase *ERK* aufrecht zu erhalten [Cacalano *et al.* 2001].

Letztlich konnte allein durch die Überexpression eines einzigen Proteins innerhalb eines isolierten histologischen Kompartiments ein komplexes Wundbild generieren werden, das dem Wundphänotyp einer insulinresistenten *ob/ob*-Maus und darüber hinaus dem eines systemischen IL-6-knockouts stark ähnelt, ohne dass Komplikationen existent waren, die aus diabetischen Phänotyp resultieren würden [Gallucci *et al.* 2000; Lin *et al.* 2003; Goren *et al.* 2003a und 2006a]. Offensichtlich repräsentiert die durch das Transgen deutlich reduzierte mitotische und migratorische Aktivität der Wundrandkeratinozyten, die zudem mit einer verfrühten terminalen Differenzierung der Zellen in Assoziation zu stehen scheint und zu dystrophen epithelialen Wundrändern führt, die zen-

trale Aussage für das Verständnis der verzögerten Heilung im transgenen Mausmodell. Gleichzeitig ist es nach Kenntnis dieser Daten sehr wahrscheinlich, dass die im transgenen Mausmodell beobachtete überschießende Entzündung eine Folge der gestörten Reepithelialisierung ist und somit ein sekundäres Phänomen darstellt. Dies lässt weiterhin die Hypothese zu, dass auch die in der diabetischen *ob/ob*-Maus existente abnorme Inflammation nicht die primäre Ursache, sondern lediglich eine Folge des retardierten Wundschlusses darstellt.

### **3.4 Entzündung: ein Epiphänomen verzögert heilender Wunden?**

Um die Hypothese, die massive Entzündungsantwort in der transgenen Maus sei ein sekundärer Effekt des retardierten Wundschlusses, von einer grundsätzlichen Funktionsstörung antiinflammatorischer Regelkreise differenzieren zu können, ist die Expression des prototypisch-anti-entzündlichen Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  analysiert worden - ein Faktor, für den bekannt ist, dass er während des Wundheilungsprozesses einer starken Induktion unterliegt und zudem als potent-immunmodulatorisches Zytokin in die Regulation der Entzündungsreaktion involviert ist [Frank *et al.* 1996; O'Kane und Ferguson 1997; Ling und Robinson 2002]. Obwohl *in vitro*-Untersuchungen ergaben, dass die Isoformen TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 im humanen Organismus durchaus ähnliche Eigenschaften aufweisen [Stoek *et al.* 1989; Schluesener *et al.* 1990], stand die  $\beta$ 1-Isoform im Fokus dieser Arbeit, da deren Expressionskinetik mit dem zeitlichen Verlauf der entzündlichen Akutphase des Heilungsprozesses in der Maus sehr gut korreliert [Frank *et al.* 1996]. Für TGF- $\beta$ 3 ist dagegen bekannt, dass es in stoffwechselgesunden Mäusen erst in der Spätphase der Heilung hochreguliert wird und seine Hauptfunktion primär in der Regulation der Remodellierung des Wundareals (Vernarbung) zu finden ist [Shah *et al.* 1995; Frank *et al.* 1996].

Erkenntnisse über die äußerst potenten immunmodulatorischen Eigenschaften des Zytokins reichen bis in die 80er Jahre zurück und fanden letztlich eine eindrucksvolle Bestätigung im Phänotyp der TGF- $\beta$ 1-Knockoutmaus, bei der eine multifokale Entzündungsreaktion dazu führte, dass die Tiere ein Alter von 3-4 Wochen nicht überlebten [Stoek *et al.* 1989; Schluesener *et al.* 1990; Shull *et al.* 1992; Kulkarni *et al.* 1993]. Eine Vielzahl aktueller Arbeiten beschreibt TGF- $\beta$  als den wahrscheinlich potentesten physiolo-

gischen Immunsuppressor, der als zentraler Bestandteil mehrerer komplexer Mechanismen an der Auflösung der Entzündungsantwort beteiligt ist [Ling und Robinson 2002; Gorelik und Flavell 2002; Ayala *et al.* 2003; Henson 2005]. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen zudem, dass TGF- $\beta$  auch im Kontext der kutanen Wundheilung als wichtiger Mediator entzündungsdämpfender Mechanismen zu werten ist. So konnte in Wildtyp-Mäusen nach systemischer Neutralisierung des Zytokins eine signifikante Hochregulation der mRNA-Spiegel verschiedener Entzündungsmarker (IL-1 $\beta$ , MIP-2/CXCL-2, COX-2) aufgezeigt werden (Abb. III.33). In primären Keratinozyten führte die Zugabe von rekombinantem TGF- $\beta$  zu einer signifikanten Dämpfung der Zytokin-induzierten Sekretion prototypischer Chemokine (Abb. III.29).

Die Analyse der TGF- $\beta$ 1-Expression ergab ausschließlich in Wunden nicht-transgener Tiere eine mit der Literatur übereinstimmende, rasche Induktion innerhalb der ersten Tage nach Verwundung (Abb. III.27) [Frank *et al.* 1996; O’Kane und Ferguson 1997; Wang *et al.* 2006]. Ihr Maximum am dritten Heilungstag fällt dabei mit dem Höhepunkt der entzündlichen Akutphase zusammen und verweist somit auf die zeitliche Kohärenz zwischen der Entzündungsphase und ihrer Kontrollmechanismen. Überraschenderweise zeichneten sich im Vergleich dazu Wunden transgener Tiere durch drastisch erhöhte Expressionsspiegel sowohl in der Akutphase (d1) als auch der Spätphase (d7) des Heilungsprozesses aus (Abb. III.27). Das Interessante daran ist, dass der Heilungsprozess dennoch durch eine überschießende Entzündung charakterisiert wurde. Die Erklärung dieser zunächst widersprüchlich erscheinenden Beobachtung könnte wie eingangs erwähnt darin liegen, dass die drastische Verzögerung im Wundschluss transgener Tiere ein wiederholtes Aufflammen der Entzündung massiv begünstigte. Andererseits ist unklar, inwieweit sich die gesteigerte TGF- $\beta$ 1-Expression letztlich direkt in eine erhöhte Verfügbarkeit an aktivem TGF- $\beta$  übersetzen lässt, da auch latent gebundenes und damit inaktives TGF- $\beta$ 1 im ELISA erfasst wurde (vgl. Kap. III.4.3.1).

Des Weiteren konnte *in vitro* ausgeschlossen werden, dass erhöhte SOCS3-Spiegel in transgenen Keratinozyten zu einer herabgesetzten Responsivität der Zellen gegenüber TGF- $\beta$  führen würden (Abb. III.29). In Anbetracht der bereits mehrfach erwähnten Potenz der Wundrandkeratinozyten zur Sekretion proentzündlicher Mediatoren hätte dieser Ansatz ebenso zur Erklärung der unkontrollierten Inflammation im transgenen Tier

beitragen können. Für die Wundheilungssituation in der transgenen Maus ergeben sich somit bis dahin folgende Aussagen:

1. Die gesteigerte Expression des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 im Wundgewebe ist als gegenregulatorische Maßnahme zu verstehen, mit dem Ziel, die ausufernde Entzündung zu dämpfen. Hypothesen, nach denen proinflammatorische Eigenschaften des Wachstumsfaktors im Heilungsprozess kutaner Wunden dominieren könnten [Wang *et al.* 2006], sind widerlegt worden (Abb. III.29/ Abb. III.33).
2. Die trotz einer erhöhten Expression von TGF- $\beta$ 1 nur ineffiziente Kontrolle der Inflammation scheint grundlegend in der defizitären, retardierten Reepithelialisierung begründet zu sein.
3. Eine verminderte Responsivität transgener Keratinozyten gegenüber immunsuppressivem TGF- $\beta$ 1 als Ursache der abnormen Entzündungsreaktion ist ebenso auszuschließen wie eine direkte Verbindung zwischen der SOCS3-Überexpression in Keratinozyten und der erhöhten TGF- $\beta$ 1-Expression im Wundgewebe.

Die interessanteste Erkenntnis des TGF- $\beta$ -Kapitels dieser Arbeit entstammt der Tatsache, dass die systemische Neutralisierung von TGF- $\beta$  die Wundschlussrate in einem transgenen Defektmodell derart verbesserte, dass sich das makroskopische Erscheinungsbild der Wunde dem normal heilender Wunden eines nicht-transgenen Tieres deutlich näherte, obwohl der Heilungsprozess nach wie vor von einer massiven Inflammation begleitet wurde. Zweifel an der biologischen Aktivität des applizierten Antikörpers erwiesen sich dabei aufgrund der signifikanten Steigerung der mRNA-Spiegel der Entzündungsmarker IL-1 $\beta$ , MIP-2/CXCL-2 und COX-2 im Wildtyp-Tier als unbegründet (Abb. III.33). Die beobachtete Verbesserung der Heilungssituation trotz Inflammation stellt letztlich klar die verbreitete Auffassung in Frage, nach der eine chronische Entzündung im Wundareal zweifelsfrei als destruktives Element und somit als Ursache einer Wundheilungsstörung gewertet wird. Denn offensichtlich kann eine verstärkte und verlängerte Entzündung unter bestimmten Voraussetzungen tatsächlich als Epiphänomen aufgefasst werden, da diese nicht zwingend derart negativ mit dem Heilungsprozess interferieren muss, dass es unweigerlich zu einer Verschlechterung der Heilungsprognose führt.

Interessant war zudem, dass der geringere Wunddurchmesser in antikörperbehandelten transgenen Tieren nicht aus einer Verbesserung der Epithelneubildung resultierte. Denn trotz der widersprüchlichen Rolle von TGF- $\beta$  im Prozess der Reepithelialisierung, die sich einerseits gegenüber epidermalen Zellen aus einer klar antiproliferativen Komponente zusammensetzt [Coffey *et al.* 1988; Sellheyer *et al.* 1993], andererseits jedoch einen starken Stimulus der Keratinozytenmigration verkörpert [Nickoloff *et al.* 1988; Gailit *et al.* 1994], existieren mehrere Publikationen, die nach Neutralisierung des Zytokins selbst oder nach einer Manipulation der Signaltransduktion eine Verbesserung der Epithelneubildung aufzeigen konnten [Ashcroft *et al.* 1999; Koch *et al.* 2000; Amendt *et al.* 2002; Saika *et al.* 2005]. Offenbar wird das nach TGF- $\beta$ -Neutralisierung künstlich geschaffene „promitotische Milieu“ durch den proliferationshemmenden Einfluss der hohen SOCS3-Spiegel überkompensiert. Tatsächlich scheint die auffällig beschleunigte Reduktion der verbleibenden Wundfläche im transgenen Tier nach anti-TGF- $\beta$ -Behandlung in einer deutlich erhöhten Kontraktilität begründet zu sein. Dies ist einerseits ungewöhnlich, da TGF- $\beta$ 1 als Stimulanz der Myofibroblastendifferenzierung bekannt ist [Desmouliere *et al.* 1993; Ronnov-Jessen und Petersen 1993]. Andererseits existieren neben TGF- $\beta$  weitere potente Induktoren der Myofibroblastenbildung, zu denen beispielsweise proinflammatorische Mediatoren wie IL-6 oder FIZZ1/RELM- $\alpha$  (*resistin-like molecule- $\alpha$* ), aber auch eine mechanische Belastung der Wunde selbst zu zählen sind [Hinz *et al.* 2001; Liu *et al.* 2004; Gallucci *et al.* 2006].

Letztlich muss die aufgestellte Hypothese des „Epiphänomens Wundentzündung“ insofern relativiert werden, als dass keine Aussagen zur Wundentwicklung getroffen werden können, die über den 5. Heilungstag hinausreichen. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass eine systemische anti-TGF- $\beta$ -Behandlung neben der Reduktion lokaler TGF- $\beta$ -Spiegel auch das Spektrum und den Aktivitätszustand der in das Wundgebiet rekrutierten Zellen beeinflusst haben muss, die wie beispielsweise nTreg-Zellen den Wachstumsfaktor gebunden in ihrer Zelloberfläche tragen [Nakamura *et al.* 2001; Oida *et al.* 2006]. Dennoch ist das Gesamtfazit durchaus interessant: anhand des in dieser Arbeit generierten Defektheilungsmodells, bei dem die Überexpression von SOCS3 innerhalb eines isolierten epidermalen Kompartiments in einem Wundphänotyp resultierte, der deutliche Parallelen zum Wundbild diabetischer *ob/ob*-Mäuse aufwies, konnte aufge-

---

zeigt werden, dass eine Störung der Reepithelialisierung genügt, um eine massive Entzündungsantwort zu begründen.



## V ZUSAMMENFASSUNG

Innerhalb der letzten Jahre ist weltweit eine progrediente Zunahme der Zahl am Typ II-Diabetes erkrankter Personen beobachtet worden, die sich nicht mehr nur in hochentwickelten Industriestaaten, sondern zunehmend auch in Entwicklungsländern zu manifestieren scheint. Dabei geht das größte Gesundheitsrisiko eines Typ II-Diabetes von einer Amputation der unteren Extremitäten aus, die oft die finale therapeutische Maßnahme in der Behandlung eines diabetischen Fußulkus darstellt. Ein gemeinsames Charakteristikum diabetischer Ulzerationen und anderer chronischer kutaner Wundheilungsstörungen ist neben einer allgemein schlechten Heilungsprognose eine fehlregulierte Entzündungsreaktion.

In der vorliegenden Arbeit ist daher die Rolle von SOCS3 als potenter Bestandteil entzündungsdämpfender Regelkreise während der kutanen Wundheilung zunächst in stoffwechselgesunden und diabetischen Mäusen untersucht worden, um später ein SOCS3-überexprimierendes transgenes Mausmodell als Basis weiterführender Untersuchungen zu etablieren und in die Arbeit zu integrieren.

Dabei konnte gezeigt werden, dass SOCS3 in stoffwechselgesunden Mäusen während der entzündlichen Akutphase der Heilung deutlich, aber zeitlich begrenzt hochreguliert ist und somit offensichtlich eine wichtige Funktion in der intrazellulären Regulation proinflammatorischer Signalkaskaden übernimmt. Im Gegensatz dazu zeigten heilungsdefiziente Wunden diabetischer *ob/ob*-Mäuse eine deutlich verlängerte Expression dieses Proteins, wobei sich herausstellte, dass sich diese vorwiegend auf Keratinozyten der unterentwickelten Epithelränder und der atrophischen Neoepidermis beschränkte. Aus dieser Entdeckung heraus entstand die zentrale Fragestellung dieser Arbeit, die darauf abzielte zu klären, ob eine fehlregulierte SOCS3-Expression in Keratinozyten des Wundrandes als zentrale Komponente in der Kausalkette diabetisch-chronischer Wundheilungsstörungen aufgefasst werden kann. Tatsächlich konnte anhand des transgenen Mausmodells *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden, dass eine erhöhte intrazelluläre Verfügbarkeit von SOCS3 in Keratinozyten negativ mit deren Potenzial zur Proliferation und Migration interferiert. Das Protein SOCS3 besetzt somit im Prozess der kutanen Wundheilung eine inhibitorische Schlüsselposition in der Regulation essen-

tieller Kernkompetenzen von Wundrandkeratinozyten, und dies als eigenständiges Element isoliert von Komplikationen, die sich sekundär aus einem diabetischen Phänotyp ergeben.

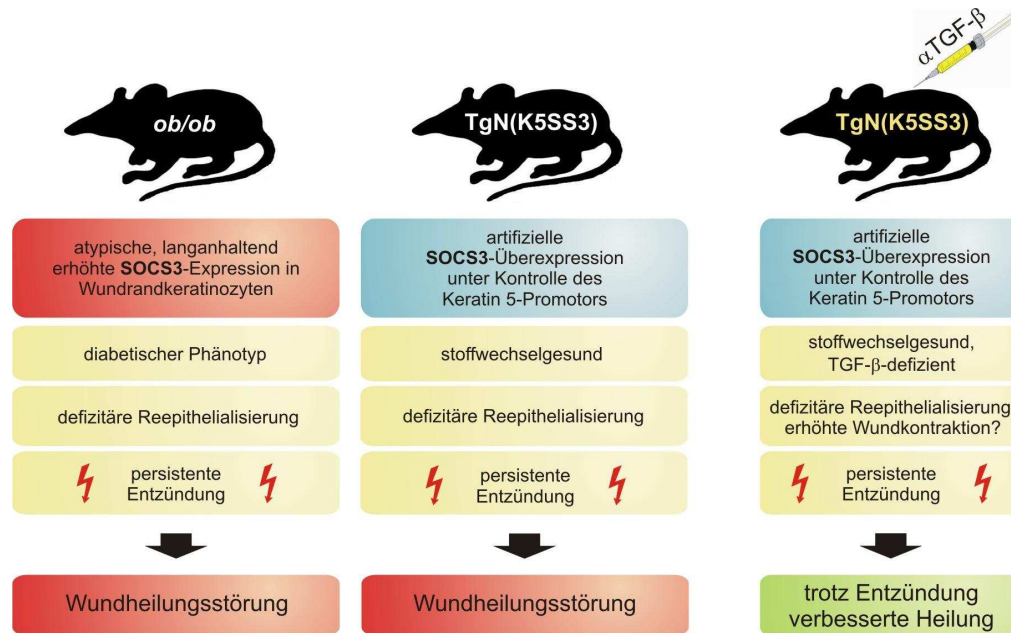


Abb. V.1: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Konsequenz zeigten stoffwechselgesunde transgene Mäuse deutliche Defizite in der Reepithelialisierung des Wundareals, die in vergleichbarer Form aus Wunden diabetischer *ob/ob*-Mäuse bekannt sind. Darüber hinaus konnte in SOCS3-überexprimierenden Mäusen eine für chronische Wunden typische, gesteigerte Entzündungsantwort im Wundgewebe detektiert werden, die sich durch eine verlängerte und erhöhte Präsenz neutrophiler Granulozyten und Makrophagen sowie eine verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine und Entzündungsmarker auszeichnete. Obwohl immunhistochemische Färbungen und Messungen proentzündlicher Mediatoren im Wundgewebe auf eine kritische Rolle SOCS3-überexprimierender Keratinozyten in der Bereitstellung proentzündlicher Mediatoren hindeuteten, konnten *in vitro*-Untersuchungen keinen proinflammatorisch veränderten Phänotyp transgener Keratinozyten bestätigen. Dies impliziert, dass die unkontrollierte Entzündungsantwort im transgenen Mausmodell sehr wahrscheinlich sekundär aus der retardierten Reepithelialisierung hervorging. Demnach ist denkbar, dass die SOCS3-bedingte retardierte Epithelregenerierung auch während

der diabetisch-gestörten Wundheilung in der *ob/ob*-Maus eine bislang unterschätzte, zentrale Position in der Ätiologie der Heilungsstörung einnimmt.

Die interessanteste Beobachtung ergab sich nach systemischer Neutralisierung des anti-inflammatorischen Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ , nachdem eine drastische, offenbar gegenregulatorische Steigerung der TGF- $\beta$ 1-Expression im Wundgewebe heilungsdefizienter, transgener Mäuse detektiert wurde. Überraschender Weise führte die Neutralisierung von TGF- $\beta$  in der transgenen Maus trotz der nach wie vor massiven Entzündung zu einer deutlich verbesserten Heilungssituation, die in diesem Fall nicht - wie aus der Literatur bekannt - auf eine Verbesserung der Wundreepithelialisierung, sondern eher auf eine erhöhte Kontraktilität der Wunden zurückzuführen war. Einerseits verweist dies erneut auf den potenten proliferationshemmenden Einfluss der hohen SOCS3-Spiegel. Andererseits rückt damit die Entzündungsreaktion in den Bereich eines Epiphänomens ab, da gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte Wundinflammation offensichtlich nicht zwingend ein Charakteristikum darstellt, das *per definitionem* negativ mit dem Heilungsfortschritt interferieren muss.

## VI LITERATUR

- Akira S. 1997.** IL-6-regulated transcription factors. *Int.J Biochem.Cell Biol.* **29:** 1401-1418.
- Amendt C, Mann A, Schirmacher P, Blessing M. 2002.** Resistance of keratinocytes to TGFbeta-mediated growth restriction and apoptosis induction accelerates re-epithelialization in skin wounds. *J Cell Sci.* **115:** 2189-2198.
- Amendt C, Schirmacher P, Weber H, Blessing M. 1998.** Expression of a dominant negative type II TGF-beta receptor in mouse skin results in an increase in carcinoma incidence and an acceleration of carcinoma development. *Oncogene* **17:** 25-34.
- Amjad SB, Carachi R, Edward M. 2007.** Keratinocyte regulation of TGF-beta and connective tissue growth factor expression: a role in suppression of scar tissue formation. *Wound.Repair Regen.* **15:** 748-755.
- Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. 2002.** Ischemia/reperfusion injury. *J Surg.Res.* **105:** 248-258.
- Anwar S, Whyte MK. 2007.** Neutrophil apoptosis in infectious disease. *Exp.Lung Res.* **33:** 519-528.
- Ashcroft GS. 1999.** Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes.Infect.* **1:** 1275-1282.
- Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C, Roberts AB. 1999.** Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* **1:** 260-266.
- Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H, Augustin HG, Eming SA, Schubert U, Linn T, Nawroth PP, Hussain M, Hammes HP, Herrmann M, Preissner KT, Chavakis T. 2006.** The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* **107:** 2720-2727.
- Ayala A, Chung CS, Grutkoski PS, Song GY. 2003.** Mechanisms of immune resolution. *Crit Care Med.* **31:** S558-S571.
- Baltimore D, Huang AS, Stampfer M. 1970.** Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus, II. An RNA polymerase in the virion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **66:** 572-576.
- Bandyopadhyay B, Fan J, Guan S, Li Y, Chen M, Woodley DT, Li W. 2006.** A "traffic control" role for TGFbeta3: orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healing. *The Journal of Cell Biology* **172:** 1093-1105.
- Bennett NT, Schultz GS. 1993a.** Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am.J.Surg.* **165:** 728-737.
- Bennett NT, Schultz GS. 1993b.** Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am.J.Surg.* **166:** 74-81.
- Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL. 2003.** Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br.J Surg.* **90:** 133-146.
- Benoit S, Toksoy A, Brocker EB, Gillitzer R, Goebeler M. 2004.** Treatment of recalcitrant pustular psoriasis with infliximab: effective reduction of chemokine expression. *Br.J Dermatol* **150:** 1009-1012.
- Bertani G. 2004.** Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol.* **186:** 595-600.
- Bessman AN, Sapico FL, Tabatabai M, Montgomerie JZ. 1986.** Persistence of polymicrobial abscesses in the poorly controlled diabetic host. *Diabetes* **35:** 448-453.

- Birnboim HC. 1983.** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100:** 243-255.
- Bitar MS, Labbad ZN. 1996.** Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I in relation to diabetes-induced impairment of wound healing. *J Surg.Res.* **61:** 113-119.
- Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K, Jensen PO, Madsen KG, Phipps R, Kroghfelt K, Hoiby N, Givskov M. 2008.** Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound.Repair Regen.* **16:** 2-10.
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. 1998.** Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol.Cell* **1:** 619-625.
- Blakytyn R, Jude EB, Martin GJ, Boulton AJ, Ferguson MW. 2000.** Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers. *J Pathol.* **190:** 589-594.
- Bogdan C. 2001.** Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* **2:** 907-916.
- Bornstein P, Sage EH. 2002.** Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr.Opin.Cell Biol.* **14:** 608-616.
- Borradori L, Sonnenberg A. 1999.** Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J.Invest Dermatol.* **112:** 411-418.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. 1988.** Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology* **106:** 761-771.
- Boulton AJ. 2004.** The diabetic foot: from art to science. The 18th Camillo Golgi lecture. *Diabetologia* **47:** 1343-1353.
- Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. 2005.** The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* **366:** 1719-1724.
- Brem H, Sheehan P, Rosenberg HJ, Schneider JS, Boulton AJ. 2006.** Evidence-based protocol for diabetic foot ulcers. *Plast.Reconstr.Surg.* **117:** 193S-209S.
- Brem H, Tomic-Canic M. 2007.** Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J.Clin.Invest* **117:** 1219-1222.
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD. 1981.** Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* **27:** 223-231.
- Bryan D, Walker KB, Ferguson M, Thorpe R. 2005.** Cytokine gene expression in a murine wound healing model. *Cytokine* **31:** 429-438.
- Bullen EC, Longaker MT, Updike DL, Benton R, Ladin D, Hou Z, Howard EW. 1995.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* **104:** 236-240.
- Burgeson RE, Christiano AM. 1997.** The dermal-epidermal junction. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9:** 651-658.
- Cacalano NA, Sanden D, Johnston JA. 2001.** Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nat.Cell Biol.* **3:** 460-465.
- Casatorres J, Navarro JM, Blessing M, Jorcano JL. 1994.** Analysis of the control of expression and tissue specificity of the keratin 5 gene, characteristic of basal keratinocytes. Fundamental role of an AP-1 element. *J Biol.Chem.* **269:** 20489-20496.
- Cataisson C, Joseloff E, Murillas R, Wang A, Atwell C, Torgerson S, Gerdes M, Subleski J, Gao JL, Murphy PM, Wiltrout RH, Vinson C, Yuspa SH. 2003.** Activation of cutaneous protein kinase C alpha induces keratinocyte apoptosis and intraepidermal inflammation by independent signaling pathways. *J Immunol.* **171:** 2703-2713.

- Cataisson C, Pearson AJ, Tsien MZ, Mascia F, Gao JL, Pastore S, Yuspa SH. 2006.** CXCR2 ligands and G-CSF mediate PKC $\alpha$ -induced intraepidermal inflammation. *J Clin Invest* **116**: 2757-2766.
- Chan T, Ghahary A, Demare J, Yang L, Iwashina T, Scott PG, Tredget EE. 2002.** Development, characterization, and wound healing of the keratin 14 promoted transforming growth factor-beta1 transgenic mouse. *Wound.Repair Regen.* **10**: 177-187.
- Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, Herrmann M, Preissner KT. 2002.** Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat.Med.* **8**: 687-693.
- Chen WY, Rogers AA. 2007.** Recent insights into the causes of chronic leg ulceration in venous diseases and implications on other types of chronic wounds. *Wound.Repair Regen.* **15**: 434-449.
- Chen XP, Losman JA, Cowan S, Donahue E, Fay S, Vuong BQ, Nawijn MC, Capece D, Cohan VL, Rothman P. 2002.** Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**: 2175-2180.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**: 156-159.
- Chomczynski P, Sacchi N. 2006.** The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* **1**: 581-585.
- Christ M, McCartney-Francis NL, Kulkarni AB, Ward JM, Mizel DE, Mackall CL, Gress RE, Hines KL, Tian H, Karlsson S, . 1994.** Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *J Immunol.* **153**: 1936-1946.
- Clark RA, Ashcroft GS, Spencer MJ, Larjava H, Ferguson MW. 1996.** Re-epithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from alpha v beta 5 to alpha v beta 6 integrins. *Br.J.Dermatol.* **135**: 46-51.
- Clark RA, Folkvord JM, Wertz RL. 1985.** Fibronectin, as well as other extracellular matrix proteins, mediate human keratinocyte adherence. *J.Invest Dermatol.* **84**: 378-383.
- Clark RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB. 1982a.** Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J.Invest Dermatol.* **79**: 264-269.
- Clark RA, Quinn JH, Winn HJ, Lanigan JM, Dellepella P, Colvin RB. 1982b.** Fibronectin is produced by blood vessels in response to injury. *J.Exp.Med.* **156**: 646-651.
- Coffey RJ, Jr., Bascom CC, Sipes NJ, Graves-Deal R, Weissman BE, Moses HL. 1988.** Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta. *Mol.Cell Biol.* **8**: 3088-3093.
- Coleman DL. 1978.** Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* **14**: 141-148.
- Cowin AJ, Hatzirodos N, Holding CA, Dunaiski V, Harries RH, Rayner TE, Fittridge R, Cooter RD, Schultz GS, Belford DA. 2001.** Effect of healing on the expression of transforming growth factor beta(s) and their receptors in chronic venous leg ulcers. *J Invest Dermatol* **117**: 1282-1289.
- Cui Q, Jiang W, Wang Y, Lv C, Luo J, Zhang W, Lin F, Yin Y, Cai R, Wei P, Qian C. 2008.** Transfer of suppressor of cytokine signaling 3 by an oncolytic adenovirus induces potential antitumor activities in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **47**: 105-112.
- Danen EH, Yamada KM. 2001.** Fibronectin, integrins, and growth control. *J.Cell Physiol* **189**: 1-13.
- Darby I, Skalli O, Gabbiani G. 1990.** Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* **63**: 21-29.

- Decline F, Okamoto O, Mallein-Gerin F, Helbert B, Bernaud J, Rigal D, Rousselle P. 2003.** Keratinocyte motility induced by TGF-beta1 is accompanied by dramatic changes in cellular interactions with laminin 5. *Cell Motil.Cytoskeleton* **54**: 64-80.
- deFazio A, Leary JA, Hedley DW, Tattersall MH. 1987.** Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **35**: 571-577.
- Denson LA, Held MA, Menon RK, Frank SJ, Parlow AF, Arnold DL. 2003.** Interleukin-6 inhibits hepatic growth hormone signaling via upregulation of Cis and Socs-3. *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **284**: G646-G654.
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. 1998.** Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* **95**: 737-740.
- Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. 1993.** Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* **122**: 103-111.
- Diegelmann RF. 2003.** Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. *Wound.Repair Regen.* **11**: 490-495.
- Dinh T, Veves A. 2005a.** Microcirculation of the diabetic foot. *Curr.Pharm.Des* **11**: 2301-2309.
- Dinh TL, Veves A. 2005b.** A review of the mechanisms implicated in the pathogenesis of the diabetic foot. *Int.J Low Extrem.Wounds.* **4**: 154-159.
- DiPietro LA. 1995.** Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* **4**: 233-240.
- DiPietro LA, Polverini PJ, Rahbe SM, Kovacs EJ. 1995.** Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *Am.J Pathol.* **146**: 868-875.
- Dovi JV, He LK, DiPietro LA. 2003.** Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J.Leukoc.Biol.* **73**: 448-455.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. 2005.** The metabolic syndrome. *Lancet* **365**: 1415-1428.
- Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M, Rorke EA. 2005.** Transglutaminase function in epidermis. *J.Invest Dermatol.* **124**: 481-492.
- Eckert RL, Yaffe MB, Crish JF, Murthy S, Rorke EA, Welter JF. 1993.** Involucrin--structure and role in envelope assembly. *J.Invest Dermatol.* **100**: 613-617.
- Edmonds M, Foster A. 2004.** The use of antibiotics in the diabetic foot. *Am.J Surg.* **187**: 25S-28S.
- Edwards R, Harding KG. 2004.** Bacteria and wound healing. *Curr.Opin.Infect.Dis.* **17**: 91-96.
- Ekelund E, Saaf A, Tengvall-Linder M, Melen E, Link J, Barker J, Reynolds NJ, Meggitt SJ, Kere J, Wahlgren CF, Pershagen G, Wickman M, Nordenskjold M, Kockum I, Bradley M. 2006.** Elevated expression and genetic association links the SOCS3 gene to atopic dermatitis. *Am.J Hum.Genet.* **78**: 1060-1065.
- El Kasmi KC, Holst J, Coffre M, Mielke L, de Pauw A, Lhocine N, Smith AM, Rutschman R, Kaushal D, Shen Y, Suda T, Donnelly RP, Myers MG, Jr., Alexander W, Vignali DA, Watowich SS, Ernst M, Hilton DJ, Murray PJ. 2006.** General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *J Immunol.* **177**: 7880-7888.
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, Hotamisligil GS, Van Obberghen E. 2001.** SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem.* **276**: 47944-47949.
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. 2000.** SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem.* **275**: 15985-15991.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. 2007.** Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J.Invest Dermatol.* **127**: 514-525.

- Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A. 1997.** A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* **387**: 921-924.
- Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R. 1998.** Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am.J Pathol.* **153**: 1849-1860.
- Espevik T, Figari IS, Shalaby MR, Lackides GA, Lewis GD, Shepard HM, Palladino MA, Jr. 1987.** Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. *J Exp.Med.* **166**: 571-576.
- Evans CB, Pillai S, Goldyne ME. 1993.** Endogenous prostaglandin E2 modulates calcium-induced differentiation in human skin keratinocytes. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* **49**: 777-781.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. 1998.** Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin.Invest* **101**: 890-898.
- Falanga V. 1993.** Growth factors and wound healing. *J.Dermatol.Surg.Oncol.* **19**: 711-714.
- Falanga V. 2004.** The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells Mol.Dis.* **32**: 88-94.
- Falanga V. 2005.** Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* **366**: 1736-1743.
- Falanga V, Eaglstein WH. 1993.** The "trap" hypothesis of venous ulceration. *Lancet* **341**: 1006-1008.
- Fedorcsak I, Ehrenberg L. 1966.** Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem.Scand.* **20**: 107-112.
- Feiken E, Romer J, Eriksen J, Lund LR. 1995.** Neutrophils express tumor necrosis factor-alpha during mouse skin wound healing. *J Invest Dermatol.* **105**: 120-123.
- Feinberg AP, Vogelstein B. 1983.** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* **132**: 6-13.
- Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. 1995.** Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol.Chem.* **270**: 12607-12613.
- Frank S, Kampfer H, Wetzler C, Pfeilschifter J. 2002.** Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney Int.* **61**: 882-888.
- Frank S, Kolb N, Werner ER, Pfeilschifter J. 1998a.** Coordinated induction of inducible nitric oxide synthase and GTP-cyclohydrolase I is dependent on inflammatory cytokines and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes: implications for the model of cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol.* **111**: 1065-1071.
- Frank S, Madlener M, Pfeilschifter J, Werner S. 1998b.** Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol* **111**: 1058-1064.
- Frank S, Madlener M, Werner S. 1996.** Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol.Chem.* **271**: 10188-10193.
- Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. 2000.** Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin.Invest* **106**: 501-509.
- Fuchs E. 1990.** Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* **111**: 2807-2814.
- Fuchs E, Raghavan S. 2002.** Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev.Genet.* **3**: 199-209.
- Gabbiani G, Chaponnier C, Huttner I. 1978.** Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *The Journal of Cell Biology* **76**: 561-568.



- Gailit J, Welch MP, Clark RA. 1994.** TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* **103**: 221-227.
- Galkowska H, Wojewodzka U, Olszewski WL. 2006.** Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound.Repair Regen.* **14**: 558-565.
- Gallucci RM, Lee EG, Tomasek JJ. 2006.** IL-6 modulates alpha-smooth muscle actin expression in dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice. *J Invest Dermatol* **126**: 561-568.
- Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, Kommineni C, Gurriel JL, Sugawara T, Luster MI. 2000.** Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J* **14**: 2525-2531.
- Garay-Rojas E, Harper M, Hraba-Renevey S, Kress M. 1996.** An apparent autocrine mechanism amplifies the dexamethasone- and retinoic acid-induced expression of mouse lipocalin-encoding gene 24p3. *Gene* **170**: 173-180.
- Garlick JA, Taichman LB. 1994.** Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Invest* **70**: 916-924.
- Gerdes J. 1988.** Determination of the growth fraction by means of immunostainings with monoclonal antibody Ki-67. *Acta Histochem.Suppl* **36**: 437-446.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. 1984.** Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* **133**: 1710-1715.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. 1983.** Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int.J Cancer* **31**: 13-20.
- Gillitzer R, Goebeler M. 2001.** Chemokines in cutaneous wound healing. *J.Leukoc.Biol.* **69**: 513-521.
- Gniadecki R. 1998.** Regulation of keratinocyte proliferation. *Gen.Pharmacol.* **30**: 619-622.
- Goliger JA, Paul DL. 1995.** Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol.Biol.Cell* **6**: 1491-1501.
- Gonzalez-Ramos A, Cooper KD, Hammerberg C. 1996.** Identification of a human dermal macrophage population responsible for constitutive restraint of primary dermal fibroblast proliferation. *J.Invest Dermatol.* **106**: 305-311.
- Gonzalez-Suarez E, Samper E, Ramirez A, Flores JM, Martin-Caballero J, Jorcano JL, Blasco MA. 2001.** Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *EMBO J* **20**: 2619-2630.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. 1980.** Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **77**: 7380-7384.
- Gorelik L, Flavell RA. 2002.** Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat.Rev.Immunol.* **2**: 46-53.
- Goren I, Kampfer H, Podda M, Pfeilschifter J, Frank S. 2003a.** Leptin and wound inflammation in diabetic ob/ob mice: differential regulation of neutrophil and macrophage influx and a potential role for the scab as a sink for inflammatory cells and mediators. *Diabetes* **52**: 2821-2832.
- Goren I, Pfeilschifter J, Frank S. 2003b.** Determination of leptin signaling pathways in human and murine keratinocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **303**: 1080-1085.
- Goren I, Linke A, Muller E, Pfeilschifter J, Frank S. 2006a.** The suppressor of cytokine signaling-3 is upregulated in impaired skin repair: implications for keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol* **126**: 477-485.
- Goren I, Kampfer H, Muller E, Schiefelbein D, Pfeilschifter J, Frank S. 2006b.** Oncostatin M expression is functionally connected to neutrophils in the early inflammatory phase of skin repair: implications for normal and diabetes-impaired wounds. *J Invest Dermatol* **126**: 628-637.
- Goren I, Muller E, Pfeilschifter J, Frank S. 2006c.** Severely impaired insulin signaling in chronic wounds of diabetic ob/ob mice: a potential role of tumor necrosis factor-alpha. *Am.J Pathol.* **168**: 765-777.

- Goren I, Muller E, Schiefelbein D, Christen U, Pfeilschifter J, Muhl H, Frank S. 2007.** Systemic anti-TNF $\alpha$  treatment restores diabetes-impaired skin repair in ob/ob mice by inactivation of macrophages. *J Invest Dermatol.* **127:** 2259-2267.
- Gray PW, Goeddel DV. 1983.** Cloning and expression of murine immune interferon cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **80:** 5842-5846.
- Gray PW, Glaister D, Chen E, Goeddel DV, Pennica D. 1986.** Two interleukin 1 genes in the mouse: cloning and expression of the cDNA for murine interleukin 1 beta. *J Immunol.* **137:** 3644-3648.
- Green KJ, Jones JC. 1996.** Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J.* **10:** 871-881.
- Green KJ, Gaudry CA. 2000.** Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **1:** 208-216.
- Green KJ, Simpson CL. 2007.** Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol.* **127:** 2499-2515.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982.** Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal.Biochem.* **126:** 131-138.
- Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL. 1999.** Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur.J Pharmacol.* **375:** 217-223.
- Greenhalgh CJ, Hilton DJ. 2001.** Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc.Biol.* **70:** 348-356.
- Greenhalgh DG. 1996.** The role of growth factors in wound healing. *J Trauma* **41:** 159-167.
- Greenhalgh DG. 1998.** The role of apoptosis in wound healing. *Int.J Biochem.Cell Biol.* **30:** 1019-1030.
- Greiling D, Clark RA. 1997.** Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci.* **110 ( Pt 7):** 861-870.
- Grellner W, Georg T, Wilske J. 2000.** Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) in human skin wounds. *Forensic Sci.Int.* **113:** 251-264.
- Grinnell F, Billingham RE, Burgess L. 1981.** Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *J Invest Dermatol.* **76:** 181-189.
- Grinnell F, Ho CH, Wysocki A. 1992.** Degradation of fibronectin and vitronectin in chronic wound fluid: analysis by cell blotting, immunoblotting, and cell adhesion assays. *J Invest Dermatol* **98:** 410-416.
- Grinnell F, Zhu M. 1996.** Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin. *J Invest Dermatol* **106:** 335-341.
- Grose R, Werner S. 2004.** Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol.Biotechnol.* **28:** 147-166.
- Guo L, Degenstein L, Fuchs E. 1996.** Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev.* **10:** 165-175.
- Hanahan D. 1983.** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol.Biol* **166:** 557-580.
- Harada M, Nakashima K, Hirota T, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Yoshikawa M, Moriyama H, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M. 2007.** Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* **36:** 491-496.
- Hart SP, Dransfield I, Rossi AG. 2008.** Phagocytosis of apoptotic cells. *Methods* **44:** 280-285.
- Henson PM. 2005.** Dampening inflammation. *Nat.Immunol.* **6:** 1179-1181.
- Higley HR, Ksander GA, Gerhardt CO, Falanga V. 1995.** Extravasation of macromolecules and possible trapping of transforming growth factor-beta in venous ulceration. *Br.J Dermatol* **132:** 79-85.
- Hill MW, Berg JH, Mackenzie IC. 1981.** Quantitative evaluation of regional differences between epithelia in the adult mouse. *Arch.Oral Biol* **26:** 1063-1067.
- Hinz B. 2007.** Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* **127:** 526-537.

- Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. 2001.** Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am.J Pathol.* **159:** 1009-1020.
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M. 2000.** Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* **19:** 2548-2556.
- Horiuchi Y, Bae SJ, Katayama I. 2006.** Overexpression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) in severe atopic dermatitis. *Clin.Exp.Dermatol* **31:** 100-104.
- Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamelis I, Bjorbaek C, Flier JS. 2004.** Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med.* **10:** 734-738.
- Howard JK, Flier JS. 2006.** Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol.Metab* **17:** 365-371.
- Hubner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fassler R, Werner S. 1996.** Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* **8:** 548-556.
- Hynes RO. 2002.** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110:** 673-687.
- Jaenisch R, Mintz B. 1974.** Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **71:** 1250-1254.
- James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E, Secor P, Sestrich J, Costerton JW, Stewart PS. 2008.** Biofilms in chronic wounds. *Wound.Repair Regen.* **16:** 37-44.
- Jeffcoate WJ, Harding KG. 2003.** Diabetic foot ulcers. *Lancet* **361:** 1545-1551.
- Jensen UB, Lowell S, Watt FM. 1999.** The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* **126:** 2409-2418.
- Jo D, Liu D, Yao S, Collins RD, Hawiger J. 2005.** Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat.Med.* **11:** 892-898.
- Jones PH, Watt FM. 1993.** Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* **73:** 713-724.
- Jones PH, Harper S, Watt FM. 1995.** Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* **80:** 83-93.
- Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJ, Ferguson MW. 2002.** Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet.Med.* **19:** 440-447.
- Kalani M, Brismar K, Fagrell B, Ostergren J, Jorneskog G. 1999.** Transcutaneous oxygen tension and toe blood pressure as predictors for outcome of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* **22:** 147-151.
- Kampfer H, Pfeilschifter J, Frank S. 2003.** Expression and activity of arginase isoenzymes during normal and diabetes-impaired skin repair. *J Invest Dermatol* **121:** 1544-1551.
- Kampfer H, Schmidt R, Geisslinger G, Pfeilschifter J, Frank S. 2005.** Wound inflammation in diabetic ob/ob mice: functional coupling of prostaglandin biosynthesis to cyclooxygenase-1 activity in diabetes-impaired wound healing. *Diabetes* **54:** 1543-1551.
- Kamura T, Maenaka K, Kotshiba S, Matsumoto M, Kohda D, Conaway RC, Conaway JW, Nakayama KI. 2004.** VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev.* **18:** 3055-3065.
- Katz BZ, Yamada KM. 1997.** Integrins in morphogenesis and signaling. *Biochimie* **79:** 467-476.
- Khavari TA, Rinn J. 2007.** Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia. *Cell Cycle* **6:** 2928-2931.
- Kim I, Mogford JE, Chao JD, Mustoe TA. 2001.** Wound epithelialization deficits in the transforming growth factor-alpha knockout mouse. *Wound.Repair Regen.* **9:** 386-390.

- Kim MH, Liu W, Borjesson DL, Curry FR, Miller LS, Cheung AL, Liu FT, Isseroff RR, Simon SI. 2008.** Dynamics of Neutrophil Infiltration during Cutaneous Wound Healing and Infection Using Fluorescence Imaging. *J Invest Dermatol*.
- Kirfel G, Herzog V. 2004.** Migration of epidermal keratinocytes: mechanisms, regulation, and biological significance. *Protoplasma* **223**: 67-78.
- Kitamura M. 1997.** Identification of an inhibitor targeting macrophage production of monocyte chemoattractant protein-1 as TGF-beta 1. *J Immunol*. **159**: 1404-1411.
- Koch RM, Roche NS, Parks WT, Ashcroft GS, Letterio JJ, Roberts AB. 2000.** Incisional wound healing in transforming growth factor-beta1 null mice. *Wound.Repair Regen*. **8**: 179-191.
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. 2005.** Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* **4**: 471-479.
- Korzon-Burakowska A, Edmonds M. 2006.** Role of the microcirculation in diabetic foot ulceration. *Int.J Low Extrem.Wounds*. **5**: 144-148.
- Kozak M. 1986.** Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283-292.
- Kozak M. 1987.** At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol.Biol*. **196**: 947-950.
- Krawczyk WS, Wilgram GF. 1973.** Hemidesmosome and desmosome morphogenesis during epidermal wound healing. *J.Ultrastruct.Res*. **45**: 93-101.
- Krebs DL, Hilton DJ. 2000.** SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci*. **113 ( Pt 16)**: 2813-2819.
- Krebs DL, Hilton DJ. 2001.** SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* **19**: 378-387.
- Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. 2003.** Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat.Immunol*. **4**: 1169-1176.
- Kulidjian AA, Inman R, Issekutz TB. 1999.** Rodent models of lymphocyte migration. *Semin.Immunol*. **11**: 85-93.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. 1993.** Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 770-774.
- Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM. 1991.** Stimulus specific induction of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gene expression. *Adv.Exp.Med.Biol*. **305**: 65-71.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larjava H, Salo T, Haapasalmi K, Kramer RH, Heino J. 1993.** Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J.Clin.Invest* **92**: 1425-1435.
- Lauer G, Sollberg S, Cole M, Flamme I, Sturzebecher J, Mann K, Krieg T, Eming SA. 2000.** Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* **115**: 12-18.
- Lauer G, Sollberg S, Cole M, Krieg T, Eming SA. 2002.** Generation of a novel proteolysis resistant vascular endothelial growth factor165 variant by a site-directed mutation at the plasmin sensitive cleavage site. *FEBS Lett*. **531**: 309-313.
- Laurens N, Koolwijk P, de Maat MP. 2006.** Fibrin structure and wound healing. *J.Thromb.Haemost*. **4**: 932-939.
- LEA Study group. 2000.** Epidemiology of lower extremity amputation in centres in Europe, North America and East Asia. The Global Lower Extremity Amputation Study Group. *Br.J Surg*. **87**: 328-337.

- Lee JL, Mukhtar H, Bickers DR, Kopelovich L, Athar M. 2003.** Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **192**: 294-306.
- Leibovich SJ, Ross R. 1975.** The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am.J Pathol.* **78**: 71-100.
- Li AG, Wang D, Feng XH, Wang XJ. 2004.** Latent TGFbeta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *EMBO J* **23**: 1770-1781.
- Li G, Gustafson-Brown C, Hanks SK, Nason K, Arbeit JM, Pogliano K, Wisdom RM, Johnson RS. 2003.** c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. *Dev.Cell* **4**: 865-877.
- Li J, Chen J, Kirsner R. 2007.** Pathophysiology of acute wound healing. *Clin.Dermatol.* **25**: 9-18.
- Li Y, Fan J, Chen M, Li W, Woodley DT. 2006.** Transforming growth factor-alpha: a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* **126**: 2096-2105.
- Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. 2003.** Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc.Biol.* **73**: 713-721.
- Ling E, Robinson DS. 2002.** Transforming growth factor-beta1: its anti-inflammatory and pro-fibrotic effects. *Clin.Exp.Allergy* **32**: 175-178.
- Lipsky BA, Berendt AR. 2000.** Principles and practice of antibiotic therapy of diabetic foot infections. *Diabetes Metab Res.Rev.* **16 Suppl 1**: S42-S46.
- Liu F, Yang T, Wang B, Zhang M, Gu N, Qiu J, Fan HQ, Zhang CM, Fei L, Pan XQ, Guo M, Chen RH, Guo XR. 2008.** Resistin induces insulin resistance, but does not affect glucose output in rat-derived hepatocytes. *Acta Pharmacol.Sin.* **29**: 98-104.
- Liu T, Dhanasekaran SM, Jin H, Hu B, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Phan SH. 2004.** FIZZ1 stimulation of myofibroblast differentiation. *Am.J Pathol.* **164**: 1315-1326.
- Liu X, Alexander V, Vijayachandra K, Bhogte E, Diamond I, Glick A. 2001.** Conditional epidermal expression of TGFbeta 1 blocks neonatal lethality but causes a reversible hyperplasia and alopecia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 9139-9144.
- Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. 2002.** Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* **45**: 1011-1016.
- Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. 2005.** Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes Care* **28**: 461-471.
- Loot MA, Kenter SB, Au FL, van Galen WJ, Middelkoop E, Bos JD, Mekkes JR. 2002.** Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur.J Cell Biol.* **81**: 153-160.
- Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. 1998.** Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* **111**: 850-857.
- Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, Eriksen KW, Woetmann A, Odum N. 2003.** Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol.Chem.* **278**: 16777-16781.
- Luetke NC, Qiu TH, Peiffer RL, Oliver P, Smithies O, Lee DC. 1993.** TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* **73**: 263-278.
- Lugovic L, Lipozenovic J, Jakic-Razumovic J. 2001.** Atopic dermatitis: immunophenotyping of inflammatory cells in skin lesions. *Int.J.Dermatol.* **40**: 489-494.

- Luster AD, Cardiff RD, MacLean JA, Crowe K, Granstein RD. 1998.** Delayed wound healing and disorganized neovascularization in transgenic mice expressing the IP-10 chemokine. *Proc.Assoc.Am.Physicians* **110**: 183-196.
- Luster AD, Alon R, von Andrian UH. 2005.** Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat.Immunol.* **6**: 1182-1190.
- Mack JA, Anand S, Maytin EV. 2005.** Proliferation and cornification during development of the mammalian epidermis. *Birth Defects Res.C.Embryo.Today* **75**: 314-329.
- Mackenzie IC. 1997.** Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *J.Invest Dermatol.* **109**: 377-383.
- Madlener M. 1998.** Differential expression of matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors in acute murine skin wounds. *Arch.Dermatol Res.* **290 Suppl**: S24-S29.
- Mann A, Breuhahn K, Schirmacher P, Blessing M. 2001.** Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J Invest Dermatol* **117**: 1382-1390.
- Marine JC, McKay C, Wang D, Topham DJ, Parganas E, Nakajima H, Pendeville H, Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A, Ihle JN. 1999a.** SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* **98**: 617-627.
- Marine JC, Topham DJ, McKay C, Wang D, Parganas E, Stravopodis D, Yoshimura A, Ihle JN. 1999b.** SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* **98**: 609-616.
- Martin P. 1997.** Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**: 75-81.
- Martin P, D'Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R, McKercher SR. 2003.** Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr.Biol.* **13**: 1122-1128.
- Martin P, Parkhurst SM. 2004.** Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* **131**: 3021-3034.
- Martin P, Leibovich SJ. 2005.** Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* **15**: 599-607.
- Maruoka Y, Harada H, Mitsuyasu T, Seta Y, Kurokawa H, Kajiyama M, Toyoshima K. 1997.** Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **238**: 886-890.
- Massague J. 1990.** The transforming growth factor-beta family. *Annu.Rev.Cell Biol.* **6**: 597-641.
- Massague J. 1999.** Wounding Smad. *Nat Cell Biol* **1**: E117-E119.
- Matoltsy AG, Viziám CB. 1970.** Further observations on epithelialization of small wounds: an autoradiographic study of incorporation and distribution of 3H-thymidine in the epithelium covering skin wounds. *J.Invest Dermatol.* **55**: 20-25.
- McClain SA, Simon M, Jones E, Nandi A, Gailit JO, Tonnesen MG, Newman D, Clark RA. 1996.** Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of granulation tissue induction. *Am.J.Pathol.* **149**: 1257-1270.
- McDevitt CA, Wildey GM, Cutrone RM. 2003.** Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa. *J Biomed.Mater.Res.A* **67**: 637-640.
- McKay MM, Morrison DK. 2007.** Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* **26**: 3113-3121.
- McMahon JH, Grigg MJ. 1995.** Predicting healing of lower limb ulcers. *Aust.N.Z.J Surg.* **65**: 173-176.
- Mendez-Samperio P, Hernandez-Garay M, Garcia-Martinez E. 2000.** Induction of apoptosis in bacillus Calmette-Guerin-activated T cells by transforming growth factor-beta. *Cell Immunol.* **202**: 103-112.
- Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. 2007.** Impaired wound healing. *Clin.Dermatol* **25**: 19-25.

- Metcalfe D, Greenhalgh CJ, Viney E, Willson TA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. 2000.** Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature* **405**: 1069-1073.
- Meyer T, Stockfleth E, Christophers E. 2007.** Immune response profiles in human skin. *Br.J Dermatol* **157 Suppl 2**: 1-7.
- Miyamoto S, Katz BZ, Lafrenie RM, Yamada KM. 1998.** Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **857**: 119-129.
- Miyazono K. 2000.** TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**: 15-22.
- Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH. 1991.** A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J* **10**: 1091-1101.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. 1982.** The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**: 11-24.
- Morales TI, Joyce ME, Sobel ME, Danielpour D, Roberts AB. 1991.** Transforming growth factor-beta in calf articular cartilage organ cultures: synthesis and distribution. *Arch.Biochem.Biophys.* **288**: 397-405.
- Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, Torisu T, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A. 2004.** Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat.Med.* **10**: 739-743.
- Mori R, Kondo T, Ohshima T, Ishida Y, Mukaida N. 2002.** Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *FASEB J* **16**: 963-974.
- Muhl H, Pfeilschifter J. 2003.** Endothelial nitric oxide synthase: a determinant of TNFalpha production by human monocytes/macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* **310**: 677-680.
- Muller WA. 2003.** Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* **24**: 327-334.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.
- Mural RJ, Adams MD, Myers EW, Smith HO, Miklos GL, Wides R, Halpern A, Li PW, Sutton GG, Nadeau J, Salzberg SL, Holt RA, Kodira CD, Lu F, Chen L, Deng Z, Evangelista CC, Gan W, Heiman TJ, Li J, Li Z, Merkulov GV, Milshina NV, Naik AK, Qi R, Shue BC, Wang A, Wang J, Wang X, Yan X, Ye J, Yooseph S, Zhao Q, Zheng L, Zhu SC, Biddick K, Bolanos R, Delcher AL, Dew IM, Fasulo D, Flanigan MJ, Huson DH, Kravitz SA, Miller JR, Mobarry CM, Reinert K, Remington KA, Zhang Q, Zheng XH, Nusskern DR, Lai Z, Lei Y, Zhong W, Yao A, Guan P, Ji RR, Gu Z, Wang ZY, Zhong F, Xiao C, Chiang CC, Yandell M, Wortman JR, Amanatides PG, Hladun SL, Pratts EC, Johnson JE, Dodson KL, Woodford KJ, Evans CA, Gropman B, Rusch DB, Venter E, Wang M, Smith TJ, Houck JT, Tompkins DE, Haynes C, Jacob D, Chin SH, Allen DR, Dahlke CE, Sanders R, Li K, Liu X, Levitsky AA, Majoros WH, Chen Q, Xia AC, Lopez JR, Donnelly MT, Newman MH, Glodek A, Kraft CL, Nodell M, Ali F, An HJ, Baldwin-Pitts D, Beeson KY, Cai S, Carnes M, Carver A, Caulk PM, Center A, Chen YH, Cheng ML, Coyne MD, Crowder M, Danaher S, Davenport LB, Desilets R, Dietz SM, Doup L, Dullaghan P, Ferriera S, Fosler CR, Gire HC, Gluecksmann A, Gocayne JD, Gray J, Hart B, Haynes J, Hoover J, Howland T, Ibegwam C, Jalali M, Johns D, Kline L, Ma DS, MacCawley S, Magoon A, Mann F, May D, McIntosh TC, Mehta S, Moy L, Moy MC, Murphy BJ, Murphy SD, Nelson KA, Nuri Z, Parker KA, Prudhomme AC, Puri VN, Qureshi H, Raley JC, Reardon MS, Regier MA, Rogers YH, Romblad DL, Schutz J, Scott JL, Scott R, Sitter CD, Smallwood M, Sprague AC, Stewart E, Strong RV, Suh E, Sylvester K, Thomas R, Tint NN, Tsonis C, Wang G, Wang G, Williams MS, Williams SM, Windsor SM, Wolfe K, Wu MM, Zaveri J, Chaturvedi K, Gabrielian AE, Ke Z, Sun J, Subramanian G, Venter JC,**

- Pfannkoch CM, Barnstead M, Stephenson LD. 2002.** A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science* **296**: 1661-1671.
- Murray PJ. 2006.** Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr.Opin.Pharmacol.* **6**: 379-386.
- Murray PJ. 2007.** The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol.* **178**: 2623-2629.
- Mustoe T. 2004.** Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am.J Surg.* **187**: 65S-70S.
- Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O. 2006.** Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast.Reconstr.Surg.* **117**: 35S-41S.
- Nagai H, Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Yang L, Hashimoto K. 2007.** Suppressor of cytokine signaling 3 negative regulation of signal transducer and activator of transcription 3 in platelet-derived growth factor-induced fibroblast migration. *J Dermatol* **34**: 523-530.
- Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T. 1997.** Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**: 924-929.
- Nakamura K, Kitani A, Strober W. 2001.** Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp.Med.* **194**: 629-644.
- Nelson WG, Sun TT. 1983.** The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *The Journal of Cell Biology* **97**: 244-251.
- Nestle FO, Nickoloff BJ. 1995.** Dermal dendritic cells are important members of the skin immune system. *Adv.Exp.Med.Biol.* **378**: 111-116.
- Neufang G, Furstenberger G, Heidt M, Marks F, Muller-Decker K. 2001.** Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 7629-7634.
- Newman SL, Henson JE, Henson PM. 1982.** Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J.Exp.Med.* **156**: 430-442.
- Nickoloff BJ, Mitra RS, Riser BL, Dixit VM, Varani J. 1988.** Modulation of keratinocyte motility. Correlation with production of extracellular matrix molecules in response to growth promoting and antiproliferative factors. *Am.J Pathol.* **132**: 543-551.
- Nickoloff BJ. 2006.** Keratinocytes regain momentum as instigators of cutaneous inflammation. *Trends Mol.Med.* **12**: 102-106.
- Niemand C, Nimmesgern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, Heinrich PC, Muller-Newen G. 2003.** Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol.* **170**: 3263-3272.
- Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. 1992.** Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. *J.Cell Physiol* **153**: 1-5.
- Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, Saiura A, Matsubara K, Kitagawa T, Yamamoto J, Kubo T, Yoshikawa H. 2005.** Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **24**: 6406-6417.
- Noli C, Miolo A. 2001.** The mast cell in wound healing. *Vet.Dermatol.* **12**: 303-313.
- Nomura T, Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Nomura H, Hagino Y, Fujita K, Nagatsu T. 1993.** Cloning and sequencing of cDNA encoding mouse GTP cyclohydrolase I. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **191**: 523-527.
- O'Kane S, Ferguson MW. 1997.** Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **29**: 63-78.



- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. 2002.** Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109 Suppl:** S121-S131.
- O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC. 2007.** Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol.Immunol.* **44:** 2497-2506.
- Ochoa O, Torres FM, Shireman PK. 2007.** Chemokines and diabetic wound healing. *Vascular.* **15:** 350-355.
- Ogata H, Kobayashi T, Chinen T, Takaki H, Sanada T, Minoda Y, Koga K, Takaesu G, Maehara Y, Iida M, Yoshimura A. 2006.** Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* **131:** 179-193.
- Oida T, Xu L, Weiner HL, Kitani A, Strober W. 2006.** TGF-beta-mediated suppression by CD4+CD25+ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling. *J Immunol.* **177:** 2331-2339.
- Ortonne JP, Loning T, Schmitt D, Thivolet J. 1981.** Immunomorphological and ultrastructural aspects of keratinocyte migration in epidermal wound healing. *Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histol.* **392:** 217-230.
- Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA. 1996.** Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *The Journal of Cell Biology* **132:** 381-397.
- Park JE, Barbul A. 2004.** Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am.J Surg.* **187:** 11S-16S.
- Parks WC. 1999.** Matrix metalloproteinases in repair. *Wound.Repair Regen.* **7:** 423-432.
- Patel GK, Wilson CH, Harding KG, Finlay AY, Bowden PE. 2006.** Numerous keratinocyte subtypes involved in wound re-epithelialization. *J.Invest Dermatol.* **126:** 497-502.
- Peirce SM, Skalak TC, Rodeheaver GT. 2000.** Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound.Repair Regen.* **8:** 68-76.
- Peltola KJ, Pauku K, Aho TL, Ruuska M, Silvennoinen O, Koskinen PJ. 2004.** Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood* **103:** 3744-3750.
- Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS, Palladino MA, Goeddel DV. 1985.** Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82:** 6060-6064.
- Peraldi P, Filloux C, Emanuelli B, Hilton DJ, Van Obberghen E. 2001.** Insulin induces suppressor of cytokine signaling-3 tyrosine phosphorylation through janus-activated kinase. *J Biol.Chem.* **276:** 24614-24620.
- Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. 1991.** Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88:** 10480-10484.
- Postlethwaite AE, Kang AH. 1976.** Collagen-and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes. *J.Exp.Med.* **143:** 1299-1307.
- Potten CS. 1981.** Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Int.Rev.Cytol.* **69:** 271-318.
- Prele CM, Keith-Magee AL, Yerkovich ST, Murcha M, Hart PH. 2006.** Suppressor of cytokine signalling-3 at pathological levels does not regulate lipopolysaccharide or interleukin-10 control of tumour necrosis factor-alpha production by human monocytes. *Immunology* **119:** 8-17.
- Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T. 1995.** Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat.Genet.* **11:** 409-414.
- Qasimi P, Ming-Lum A, Ghanipour A, Ong CJ, Cox ME, Ihle J, Cacalano N, Yoshimura A, Mui AL. 2006.** Divergent mechanisms utilized by SOCS3 to mediate interleukin-10 inhibition of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production by macrophages. *J Biol.Chem.* **281:** 6316-6324.

- Quadros MR, Peruzzi F, Kari C, Rodeck U. 2004.** Complex regulation of signal transducers and activators of transcription 3 activation in normal and malignant keratinocytes. *Cancer Res.* **64**: 3934-3939.
- Ramirez A, Bravo A, Jorcano JL, Vidal M. 1994.** Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation* **58**: 53-64.
- Reichner JS, Meszaros AJ, Louis CA, Henry WL, Jr., Mastrofrancesco B, Martin BA, Albina JE. 1999.** Molecular and metabolic evidence for the restricted expression of inducible nitric oxide synthase in healing wounds. *Am.J Pathol.* **154**: 1097-1104.
- Rico L, Del Rio M, Bravo A, Ramirez A, Jorcano JL, Page MA, Larcher F. 2005.** Targeted overexpression of leptin to keratinocytes in transgenic mice results in lack of skin phenotype but induction of early leptin resistance. *Endocrinology* **146**: 4167-4176.
- Ring BD, Scully S, Davis CR, Baker MB, Cullen MJ, Pelleymounter MA, Danilenko DM. 2000.** Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice. *Endocrinology* **141**: 446-449.
- Roberts AW, Robb L, Rakar S, Hartley L, Cluse L, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Alexander WS. 2001.** Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 9324-9329.
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF. 2000.** The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**: 5548-5557.
- Robson MC. 1997.** Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surg.Clin.North Am.* **77**: 637-650.
- Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. 1994.** Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* **76**: 1063-1073.
- Rollins BJ, Morrison ED, Stiles CD. 1988.** Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**: 3738-3742.
- Ronnov-Jessen L, Petersen OW. 1993.** Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest* **68**: 696-707.
- Rosner K, Ross C, Karlsmark T, Petersen AA, Gottrup F, Vejlsgaard GL. 1995.** Immunohistochemical characterization of the cutaneous cellular infiltrate in different areas of chronic leg ulcers. *APMIS* **103**: 293-299.
- Roth D, Piekarek M, Paulsson M, Christ H, Bloch W, Krieg T, Davidson JM, Eming SA. 2006.** Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. *Am.J Pathol.* **168**: 670-684.
- Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. 2002.** SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem.* **277**: 42394-42398.
- Rulicke T, Hubscher U. 2000.** Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Exp.Physiol* **85**: 589-601.
- Rzepka K, Schaarschmidt G, Nagler M, Wohlrab J. 2005.** [Epidermal stem cells]. *J.Dtsch.Dermatol.Ges.* **3**: 962-973.
- Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, Miyamoto T, Ohnishi Y, Sato M, Muragaki Y, Ooshima A, Nakajima Y, Kao WW, Flanders KC, Roberts AB. 2005.** Expression of Smad7 in mouse eyes accelerates healing of corneal tissue after exposure to alkali. *Am.J Pathol.* **166**: 1405-1418.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. 1997.** TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* **124**: 2659-2670.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**: 5463-5467.
- Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, Yoshikawa K, Akira S, Takeda J. 1999.** Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J* **18**: 4657-4668.
- Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, Itami S, Nickoloff BJ, DiGiovanni J. 2005.** Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med.* **11**: 43-49.
- Santoro MM, Gaudino G, Marchisio PC. 2003.** The MSP receptor regulates alpha6beta4 and alpha3beta1 integrins via 14-3-3 proteins in keratinocyte migration. *Dev.Cell* **5**: 257-271.
- Santoro MM, Gaudino G. 2005.** Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp.Cell Res.* **304**: 274-286.
- Sarret Y, Woodley DT, Grigsby K, Wynn K, O'Keefe EJ. 1992.** Human keratinocyte locomotion: the effect of selected cytokines. *J Invest Dermatol* **98**: 12-16.
- Sato M, Sawamura D, Ina S, Yaguchi T, Hanada K, Hashimoto I. 1999a.** In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form. *Arch.Dermatol Res.* **291**: 400-404.
- Sato Y, Ohshima T, Kondo T. 1999b.** Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **265**: 194-199.
- Schluesener H, Jung S, Salvetti M. 1990.** Susceptibility and resistance of human autoimmune T cell activation to the immunoregulatory effects of transforming growth factor (TGF) beta 1, beta 2, and beta 1.2. *J Neuroimmunol.* **28**: 271-276.
- Schmid P, Cox D, Bilbe G, McMaster G, Morrison C, Stahelin H, Luscher N, Seiler W. 1993.** TGF-beta s and TGF-beta type II receptor in human epidermis: differential expression in acute and chronic skin wounds. *J Pathol.* **171**: 191-197.
- Schneider MR, Wolf E. 2005.** Genotyping of transgenic mice: old principles and recent developments. *Anal.Biochem.* **344**: 1-7.
- Schramm JC, Dinh T, Veves A. 2006.** Microvascular changes in the diabetic foot. *Int.J Low Extrem.Wounds.* **5**: 149-159.
- Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K, Cacalano N, O'Garra A, Oshida T, Saito H, Johnston JA, Yoshimura A, Kubo M. 2003.** SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. *Nat Med.* **9**: 1047-1054.
- Sellheyer K, Bickenbach JR, Rothnagel JA, Bundman D, Longley MA, Krieg T, Roche NS, Roberts AB, Roop DR. 1993.** Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 5237-5241.
- Serhan CN, Savill J. 2005.** Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat.Immunol.* **6**: 1191-1197.
- Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. 1995.** Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci.* **108 ( Pt 3)**: 985-1002.

- Sherry B, Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, Davatelis G, Wolpe SD, Masiarz F, Coit D, Cerami A. 1988.** Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. *J.Exp.Med.* **168**: 2251-2259.
- Shi H, Tzamei I, Bjorbaek C, Flier JS. 2004.** Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling. *J Biol.Chem.* **279**: 34733-34740.
- Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A. 2001.** Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin.Invest* **108**: 1781-1788.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, . 1992.** Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**: 693-699.
- Silleit HK, Cruickshank SM, Southgate J, Trejdosiewicz LK. 2001.** Transforming growth factor-beta promotes 'death by neglect' in post-activated human T cells. *Immunology* **102**: 310-316.
- Simpson DM, Ross R. 1972a.** The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J Clin.Invest* **51**: 2009-2023.
- Simpson DM, Ross R. 1972b.** The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J.Clin.Invest* **51**: 2009-2023.
- Singer AJ, Clark RA. 1999.** Cutaneous wound healing. *N.Engl.J.Med.* **341**: 738-746.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* **150**: 76-85.
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. 1996.** Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* **271**: 33157-33160.
- Southern EM. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol.Biol* **98**: 503-517.
- Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, Accili D, Tennenbaum T, Wertheimer E. 2001.** Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. *Diabetes* **50**: 1627-1635.
- Springer TA. 1994.** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**: 301-314.
- Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S. 1999.** The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol.* **113**: 1090-1098.
- Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. 2001.** Systemically and topically supplemented leptin fails to reconstitute a normal angiogenic response during skin repair in diabetic ob/ob mice. *Diabetologia* **44**: 471-479.
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. 1997.** A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**: 917-921.
- Stoeck M, Sommermeyer H, Miescher S, Cox D, Alkan S, Szamel M. 1989.** Transforming growth factors beta 1 and beta 2 as well as milk growth factor decrease anti-CD3-induced proliferation of human lymphocytes without inhibiting the anti-CD3-mediated increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and the activation of protein kinase C. *FEBS Lett.* **249**: 289-292.
- Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M, Merchant A, Galiano RD, Tomic-Canic M. 2005.** Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am.J Pathol.* **167**: 59-69.

- Sullivan KM, Lorenz HP, Meuli M, Lin RY, Adzick NS. 1995.** A model of scarless human fetal wound repair is deficient in transforming growth factor beta. *J.Pediatr.Surg.* **30**: 198-202.
- Sun TT, Eichner R, Nelson WG, Tseng SC, Weiss RA, Jarvinen M, Woodcock-Mitchell J. 1983.** Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J Invest Dermatol* **81**: 109s-115s.
- Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A. 2001.** CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp.Med.* **193**: 471-481.
- Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunning KB, Hanten G, Fox RR, Roderick TH, Stewart CL, Lilly F, Hansen CT, . 1991.** FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**: 2065-2069.
- Talts JF, Brakebusch C, Fassler R. 1999.** Integrin gene targeting. *Methods Mol.Biol* **129**: 153-187.
- Tan NS, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. 2005.** Genetic- or transforming growth factor-beta 1-induced changes in epidermal peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta expression dictate wound repair kinetics. *J.Biol.Chem.* **280**: 18163-18170.
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. 2000.** Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* **102**: 451-461.
- Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Pure E, Henson PM, Noble PW. 2002.** Resolution of lung inflammation by CD44. *Science* **296**: 155-158.
- Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, McClain J, Sherry B, Fabre M, van Deventer S, Cerami A. 1990.** Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues. *J Exp.Med.* **172**: 911-919.
- Temin HM, Mizutani S. 1970.** RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**: 1211-1213.
- ten Dijke P, Arthur HM. 2007.** Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **8**: 857-869.
- Theoret CL, Barber SM, Gordon JR. 2002.** Temporal localization of immunoreactive transforming growth factor beta1 in normal equine skin and in full-thickness dermal wounds. *Vet.Surg.* **31**: 274-280.
- Thrash BR, Menges CW, Pierce RH, McCance DJ. 2006.** AKT1 provides an essential survival signal required for differentiation and stratification of primary human keratinocytes. *J Biol.Chem.* **281**: 12155-12162.
- Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. 2001.** Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin.Invest* **108**: 15-23.
- Timpl R. 1996.** Macromolecular organization of basement membranes. *Curr.Opin.Cell Biol.* **8**: 618-624.
- Tokumar S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Nagai H, Yang L, Higashiyama S, Yoshimura A, Sugai M, Hashimoto K. 2005a.** Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J Immunol.* **175**: 4662-4668.
- Tokumar S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, Hashimoto K. 2005b.** SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **327**: 100-105.
- Tokura Y, Kobayashi M, Kabashima K. 2008.** Epidermal chemokines and modulation by antihistamines, antibiotics and antifungals. *Exp.Dermatol.* **17**: 81-90.
- Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH. 2004a.** Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion. *Ann.Transplant.* **9**: 81-83.

- Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F. 2004b.** Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp.Clin.Transplant.* **2:** 174-177.
- Tollet-Egnell P, Flores-Morales A, Stavreus-Evers A, Sahlin L, Norstedt G. 1999.** Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* **140:** 3693-3704.
- Torisu T, Sato N, Yoshiga D, Kobayashi T, Yoshioka T, Mori H, Iida M, Yoshimura A. 2007.** The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance in vivo. *Genes Cells* **12:** 143-154.
- Tredget EB, Demare J, Chandran G, Tredget EE, Yang L, Ghahary A. 2005.** Transforming growth factor-beta and its effect on reepithelialization of partial-thickness ear wounds in transgenic mice. *Wound.Repair Regen.* **13:** 61-67.
- Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, Schultz G. 1999.** Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound.Repair Regen.* **7:** 442-452.
- Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. 2000.** Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound.Repair Regen.* **8:** 13-25.
- Turksen K, Kupper T, Degenstein L, Williams I, Fuchs E. 1992.** Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89:** 5068-5072.
- Ueki K, Kadowaki T, Kahn CR. 2005.** Role of suppressors of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hepatology*. **33:** 185-192.
- Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, Karjalainen-Lindsberg ML, Kahari VM, Saarialho-Kere U. 1997.** Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *J Invest Dermatol* **109:** 96-101.
- Wagner TE, Hoppe PC, Jollick JD, Scholl DR, Hodinka RL, Gault JB. 1981.** Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78:** 6376-6380.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. 1987.** Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84:** 5788-5792.
- Wahl SM. 1992.** Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. *J Clin.Immunol.* **12:** 61-74.
- Wahl SM, Costa GL, Mizel DE, Allen JB, Skaleric U, Mangan DF. 1993.** Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J Periodontol.* **64:** 450-455.
- Wahl SM. 1994.** Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp.Med.* **180:** 1587-1590.
- Wahl SM, Orenstein JM, Chen W. 2000.** TGF-beta influences the life and death decisions of T lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11:** 71-79.
- Wall IB, Davies CE, Hill KE, Wilson MJ, Stephens P, Harding KG, Thomas DW. 2002.** Potential role of anaerobic cocci in impaired human wound healing. *Wound.Repair Regen.* **10:** 346-353.
- Wall RJ. 2001.** Pronuclear microinjection. *Cloning Stem Cells* **3:** 209-220.
- Wang XJ, Han G, Owens P, Siddiqui Y, Li AG. 2006.** Role of TGF[beta]-Mediated Inflammation in Cutaneous Wound Healing. *J Invest Dermatol Symp P* **11:** 112-117.
- Watt FM. 1989.** Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr.Opin.Cell Biol.* **1:** 1107-1115.
- Weiss SJ. 1989.** Tissue destruction by neutrophils. *N.Engl.J Med.* **320:** 365-376.
- Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. 2006.** Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J.* **20:** 2366-2368.

- Werner F, Jain MK, Feinberg MW, Sibinga NE, Pellacani A, Wiesel P, Chin MT, Topper JN, Perrella MA, Lee ME. 2000.** Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem.* **275**: 36653-36658.
- Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT. 1994.** The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* **266**: 819-822.
- Werner S. 1998.** Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**: 153-165.
- Werner S, Smola H. 2001.** Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol.* **11**: 143-146.
- Werner S, Grose R. 2003.** Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* **83**: 835-870.
- Werner S, Krieg T, Smola H. 2007.** Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* **127**: 998-1008.
- Wertheimer E, Spravchikov N, Trebicz M, Gartsbein M, Accili D, Avinoah I, Nofeh-Moses S, Sizyakov G, Tennenbaum T. 2001.** The regulation of skin proliferation and differentiation in the IR null mouse: implications for skin complications of diabetes. *Endocrinology* **142**: 1234-1241.
- Wetzler C, Kampfer H, Pfeilschifter J, Frank S. 2000a.** Keratinocyte-derived chemotactic cytokines: expressional modulation by nitric oxide in vitro and during cutaneous wound repair in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **274**: 689-696.
- Wetzler C, Kampfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. 2000b.** Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol* **115**: 245-253.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004.** Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**: 1047-1053.
- Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. 2004.** Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology* **113**: 281-292.
- Wlaschek M, Peus D, Achterberg V, Meyer-Ingold W, Scharffetter-Kochanek K. 1997.** Protease inhibitors protect growth factor activity in chronic wounds. *Br.J Dermatol* **137**: 646.
- Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. 2005.** Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound.Repair Regen.* **13**: 452-461.
- Wormald S, Hilton DJ. 2004.** Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem.* **279**: 821-824.
- Wrench R. 1981.** Scale prophylaxis. A new antiparakeratotic assay. *Arch.Dermatol* **117**: 213-215.
- Yamasaki K, Hanakawa Y, Tokumaru S, Shirakata Y, Sayama K, Hanada T, Yoshimura A, Hashimoto K. 2003.** Suppressor of cytokine signaling 1/JAB and suppressor of cytokine signaling 3/cytokine-inducible SH2 containing protein 3 negatively regulate the signal transducers and activators of transcription signaling pathway in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **120**: 571-580.
- Yang L, Chan T, Demare J, Iwashina T, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. 2001.** Healing of burn wounds in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in the epidermis. *Am.J Pathol.* **159**: 2147-2157.
- Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A. 2003.** IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat.Immunol.* **4**: 551-556.
- Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. 2000.** Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu.Rev.Immunol.* **18**: 143-164.

- Yoshimura A, Nishinakamura H, Matsumura Y, Hanada T. 2005.** Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Res.Ther.* **7**: 100-110.
- Yoshimura A, Naka T, Kubo M. 2007.** SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev.Immunol.* **7**: 454-465.
- Yosipovitch G, DeVore A, Dawn A. 2007.** Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. *J Am.Acad.Dermatol* **56**: 901-916.
- Zhang L, Badgwell DB, Bevers JJ, III, Schlessinger K, Murray PJ, Levy DE, Watowich SS. 2006.** IL-6 signaling via the STAT3/SOCS3 pathway: functional analysis of the conserved STAT3 N-domain. *Mol.Cell Biochem.* **288**: 179-189.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-432.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. 1994.** Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **264**: 95-98.
- Zhu BM, Ishida Y, Robinson GW, Pacher-Zavisin M, Yoshimura A, Murphy PM, Hennighausen L. 2008.** SOCS3 Negatively Regulates the gp130-STAT3 Pathway in Mouse Skin Wound Healing. *J Invest Dermatol.*



## VII ANHANG

### 1 Abkürzungsverzeichnis

aFGF	acidic fibroblast growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
COX	Cyclooxygenase
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
FIZZ1/RELM	resistin-like molecule
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	granulozyte-macrophage colony stimulating factor
HB-EGF	heparin-binding epidermal growth-like factor
HE	hyperproliferierendes Epithel
HGF	hepatocyte growth factor
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
JAK	Janus Kinase
KGF	keratinocyte growth factor
KIR	kinase inhibiting region
LAP	latency-associated protein
LPS	Lipopolysaccharide
LTBP	latent TGF- $\beta$ -binding protein
MCP	monocyte chemoattractant protein
MIP	macrophage inflammatory protein
MMP	Matrixmetalloproteinase
nTreg	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-Zellen
PDGF	platelet-derived growth factor
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
RPA	RNase protection assay (RNase-Verdauerschutzanalyse)
RTK	Rezeptortyrosinkinase

SMAD	small mothers against decapentaplegic
SOCS	suppressor of cytokine signaling
STAT	signal transducer and activator of transcription
TGF	transforming growth factor
TIMPs	tissue inhibitors of metalloproteinases
TLR	toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	tissue-type plasminogen activator
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp

## 2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. I.2:</b>	Schematische Darstellung der epidermalen Schichtung	<b>2</b>
<b>Abb. I.3:</b>	Die vier Phasen der Wundheilung und die jeweils prädominierenden Zelltypen sowie eine Auswahl heilungsrelevanter Prozesse in Relation zur Zeit	<b>6</b>
<b>Abb. I.4:</b>	Schematische Darstellung der JAK-STAT-Signalkaskade und deren Hemmung durch negative Rückkopplung über SOCS-Proteine	<b>20</b>
<b>Abb. III.1:</b>	Regulation der SOCS3-Expression im Heilungsprozess gesunder Wildtyp-Mäuse	<b>62</b>
<b>Abb. III.2:</b>	Lokalisierung SOCS3- und Ki67-positiver Zellen am Wundrand normal heilender Wunden	<b>64</b>
<b>Abb. III.3:</b>	SOCS3 und Ki67-Expression in diabetisch-gestörter Wundheilung an Tag 13	<b>67</b>
<b>Abb. III.4:</b>	Schematische Darstellung des transgenen Konstruktes in <i>pBKS(+)/K5-SOCS3</i>	<b>69</b>
<b>Abb. III.5:</b>	Genotypisierung der Founder-Generation	<b>70</b>
<b>Abb. III.6:</b>	SOCS3-Proteinexpression in Tieren der F1-Generation	<b>73</b>
<b>Abb. III.7:</b>	Organspezifität der Transgenexpression	<b>75</b>
<b>Abb. III.8:</b>	Hautmorphologische Untersuchung und Lokalisierung SOCS3-exprimierender Zellen	<b>76</b>
<b>Abb. III.9:</b>	Glukosetoleranztest	<b>78</b>
<b>Abb. III.10:</b>	Expression von SOCS3 in primären Keratinozyten und vollständige Blockade der IL-6-vermittelten STAT-3-Aktivierung	<b>80</b>
<b>Abb. III.11:</b>	Keratinozytenmigration und -proliferation	<b>82</b>
<b>Abb. III.12:</b>	Semiquantitative RT-PCR gegen Keratin 10 und Vergleich der Zellmorphologie	<b>84</b>
<b>Abb. III.13:</b>	Immunhistochemische Färbung gegen Ki67 und Loricrin	<b>85</b>
<b>Abb. III.14:</b>	Verzögerte Wundheilung in transgenen Tieren	<b>87</b>
<b>Abb. III.15:</b>	Vergleich der Zellzahlen in den hyperproliferierenden Epithelien transgener und nicht-transgener Tiere am fünften Heilungstag	<b>89</b>

<b>ANHANG</b>	<b>170</b>
<b>Abb. III.16:</b> Histologischer Wundquerschnitt an den Tagen 5 und 7 nach Verletzung	<b>89</b>
<b>Abb. III.17:</b> Immunhistochemische Färbung gegen BrdU, Ki67 und Loricrin in Tag 5-Wunden	<b>93</b>
<b>Abb. III.18:</b> Expression klassischer proinflammatorischer Zytokine im Wundgewebe	<b>95</b>
<b>Abb. III.19:</b> Expressionskinetik chemotaktischer Zytokine im Wundgewebe	<b>97</b>
<b>Abb. III.20:</b> Lokalisierung MCP-1/CCL-2-positiver Zellen im Wundareal 5 Tage nach Verletzung	<b>99</b>
<b>Abb. III.21:</b> Lokalisierung MIP-2/CXCL-2-positiver Zellen im Wundgewebe 5 Tage nach Verletzung	<b>100</b>
<b>Abb. III.22:</b> Anhaltende Präsenz von Immunzellen in Wunden transgener Tiere	<b>103</b>
<b>Abb. III.23:</b> Lokalisierung von Immunzellen in Tag 7-Wunden	<b>103</b>
<b>Abb. III.24:</b> Regulation von COX-2 und iNOS im Heilungsverlauf transgener und nicht-transgener Tiere	<b>106</b>
<b>Abb. III.25:</b> Lokalisierung COX-2 exprimierender Zellen im Wundgewebe nicht-transgener und transgener Tiere 5 Tage nach Verwundung	<b>107</b>
<b>Abb. III.26:</b> Lokalisierung iNOS-exprimierender Zellen in Tag 5-Wunden nicht-transgener und transgener Tiere	<b>107</b>
<b>Abb. III.27:</b> Regulation der TGF- $\beta$ 1-Expression im Verlauf der Wundheilung	<b>112</b>
<b>Abb. III.28:</b> TGF- $\beta$ 1-mRNA Expression in Wunden diabetischer <i>ob/ob</i> -Mäuse	<b>113</b>
<b>Abb. III.29:</b> Kultivierte primäre Keratinozyten sezernieren NO, MCP-1/CCL-2 und MIP-2/CXCL-2 und reagieren auf externes TGF- $\beta$ 1	<b>116</b>
<b>Abb. III.30:</b> Die systemische Neutralisierung von TGF- $\beta$ beschleunigt die Wundheilung im transgenen Tier	<b>118</b>
<b>Abb. III.31:</b> Histologischer Wundquerschnitt von Tag-5-Wunden transgener Tiere nach anti-TGF $\beta$ - und Kontroll-IgG-Behandlung	<b>119</b>
<b>Abb. III.32:</b> Immunhistochemische Färbung gegen Ki67 in Tag 5-Wunden antikörper-behandelter transgener Tiere	<b>120</b>
<b>Abb. III.33:</b> mRNA-Expressionsspiegel ausgewählter Entzündungsmarker in Tag 5-Wunden anti-TGF- $\beta$ und Krtl-IgG behandelte Tiere	<b>123</b>
<b>Abb. III.34:</b> Immunhistochemische Färbung gegen GR-1 und F4/80 in Tag 5-Wunden anti-TGF- $\beta$ und Krtl-IgG behandelte transgener Tiere	<b>124</b>
<b>Abb. V.1:</b> Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse	<b>145</b>

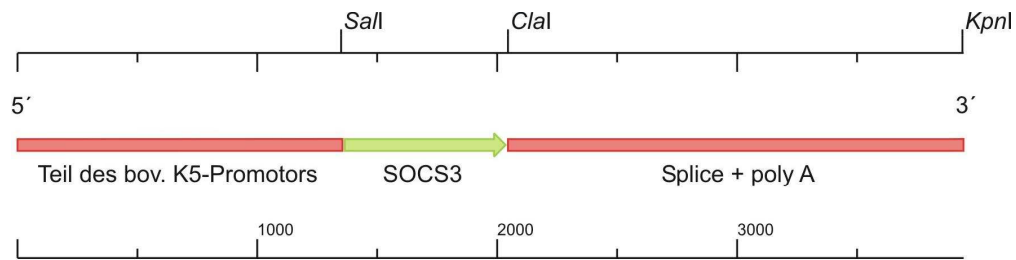
### **3 Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. I.1:</b> Übersicht verschiedener pathogener Faktoren, deren Zusammentreffen häufig zur Entstehung chronischer Wundheilungsstörungen führt	<b>14</b>
<b>Tab. I.2:</b> Übersicht einer Auswahl pathogener Veränderungen in der JAK-STAT-SOCS-Signalkaskade im Kontext metabo-licher, entzündlicher und maligner Erkrankungen	<b>22</b>

## 4 Genkarte und Sequenz des transgenen Konstruktes

Im Gegensatz zur 3'-UTR ist die Sequenz der 5'-UTR des bovinen Keratin 5-Genes bislang nicht bekannt. Im Folgenden ist daher nur eine Teilsequenz des transgenen Konstruktes aufgeführt ist.

### 4.1 Genkarte



Teil des transgenen Konstruktes (3944 bps)

### 4.2 Sequenz

```

1  aagcttactg ggagctgggc tgagagtgct tcttaaaaca actggcaggt agtcaggcca gctgcctggt
   ttcgaatgac cctcgaccgc actctcacga agaattttgt tgaccgtcca tcagtcgggt cgacggacca

71  tacccaaacc tgccccttct agtctctctg gagggatgat ccatagattt agaactgctt ttccatcccc
   atgggtttgg acggggaaga tcagagagac ctccctacta ggtatctaaa tcttgacgaa aaggtagggg

141 ccagccctga aggagggttc aggctgaagc tgagagaaaa gccagcaat tcccgtgctt tggaaacgggg
   ggtcgggact tcttcccaag tccgacttct actctctttt cgggtcgtta agggcgacga accttgcccc

211 tggtttgccg ttataacagg ctggccgact ctcgacatgt tcttgacgag attaggaact cctgcaggta
   accaaacggc aatattgtcc gaccggctga gagctgtaca aggactgctc taatccttga ggacgtccat

281 tgtgtttggt gcggccttca gctgtatca acagatacga tgactcattt cttccttagt ggaatcacca
   acacaaacac cgccggaagt cggacatagt tgtctatgct actgagtaaa gaaggaatca ccttagtggt

351 agggcttgct ggaacacacc tggggggctg gggagcgggc agagcagctc cccctgaaga gagacgtgac
   tcccgaacga ccttgtgtgg acccccgcac cctcgcgcgc tctcgtcgag ggggacttct ctctgcactg

421 tgccaggtag agtcacagga ttctggggga gggttgatgg caagggggcc ctgggtttgc tacgccccct
   acggtccacc tcagtgtcct aagaccacct cccaactacc gttcccccg gaccctaacg atgcggggga

491 ctgggacctg cctgggccaa agggcaagga aaaagttcaa tgcagcagaa aaggctgaat taggaggcgt
   gaccctggac ggaccgggtt tcccgttctt ttttcaagtt acgtcgtctt tccgactta atcctccgca

561 tgtggtggga tgggtctgtc cctccagaga gcaaagtggg atagaccagg ggctgagggg ggtccacagt
   acaccacctt acccagacag ggaggtctct cgtttcacc tctctggtcc cggactccca ccaggtgtca

631 ctctgtttct ggaacttggg tcttggggag actttctggt ccaaactctt caggagaatc tgcccagcag
   gagacaaaga ccttgaacca agaaccctct tgaaagacca ggtttagaac gtcctcttag acgggtcgtc

701 gctctgatgt aactgtgctt cctctaagaa atggagtttt gcagtatgtg atggaaatct attttccct
   cgagactaca ttgacacgga ggagattctt tacctcaaaa cgtcatacac tacctttaga taaaagggga

771 ctggcacaga gtggagagat caggccacag ctggccttcc aagggctgaa gtcctgaag caagctctcc
   gaccgtgtct cacctctcta gtcgggtgtc gacgaaagg ttcccgactt cagggacttc gttcagagag

841 ctaaaggaat aagcagagca gaccactgcc agtgggggac tcgctctgcc cctgtttca tggatagtgt

```

gatttccctta ttcgtctcgt ctgggtgacgg tcaccccctg agcgagacgg gggacaaagt acctatcaca  
 911 gcaatgtgct gcaatgtttg atgacattcc tgtcctgaag gatctttcag gatcttggcc aaatgcccc  
 cgttacacga cgttacaaac tactgtaagg acaggacttc ctagaaagtc ctagaaccgg tttacggggg  
 981 ttgcttccca gcacccttct ttgggctact cacagcccta ggccccggct gtaaagaaa atttgctggc  
 aacgaagggt cgtgggaaga aaccgatga gtgtcgggat ccggggccga catttctttc taaacgaccg  
 1051 agcatggcct attcgctgcc aagacatcag ggctgcaagg caagtttatc cctgctgagc agagacctgc  
 tcgtaccgga taagcgacgg ttctgtagtc ccgacgttcc gttcaaatag ggacgactcg tctctggacg  
 1121 catgaagaca gcgtttgcac cccacaccgc tgcgcaggtg tgtcgggtgag ctcacagctg cccccaggc  
 gtacttctgt cgcaaacgtg ggggtgggcg acgcgtccac acagccactc gagggtcgcag ggggggtccg  
 1191 atgcccagcc cacttaatca ttcacagctc gacaactctc ccgcccacac caggtctaga ggataaaagc  
 tacgggtcgg gtgaattagt aagtgtcagag ctggttagag ggccgggtttg gtcacgatct cctattttcg  
 1261 ggggcttgcg gctcctagat aacagagcgc tttccgcgct ctgtcccgcg ctgctctttc tctccagcac  
 ccccgaacgc cgaggatcta ttgtctcgcg aaaggcgacg gacagggcgc gacgagaaa agaggtcgtg

SaI

--+---

1331 ctcggatctg gatctcgagg tgcac**ctcgg** **tgcgcc**atgg tcacccacag caagtttccc gccgccggga  
 gagcctagac ctgagactcc agctg**gaggc** **acgagg**tacc agtgggtgct gttcaaaagg cggcggccct

KOZAK

>>.....SOCS-3.....>  
 m v t h s k f p a a g

1401 tgagccgccc cctggacacc agcctgccc tcaagacctt cagctccaaa agcgagtacc agctgggtgg  
 actcggcggg ggacctgtgg tcggacgcgg agtctctgaa gtccaggttt tcgctcatgg tcgaccacca  
 >.....SOCS-3.....>  
 m s r p l d t s l r l k t f s s k s e y q l v

1471 gaacgccgtg cgcaagctgc aggagagcgg atttactgg agcgccgctga ccggcgccga ggcgaacctg  
 cttgcggcac gcgttcgacg tcctctcgcc taagatgacc tcgcccact ggccgcgct ccgcttgac  
 >.....SOCS-3.....>  
 v n a v r k l q e s g f y w s a v t g g e a n l

1541 ctgctcagcg ccgagcccgc gggcacctt cttatccgag acagctcggc ccagcgcac tttctcacgt  
 gacgagtcgc ggctcggcg cccgtgaaa gaataggcgc tgtcagacct ggtcgcggg aagaagtga  
 >.....SOCS-3.....>  
 l l s a e p a g t f l i r d s s d q r h f f t

1611 tgagcgtcaa gaccagctg gggaccaaga acctacgat ccagtgtagg gggggcagct tttcgtgca  
 actcgcagtt ctgggtcagc cctggttct tggatgcgta ggtcacact cccccctcga aaagcgact  
 >.....SOCS-3.....>  
 l s v k t q s g t k n l r i q c e g g s f s l

1681 gaggacccc cgaagcacgc agccagttcc ccgcttcgac tgtgtactca agctgggtgca ccaactacatg  
 ctactgggg gcttcgtgcg tcggtcaagg ggcgaagctg acacatgagt tcgaccact ggtgatgtac  
 >.....SOCS-3.....>  
 q s d p r s t q p v p r f d c v l k l v h h y m

1751 ccgctccag ggaccccctc cttttctttg ccacccacgg aaccctcgtc cgaagttccg gacgagcac  
 ggcggaggtc cctgggggag gaaaagaac ggtgggtgcc ttgggagcag gcttcaaggc ctcgtcggg  
 >.....SOCS-3.....>  
 p p p g t p s f s l p p t e p s s e v p e q p

1821 ctgcccaggc actccccggg agtaccceca agagagctta ctacatctat tctggggggc agaagattcc  
 gacgggtccg tgaggggcc tcattggggg tctctcgaat gatgtagata agacccccgc ttttctaagg  
 >.....SOCS-3.....>  
 p a q a l p g s t p k r a y y i y s g g e k i

1891 gctggtactg agccgacctc tctctccaa cgtggccaac ctccagcctc tttgtcggaa gactgtcaac  
 cgaccatgac tcggctggag agaggaggtt gcaccggtgg gaggctcgtg aaacagcctt ctgacagttg  
 >.....SOCS-3.....>  
 p l v l s r p l s s n v a t l q h l c r k t v n

1961 ggccacctgg actcctatga gaaagtgacc cagctgcctg gaccattcgg ggagttcctg gatcagtatg  
 ccggtggacc tgaggatact ctttactggt gtcgacggac ctgggtaagc cctcaaggac ctatgcatac  
 >.....SOCS-3.....>  
 g h l d s y e k v t q l p g p i r e f l d q y

Clal

```

--+--
2031 atgctccact ttaaactgat aagcttgata togaattcct gcagccaac atctgtaagt aactttgaac
tacgaggtga aatttagcta ttcgaactat agcttaagga cgctcgggtg tagacattca ttgaaacttg
>...SOCS-3...>>
d a p l
2101 agacattaac aatgatgaca atacaggga tttggtgtga ctacagagtc cactgtttct agctaccgga
tctgtaattg ttactactgt tatgtcccat aaaccacact gactctcagg gtgacaaaga tcgatggcct
2171 catgcccata tcccacatgg ttgtttaata tacttagtga gaagcaggtc gtacagggac aaaaacacag
gtacgggtag agggtttacc aacaaattat atgaatcact ctctcgtccag catgtccctg tttttgtgtc
2241 gttgagacag gaagcaacag ggtcatgtc ttaoctccta aagggtgggc cctgtatctt acccatcttg
caactctgtc ctctcgttgc ccgagtacag aatggaggat tccccaccg ggacatagaa tgggtagaac
2311 gactctgttc cccagccttg cctgacccc cattcccttg ggggacttac accgtccctt gcctactgtg
ctgagacag gggcgggaac gggactgggg gtaagggaac cccctgaatg tggcagggaa cggatgacac
2381 ttactgtgtt ttctattagg gagcttcaat aaatgactta gttcttctgg gcttcatctg cagctgtcta
aagtgaccaa aagataatcc ctogaagtga ttactgaa caagaagacc cgaagtagac gtcgacagat
2451 aaaggggtga cgtacagtc taacagtagc aggatcaaat aaattagatg cataggacca atctgccaga
tttccccact gcatgtcagc atgtcctcag tcttagttaa ttaatactac gtatcctggt tagacggctc
2521 ctggtctcac caagttttt cctccttctc tctgcagctg tcgtcacaaa caccgtttcc tcaggctacg
gaccagagtg gttcaaaaaa gggaggaaag agacgtcagc agcagtggtt gtggcaaaag agtccgatgc
2591 gtggtggcag tggctttggc ggtggcctgg gcggtggcct gggcgggtggc ctgggtggcg gcctcggcgg
caccaccgtc accgaaaccg ccaccggacc cgccaccgga cccgccaccg gaccaccgcg cggagccgac
2661 cggcctgggc ggaggtctgg gcagtggtct tgggtggaggc ggcagtagca gcttctactc cagcagcagt
gcccggaccg cctccagacc cgtcaccaga accaccctcg ccgtcctcgt cgaagatgag gtcgtcgtca
2731 gggggtgttg gcctaggcgg tgggctcagt gtcgggggct ctggcttcag tgcaagcagt ggccgaagct
ccccacaaac cggatccgac acccagagtc cagcccccca gaccgaagtc acgttctgta ccggtctcga
2801 tgggcttttg cagtgggtgg ggcagcagct ccagcgtcaa atttgtctcc accaccctct cctctcggaa
accgaaacc gtcaccacc cgtcgtcga ggtcgcagtt taaacagagg tgggtggagg ggagagcctt
2871 gagcttaag agctaagac ctgcagcaag ttactgcctc ccaagcccag cagccggccg tggcatccac
ctcgaagttc tcgattctcg gacgtcgttc aatgacggag ggttcgggtc gtcggccggc accgtagggt
2941 ctgtggcacc cacctcttct aggtgggtgc tcaagccaag ttttctctc ttctggagtc tagtcaatga
gacaccgtag gtggagaaga tccaccacag agttcgggtc aaaagaggag aagacctcag atcagttact
3011 agcctatcgc agaccacat tctttggttc ctggaaggcc caaccccag tctctagcct ggtgtgtcct
tcggatagcg tctgggtgta agaaaccaag gaccttccgg gttgggggtc agagatcgga ccacacagga
3081 gattctatgc tctgctcca agcagccttt gactctctat agcctggtcc tcgggtgacag aagaatccaa
ctaagatagc agacgaggt tctcggaaa ctacagata tcggaccagg agccactgct ttcttaggtt
3151 tgttttcag tatctaacc atcaaaacag agtctcacc ccaatccat ctggtctgac tatctccaga
acaaaaggtc atagatttgg tagttttgtc tcaggagtg ggttagggta gaccagactg atagaggtct
3221 ttgtgttcaa taaaatgctt tcataatata agctgttggg aagaactggt ttttcaagat ctacacccaa
aacacaagtt attttacgaa agtattatat tcgacaacc ttcttgacaa aaaagttcta gatgtgggtt
3291 cctagagatt cactgagggt ccactctgctc agatgtggtt ggttcctttg attcataggg ggacagaatg
ggatctctaa gtgactccca ggtagacagg tctacaccaa ccaaggaaac taagtatccc cctgtcttac
3361 gccttgaaag gaaggtgacc gctgtgggtg gtacagagac tccaggaggc acgaggtgtg gatgctaaag
cggaaacttc ctccactg cgacaccac catgtctctg aggtcctccg tgctccacac ctacgatctc
3431 cctctacgat gaaggggtct ctggaggcgc tgaaggggaa gcttccctga cttgtagctt gtagatattg
ggagatgcta cttcccaga gacctccgc acttcccctt cgaaggagact gaacatcgaa catatctaac
3501 tagagctggt tgttggaggg gggcccattc aagggtggcc gattttgcaa attggcttaa gtcaaatgtg
atctcgacaa acaacctccc cccgggtaag tccaccggc ctaaaacggt taaccgaatt cagtttaaac
3571 taaataagga atttgttgc ttgaagcctc caaaaggcat agagatacct tttatagatg ttagtctctg
atattatcct taaacaacag aacttcggag gttttccgta tctctatgga aaatatctac aatcaggaca
3641 tctaataatg tgggtgctta cagggtcagt agcttatagt tccttaatag tgtcagggat gtaggggccc
agattattac acccacgaat gtcccagtc tcgaatatca aggaattatc acagtcctca catccccggg

```

```
3711 ttgattagc aaataattc aggaatttaa tggaggtggc cagaatttgc actatgtgtg ggatcacggc
aacctaatcg ttatttaaag tccttaaatt acctccaccg gtcttaaacg tgatacacac cctagtgccg

3781 ccacccctct tccataagct tgtcttaact gatcctgaat gaggggtgtt aatgaatctc ttcgaacagg
ggtaggagaa aggtattcga acagaattga ctaggactta ctoccacaaa ttacttagag aagcttgtcc

3851 aattcatggg tgcaatgtca tgctgtgct tctgggatgc atttaagatc ttgcctgcaa agacaatgtg
ttaagtacc acgttacagt acggacacga agaccatacg taaattctag aacggacggt tctgttacac

                                     KpnI
                                     -----+
3921 tgatggcagg gtggctgagg tacc
actaccgtcc caccgactcc atgg
```

## 5 Publikationen

### 5.1.1 Publikationen

**Goren, I., Linke, A., Muller, E., Pfeilschifter, J., Frank, S. 2006** The suppressor of cytokine signaling-3 is upregulated in impaired skin repair: implications for keratinocyte proliferation. *J. Invest. Dermatol.* 126:477-485

**Linke, A., Goren, I., Fässler, R., Pfeilschifter, J., Frank, S. 2008** Epithelial overexpression of the suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 determines the proliferative and migratory potential *in vitro* and during skin repair *in vivo*.

*Manuskript erstellt, Einreichung erfolgt zeitnah*

**Linke, A., Goren, I., Fässler, R., Pfeilschifter, J., Frank, S. 2008** Epithelial overexpression of the suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in transgenic mice exacerbates wound inflammation in the presence of bioactive TGF- $\beta$ .

*Manuskript erstellt, Einreichung erfolgt zeitnah*

### 5.1.2 Posterbeiträge

**Goren, I., Linke, A., Pfeilschifter, J., Frank, S.** SOCS-3 and skin repair: a functional connection to keratinocyte proliferation and differentiation

*ELSO (Nizza) 2004*

**Linke, A., Goren, I., Fässler, R., Pfeilschifter, J., Frank, S.** Nitric oxide-inducible suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3: implications for keratinocyte proliferation and skin repair

*3. Internationales Symposium des SFB 553 und 12. NO-Forum deutschsprachiger Länder (Mainz) 2007*

### 5.1.3 Vorträge

**Linke, A., Goren, I., Pfeilschifter, J., Frank, S.** Die gezielte Überexpression des Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-3 in Keratinozyten führt zu einer Verzögerung des Wundheilungsprozesses in der transgenen Maus.

*48. Frühjahrstagung der DGPT (Mainz) 2007*



## 6 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. J. Pfeilschifter für die Unterstützung meiner Arbeit und die Bereitstellung eines hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatzes danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. S. Frank für die Überlassung eines hochinteressanten Themas, die fundierte wissenschaftliche Betreuung und enthusiastische Unterstützung meiner Arbeit sowie den wissenschaftlichen Freiraum, den ich besonders in den letzten Jahren sehr genossen habe.

Herrn Prof. E. Boles danke ich für die Bereitschaft, die Dissertation unter seiner Betreuung im Fachbereich Biowissenschaften durchführen zu können.

Herrn Prof. R. Fässler, Herrn Dr. M. Bösl und Herrn Dr. M. Moser danke ich für die erfolgreiche Kooperation während der Generierung der transgenen Mauslinien sowie die zahlreichen Tipps und Hinweise zur Etablierung der Linien.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Itamar -„Professor Göran“- Goren für die außerordentlich fundierte und exakte Einführung eines Pharmazeuten in die zunächst fremden Gefilde der molekularbiologischen und biochemischen Arbeitstechniken, seine Geduld und beständige Hilfsbereitschaft sowie die vielen kritischen Hinweise, Ideen und Diskussionen, die letztlich erheblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Katja Härle, Katja Hart, Lorena Pleisnitzer und Ursula Albrink für die Tipps und die nette Atmosphäre während meiner Großeinsätze am Kryotom bedanken.

Besonders herzlich danke ich allen Laborkollegen und Mitarbeitern des Institutes, deren Namen aufzuzählen den Rahmen sprengen würde, für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung beim Erlangen einer gesunden Frustration, die *after work sessions* und den allgemein hohen Wohlfühlfaktor im Institut.

Mein größter Dank gilt schließlich meinen Eltern, die mir grundsätzlich ermöglicht haben, diesen Weg einzuschlagen und meiner Freundin Katja, die sich unermüdlich durch Berge diverser Fachtermini gekämpft hat, um mir den einen oder anderen Schachtelatz abzurufen.

## **7 Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

Name: Linke  
Vorname: Andreas  
Geburtsdatum: 08.06.1977  
Geburtsort: Hoyerswerda  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### **Schulbildung**

1984 - 1992 Polytechnische Oberschule Handrji Zejler in Hoyerswerda  
1992 - 1996 Leon-Foucault-Gymnasium in Hoyerswerda  
1996 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

### **Wehrdienst**

1996 - 1997 Sanitätssoldat der Luftwaffe

### **Studium und Dissertation**

1997 - 2003 Studium der Pharmazie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
27.08.1999 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
29.10.2001 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
02.07.2003 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
07.08.2003 Erteilung der Approbation  
2004 - 2008 Dissertation am Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie (Direktor: Prof. J. Pfeilschifter) des Klinikums der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Betreuung von Prof. S. Frank; Thema der Dissertation: Der Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-3: ein zentrales Schlüsselprotein im Verständnis der Ätiologie entzündlicher Wundheilungsstörungen der Haut?

Ich erkläre hiermit, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Frankfurt am Main, den 02. 07. 2008