

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Zytokine der Interleukin-10-Familie auf die
kutane Wundheilung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefan Kirsch
aus Berlin

Datum der Promotion: 25.10.2013

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Aspekte der kutanen Wundheilung	1
1.2 Die Haut	1
1.2.1 Der Aufbau der murinen Haut	3
1.3 Die kutane Wundheilung	3
1.3.1 Die inflammatorische Phase	3
1.3.2 Die proliferative Phase	5
1.3.4 Die reparative Phase	6
1.4 Die Pathophysiologie der chronischen Wunde	7
1.4.1 Therapieansätze für die Heilung chronischer Wunden	8
1.5 Zytokine	9
1.6 Die IL-10-Zytokinfamilie	10
1.6.1 Struktur	10
1.6.2 Zelluläre Quellen	10
1.6.3 Rezeptoren	12
1.6.4 Biologische Funktion	13
1.7 Ziel der Arbeit	16
2. Material	17
2.1 Tierversuche	17
2.1.1 Mausstämme	17
2.1.2 Chemikalien/Reagenzien	17
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	18
2.2 Molekularbiologie	18
2.2.1 Reagenzien und Kits	18
2.2.2 Synthetische Oligonukleotide	19
2.2.3 Assays on Demand (AoD)	20
2.2.4 Verbrauchsmaterialien	20
2.2.5 Geräte	20
2.3 Histologie	21
2.3.1 Antikörper	21
2.3.2 Reagenzien/Chemikalien	21
2.3.3 Verbrauchsmaterialien	22
2.3.4 Geräte	22
2.4 Westernblot-Analyse	22
2.4.1 Puffer und Pufferzusätze	22
2.4.2 Reagenzien und Kits	23
2.4.3 Antikörper	23
2.4.4 Verbrauchsmaterialien	23
2.4.5 Geräte	24
2.5 Zymographie	25
2.5.1 Chemikalien/Reagenzien	25
2.5.2 Geräte	25
2.6 ELISA	26
2.6.1 ELISA-Kit	26
2.6.2 Geräte	26
2.7 Zellkultur	26
2.7.1 3D-Zellkultur	26

2.7.2 Reagenzien für die Zellstimulation	26
2.7.3 Ausgewählte Verbrauchsmaterialien	26
2.7.4 Geräte	26
3. Methoden	27
3.1 Tierversuche	27
3.1.1 Wundheilungsstudien	27
3.1.2 Dokumentation und Auswertung der Wunden	27
3.1.3 Topische Applikation	28
3.1.4 Probengewinnung	28
3.1.5 Messung der Hautdicke	29
3.2 Zellkultur	29
3.2.1 Stimulation eines 3-D-Hautmodelles	29
3.3 Molekularbiologische Methoden	30
3.3.1 Nukleinsäure-Ebene	30
3.3.1.1 RNA-Isolierung	30
3.3.1.2 Verdau genomischer DNA und cDNA-Synthese	31
3.3.1.3 Quantitative Realtime-PCR	31
3.3.1.4 cDNA-Microarray-Analyse	33
3.3.2 Protein-Ebene	33
3.3.2.1 Western Blot	33
3.3.2.1.2 Herstellung von Zelllysaten	34
3.3.2.1.3 Proteinquantifizierung	34
3.3.2.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.3.2.1.5 Blotting	35
3.3.2.1.6 Immunnachweis	36
3.3.2.1.7 Signalentwicklung	36
3.3.2.2 Immunassay- Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	36
3.4 Histologie	37
3.4.1 Fixierung und Einbettung in Paraffin	37
3.4.2 Anfertigen von Paraffinschnitten	38
3.4.3 Anfertigen von Gefrierschnitten	38
3.4.4 Hämatoxylin Eosin Färbung	38
3.4.5 Immunhistochemie	39
3.4.6 Immunfluoreszenzfärbung	39
3.5 Zymographie	40
3.5.1 Herstellung von Zelllysaten	40
3.5.2 Proteinquantifizierung	40
3.5.3 Aufreinigung der Proteinextrakte	40
3.5.4 Zymographie	41
3.6 Statistik	42
4. Ergebnisse	43
4.1 Analyse der Genexpression von IL-10 Zytokinen in kutaner Wundheilung	43
4.2 Signaltransduktion der IL-10 Zytokine	44
4.3 Wundheilung in rezeptordefizienten Mäusen	45
4.3.1 Wundheilung in IL-20R1 defizienten Mäusen	46
4.3.2 Wundheilung in IL-22R1 defizienten Mäusen	48
4.4 IL-24 in kutaner Wundheilung	52
4.5 Zytokinexpression in kutaner Wundheilung	54
4.6 Die Rolle von IL-24 und IL-22R1/IL-20R2 in kutaner Wundheilung	57
4.6.1 Aktivität von Matrixmetalloproteasen	58
4.6.2 Differenzierung der Keratinozyten	60

4.6.3 Antimikrobielle Abwehr	61
4.6.4 Genomweite Expressionsanalyse	61
4.7 Serin-Peptidase Inhibitor A1 (Serpina1)	64
4.7.1 Regulation von SerpinA1	64
4.7.2 Topische Applikation von SerpinA1	66
5. Diskussion	68
5.1 Die Expression von IL-10 Zytokinen in kutaner Wundheilung	68
5.2 Die Funktionalität von IL-19, IL-20 und IL-24 in der kutanen Wundheilung	70
5.3 IL-24 in kutaner Wundheilung	73
5.4 IL-24 in der inflammatorischen Phase der Wundheilung	74
5.5 Die Biologische Rolle von IL-24 in der kutanen Wundheilung	76
6. Zusammenfassung	83
7. Literaturverzeichnis	85
Lebenslauf	98
Wissenschaftliche Veröffentlichungen	99
Eidesstattliche Versicherung	102

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazole
Ak	Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
BD	β-Defensin
BHQ	Black hole quencher
bp	Basenpaar
CD	Cluster der Differenzierung (cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonukleïnase
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DSC	Desmocollin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FAM	6-Carboxy-Fluoresceïn
FGF	Fibroblast growth factor
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-1
hu	human
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal

JAK	Janus-Kinase
K	Keratin
KGF	Keratinocyte growth factor
KLK	Kallikrein
KO	knock out
LCN	Lipocallin
m	murin
m ²	Quadratmeter
mA	Milliamper
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP	Monocyte chemoattractant protein
mg	Milligram
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
MMP	Matrixmetalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
qPCR	quantitative „real time“-RT-PCR-Methode
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PDGF	Platelet derived growth factor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen per Minute
RT-PCR	PCR mit revers transkribierter mRNA
s	Sekunde
S100A9	Calgranulin B
Serpin	Serin-Peptidase Inhibitor

ss-cDNA	single strand complementary DNA
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
TBS	Tris gepufferte Saline
TBST	Tris gepufferte Saline mit Tween
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of matrix proteinases
TMB	3, 3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen per Minute
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vol	Volumen
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Aspekte der kutanen Wundheilung

Eine Wunde wird als äußerer oder innerer Substanzdefekt eines Gewebes mit Verlust des Gewebezusammenhangs definiert [1]. Mit der äußeren Verletzung wird im betroffenen Hautareal sofort die Wundheilungsreaktion ausgelöst. Die kutane Wundheilung ist ein durch komplexe, körpereigene Mechanismen regulierter Prozess bei dem verschiedene Zellpopulationen mit Hilfe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen interagieren. Bei einem komplikationslosen Wundheilungsprozess, mit zeitlich absehbarer Heilung, spricht man von akuter Wundheilung [1, 2]. Ist die Regulation der Wundheilung gestört, so können sich schlecht heilende, chronische Wunden entwickeln [1, 3]. In Deutschland leiden etwa 3-4 Millionen Menschen jedes Jahr an chronischen Wunden. Die bisher bekannten Therapiemöglichkeiten sind dabei oft noch unzureichend und mit jährlichen Behandlungskosten von etwa 10000 Euro pro Patient verbunden [4]. Um die Lebensqualität der Patienten zu verbessern und die Behandlungskosten zu reduzieren, ist es essentiell das Verständnis hinsichtlich chronischer Wunden zu verbessern. Dafür ist die Aufklärung neuer molekularer Mechanismen in der Wundheilung ein wichtiger Schritt.

1.2 Die Haut

Die Haut (lat. *cutis*) ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Mit einer Fläche von etwa 1,5-2m² (ausgewachsener Mensch) schützt es die sich unter der Haut befindenden Gewebe vor mechanischen, chemischen und pathologischen Umwelteinflüssen. Die äußerste Barriere stellt die Epidermis dar. Sie wird durch die anschließende Dermis und das subkutane Fettgewebe stabilisiert. Außerdem unterstützen die integrierten Haarwurzeln und Schweißdrüsen die Regulation der Körperwärme und des Flüssigkeitshaushaltes. Der Flüssigkeitsverlust wird dagegen durch eine intakte epidermale Barriere gesteuert. Die Epidermis prägenden Zellen sind neben T-Zellen, Melanozyten und Langerhans-Zellen, die Keratinozyten. Diese Zellen unterliegen der terminalen Differenzierung, die in der Basalzellschicht (Stratum basale) mit mitotisch aktiven Keratinozyten beginnt und im Stratum

corneum mit der Abschuppung von Korneozyten endet. Im Verlauf der Differenzierung lösen sich die Zellkerne auf, die Zellgestalt ändert sich und ermöglicht somit eine dichte, palisadenartige Lage der Keratinozyten. Diese produzieren dabei verstärkt intrazelluläre Keratinfilamente (Keratin 1 und Keratin 10), was zu einer erhöhten Stabilität führt. Assoziiert mit Filaggrin stützen die Keratinfilamente die Plasmamembran und werden interzellulär durch Transglutaminasen miteinander verknüpft. Freigesetzte Lipide halten die Korneozytenschicht zusammen und bilden eine wasserabweisende Schicht. Durch proteolytische Abspaltung lösen sich die Korneozyten und werden durch terminal differenzierte Keratinozyten ersetzt [5, 6].

Die Basalmembran trennt die Epidermis von der Dermis. Die Dermis ist reich an Kollagenfasern und Proteoglykanen. Innerhalb dieser Hautschicht sind Haarwurzeln, Schweißdrüsen und Sinnesrezeptoren integriert. Außerdem verlaufen Lymph- und Blutgefäße, vom subkutanen Fettgewebe kommend, durch dieses Hautareal.

Die überwiegend mit Lymph- und Blutgefäßen durchzogene Subkutis besteht aus Adipozyten, die das Fettgewebe bilden, welches die Wärmeisolation unterstützt und als Energiespeicher dient (Abb. 1).

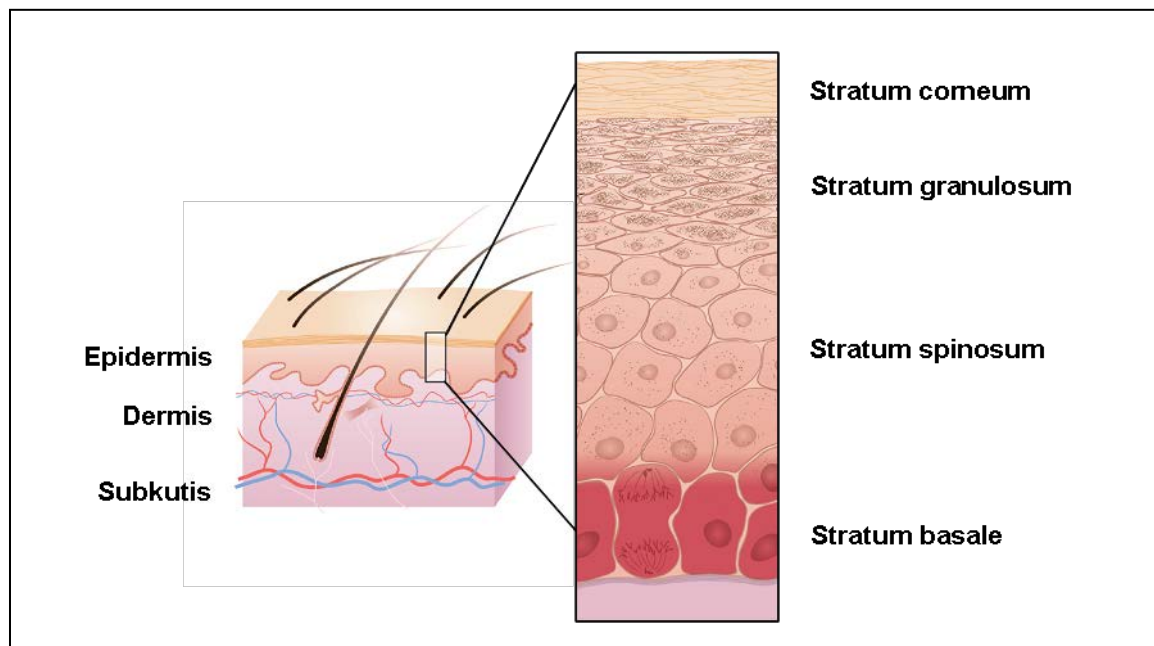


Abb.1: Aufbau der Haut und Epidermis. (Modifiziert nach [5]).

1.2.1 Der Aufbau der murinen Haut

Der Aufbau der murinen Haut unterscheidet sich nicht wesentlich von der menschlichen Haut. Die Epidermis der Mäuse ist grundsätzlich dünner als beim Menschen [7]. Die Dicke der Epidermis ist bei murinen Lebewesen je nach Behaarung bzw. Körperregion verschieden. In dicht behaarten Körperregionen, wie z.B. bei der Rückenhaut, ist die Epidermis dünner als in weniger behaarten Bereichen des Schwanzes oder der Pfotenballen. Die terminale Differenzierung der Keratinozyten läuft in murinen Organismen in gleicher Weise wie in der humanen Epidermis ab [8, 9].

1.3 Die kutane Wundheilung

Die Wundheilung hat die Funktion verletztes Gewebe strukturell und funktionell wiederherzustellen. Sobald eine Verletzung auftritt, wird ein komplexer Prozess der Gewebereparatur in Gang gesetzt. Die Wundheilung ist ein streng regulierter, regenerativer Vorgang bei dem zahlreiche Zelltypen beteiligt sind und über Interleukine und Wachstumsfaktoren interagieren [10-12].

Allgemein werden die physiologischen Abläufe in verschiedene Phasen unterteilt, wobei die Phasen sich zeitlich überlappen können. Der regenerative Vorgang wird zunächst von der inflammatorischen Phase geprägt. Daran schließen sich die proliferative Phase und die reparative Phase an (Abb. 2).

1.3.1 Die inflammatorische Phase

Bei der akuten, funktionellen Wundheilung beginnt die inflammatorische Phase mit der Hämostase gefolgt von der Entzündungsreaktion, welche bis etwa zum vierten Tag nach dem Trauma verläuft. Bei Wunden sind oft Blutgefäße betroffen, die sich unmittelbar nach der Verletzung verengen (Vasokonstriktion) und eine Thrombozytenaggregation begünstigen. Daraufhin wird die Gerinnungskaskade aktiviert, aus der ein Fibrinpfropf resultiert, der die Wundoberfläche schützt. Der Fibrinpfropf dient weiterhin als provisorische Matrix für migrierende Zellen [13]. Zeitgleich setzen Thrombozyten und Keratinozyten Zytokine frei, die die Entzündungsreaktion der Wunde auslösen. Platelet Derived Growth Factor (PDGF),

Transforming Growth Factor (TGF)- β , Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und IL-8 sind dabei wichtige Mediatoren, die die Migration von neutrophilen Granulozyten in den Wundbereich stimulieren [14-18]. Eine Hauptfunktion der neutrophilen Granulozyten ist die Phagozytose und Abtötung von Bakterien. Unterstützend zur Abtötung sind diese Leukozyten in der Lage mit Hilfe zelleigener Myeloperoxidasen reaktive Sauerstoffradikale zu bilden. Hypochlorit wirkt dabei nach Degranulierung im Phagosom besonders bakterizid [13, 19]. Außerdem beseitigen die neutrophilen Granulozyten über Matrixmetalloproteinasen und Elastase totes Zellmaterial [12, 13]. Die antimikrobielle Abwehr wird zusätzlich durch Keratinozyten verstärkt, die antimikrobielle Peptide wie Cathelicidin, β -Defensin-2 und β -Defensin-3 freisetzen [20-22]. Sobald sich die Wunde in einem pathogenfreien Zustand befindet, steigt die Zahl infiltrierender Makrophagen im Wundbereich. Makrophagen nehmen eine Schlüsselfunktion ein, da sie die inflammatorischen Mechanismen limitieren und neue proliferative Prozesse einleiten.

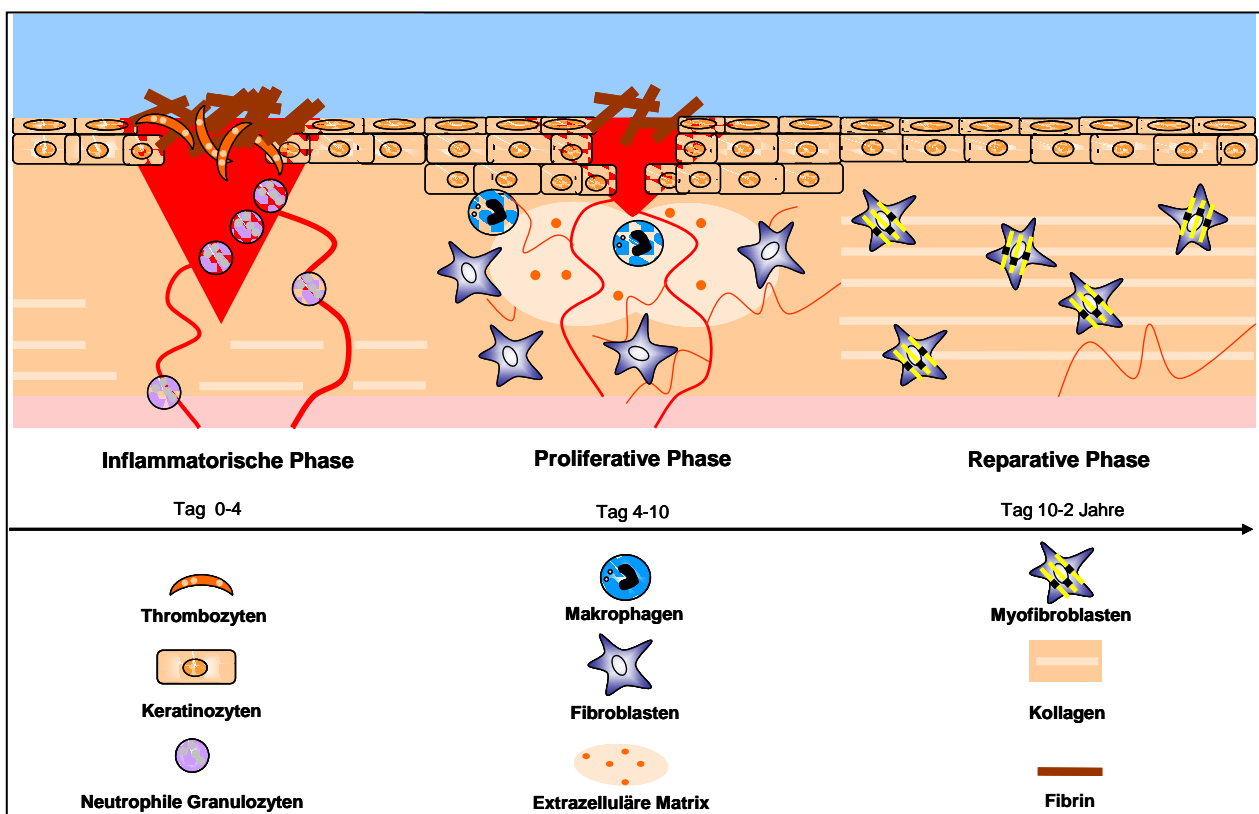


Abb. 2: Phasen der kutanen Wundheilung.

Makrophagen phagozytieren neutrophile Granulozyten, die zuvor apoptotischen Prozessen unterlagen [12]. Darüber hinaus produzieren Makrophagen IL-10, welches die chemotaktische Invasion von neutrophilen Granulozyten hemmt und die Sekretion von IL-1 β , Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1, Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 α , IL-6 und Tumor Necrosis Factor (TNF)- α reduziert [23, 24].

1.3.2 Die proliferative Phase

Die proliferative Phase der Wundheilung wird wesentlich von der Reepithelisierung, dem Aufbau einer Granulationsschicht sowie der Angiogenese bestimmt. Die Angiogenese ist ein wichtiger Bestandteil, da im Wundbereich die Versorgung mit Blut und Nährstoffen sichergestellt sein muss [2]. Die Formation neuer Blutgefäße wird von Zytokinen wie Leptin, Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 und Keratinocyte Growth Factor (KGF) koordiniert. Leptin aktiviert die Proliferation von Endothelzellen, induziert Matrixmetalloproteinase (MMP)-9 und MMP-2 für die Endothelzellmigration. Außerdem wirkt es mit FGF-2 synergetisch und induziert wie KGF die Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [25-29]. Für eine funktionale Angiogenese ist VEGF essentiell. Dieser Wachstumsfaktor wird hauptsächlich von Keratinozyten, Makrophagen und Fibroblasten produziert. VEGF bindet über die Fms-Related Tyrosine Kinase (Flt)-1 (VEGF-Rezeptor 1) und Kinase Insert Domain Receptor (KDR) (VEGF Rezeptor 2) –Rezeptoren direkt an Endothelzellen und stimuliert die Proliferation und Migration der Endothelzellen zu neuen, in den Wundbereich einwandernden Blutgefäßen [30, 31].

Mit ausreichender Blutversorgung, kann auch eine vollständige Wiederherstellung der epidermalen Barriere realisiert werden. Die Reepithelisierung stellt einen Schlüsselprozess für die Regeneration des verletzten Gewebes dar. Keratinozyten des Wundepithels binden durch Integrine an Fibrin und dem neu gebildeten Kollagen der provisorischen Matrix. Migrierende Keratinozyten produzieren Matrixmetalloproteinasen, wie z.B. MMP9, welche die Bindungen mit den Matrixmolekülen lösen und somit eine Bewegung der epidermalen Zellen ermöglichen [32, 33]. Zeitgleich befinden sich die Keratinozyten im Wundareal in einem hochproliferativen Zustand. Die Proliferation wird dabei überwiegend nach Bindung von Epidermal Growth Factor (EGF), KGF und TGF α an Keratinozyten

aktiviert [2, 34]. Weitere Wachstumsfaktoren wie TGF β und PDGF führen zu einer verstärkten Migration und Proliferation von Fibroblasten. Darüber hinaus initiieren Fibroblasten eine Wundkontraktion, wodurch sich die Wundfläche bis zu 40 % reduzieren kann [2]. Dafür transformieren Fibroblasten zu Myofibroblasten. Dieser Vorgang beginnt etwa am sechsten Tag nach Verwundung und erreicht seinen Höhepunkt zwei Wochen danach. Die Transformation wird nach Bindung von TGF β an Fibroblasten stimuliert, was zu einer Expression von α -SM-Actin, Myosin und von Proteinen des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix führt [35, 36].

1.3.4 Die reparative Phase

Mit zunehmender Kollagenproduktion durch Fibroblasten und deren Transformation zu Myofibroblasten beginnt auch die Reparationsphase, welche im Wesentlichen durch die Wundkontraktion, den Abbau von Blutgefäßen und der Umstrukturierung der Kollagenfasern gekennzeichnet ist.

Aufgrund der Aktin-Myosinfilamente besitzen die Myofibroblasten, ähnlich wie Muskelzellen, kontraktile Eigenschaften. Daher kann sich der Wundbereich nach Bindung der Myofibroblasten an Kollagenfasern und Proteinen der extrazellulären Matrix und gleichzeitiger Kontraktion der Zellen verkleinern. Die Menge der extrazellulären Matrixproteine nimmt im weiteren Verlauf ab. Fibroblasten produzieren nach TGF β -Stimulation Kollagen Typ 3, was wiederum zum proteolytischen Abbau der extrazellulären Matrix führt und die Festigkeit der Wunde erhöht [37, 38]. Für eine verbesserte Gewebestabilität steigern die Fibroblasten die Sekretion an Kollagen Typ 1. Kollagen Typ 3 wird proteolytisch abgebaut. Das regenerierte Gewebe erreicht eine Festigkeit von 70-90 % im Vergleich zu unverletzten Hautarealen [37-39]. Die Abbauprozesse von Kollagen Typ 3 werden nach Induktion durch TGF β , PDGF sowie IL-1 β von Matrixmetalloproteinasen realisiert und von entsprechenden Inhibitoren (Tissue Inhibitor of Metalloproteinasen, Timp) kontrolliert, um den proteolytischen Abbau von unverletzten Gewebe zu vermeiden [40-42]. TGF β fördert dabei die MMP9 Regulation in Keratinozyten [43, 44]. Dagegen produzieren Fibroblasten MMP1, MMP3 und MMP9 nach Stimulation durch IL-1 β [45]. Sobald eine ausreichende Menge von Kollagen Typ 1 vorhanden ist, vernetzen sich die Kollagenfasern und sorgen im neu generierten Gewebe für

mechanische Stabilität. Zeitgleich verringert sich die Zahl der Fibroblasten und Blutgefäße [37, 46, 47]. Die reparative Phase kann bis zu 2 Jahre andauern.

1.4 Die Pathophysiologie der chronischen Wunde

Ist der akute Heilungsverlauf gestört, so kann es zu schlecht oder nicht heilenden chronischen Wunden führen. Die Prävalenz chronischer Wunden liegt in Europa, Amerika und Japan bei etwa 2,5 % der Bevölkerung und betrifft meist Menschen mit einem Alter über 60 Jahren [48, 49]. Die Ursachen für die Entstehung chronischer Wunden können unterschiedlich sein. So können Fremdkörper und Infektionen den Heilungsverlauf entscheidend verschlechtern. In vielen Fällen geben systemische Grunderkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, Anlass zur Entwicklung chronischer Wunden (Diabetisches Fußsyndrom). Darüber hinaus können chronische Wunden bei Patienten aus einer gestörten Mikrozirkulation (Ulcus cruris venosum) oder einer erhöhten mechanischen Belastung (Dekubitus) resultieren [50]. Unabhängig von der Ursache sind schlecht heilende Wunden mit einem hohen Risiko für bakterielle Infektionen verbunden. Bakterielle Infektionen verstärken eine inflammatorische Kaskade mit erhöhter Migration neutrophiler Granulozyten und Makrophagen, welche die Produktion von MMPs stimulieren (Abb. 3). Neben der erhöhten MMP Konzentration sind Inhibitoren von Proteasen in chronischen Wunden deutlich reduziert als im Vergleich zu akuten Wunden [51]. Der durch IL-1 β und TNF α induzierte Überschuss an MMPs führt zu einem proteolytischen Abbau von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowie von Proteinen der extrazellulären Matrix und Endothelzellen. Im Vergleich zu akuten Wunden sind die Konzentrationen an inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF α in chronischen Wunden signifikant erhöht [52, 53]. Im Vergleich zu den akut heilenden Wunden fehlt in chronischen Wunden ein regulierender, anti-inflammatorischer Stimulus. Durch den Überschuss an pro-inflammatorischen Zytokinen und der hohen proteolytischen Aktivität im Wundbereich wird somit die inflammatorische Kaskade immer wieder aktiviert und eine funktionelle Wundheilungsantwort verzögert sich oder bleibt aus [45].

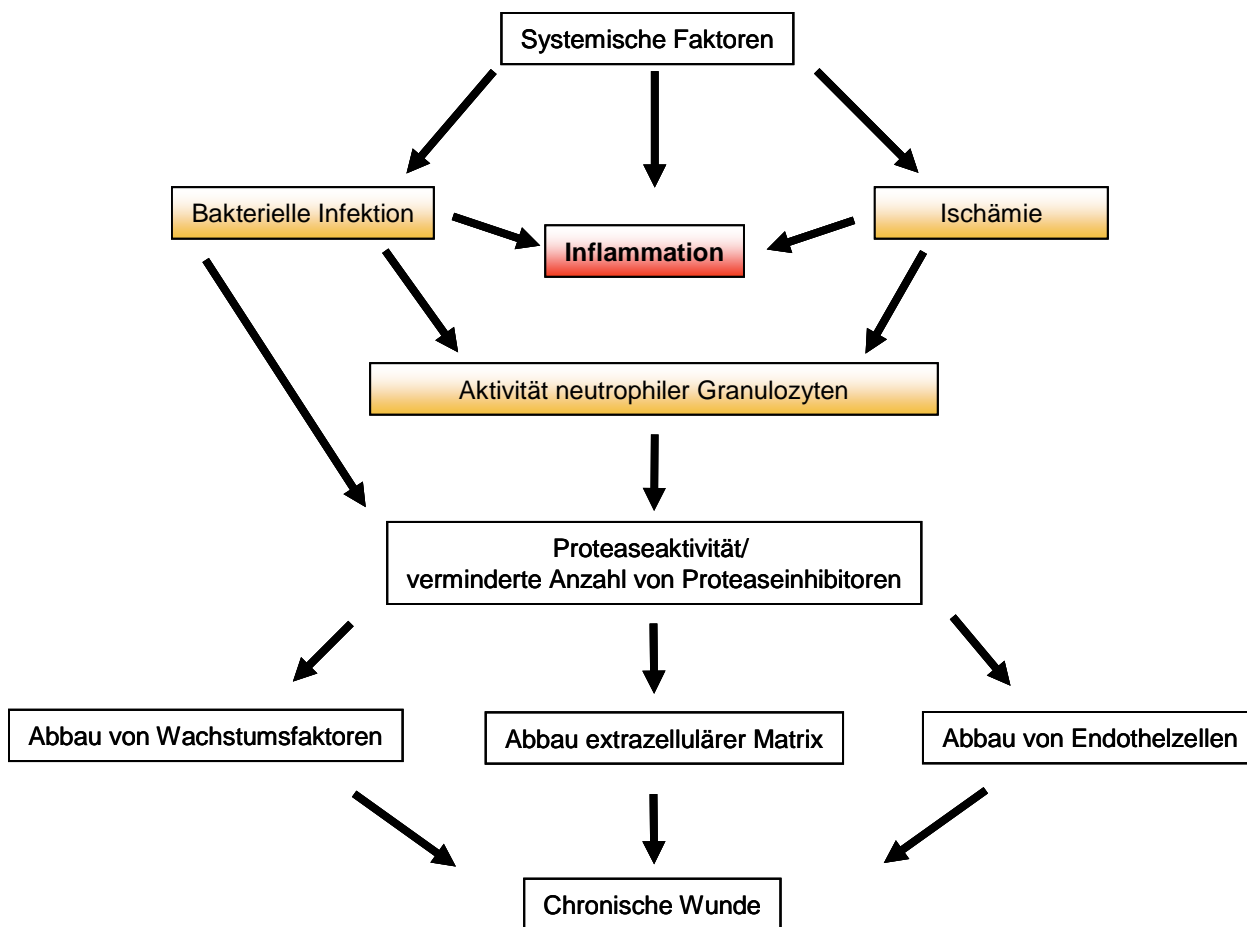


Abb. 3: Übersicht zur Entstehung chronischer Wunden (modifiziert nach [54])

1.4.1 Therapieansätze für die Heilung chronischer Wunden

Für die therapeutische Behandlung schlecht heilender Wunden reichen Wundverbände (Schaumstoffe, Folien) Wunddressings mit Alginaten (Salze der Alginsäure aus Braunalgen), Hydrokolloiden (zweischichtiges Dressing aus Polyurethanfolie und einem Mix aus Gelatin, Pektin und Polycarboxymethylcellulose) oder Hydrogel (wasserhaltiges Polymergerüst) oft nicht aus. Stattdessen sind biologisch, aktive Wundauflagen mehr in den Fokus gerückt. Die durch Tissue Engineering generierten Hautersatz-Auflagen stimulieren die Wundheilung und schützen gleichzeitig vor Infektionen. So konnte die Applikation einer epidermalen Schicht bestehend aus Keratinozyten, Fibroblasten und Typ1 Kollagen (Produktname: Apligraf) die Heilung der Patienten beschleunigen [54-57]. Der große Nachteil dieser Anwendungen sind hohe Behandlungskosten [55]. Aufgrund von Ergebnissen klinischer Studien [58-61] scheint die Applikation von

Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf Wunden in Zukunft eine weitere therapeutische Alternative zu sein. Da Wachstumsfaktoren und Zytokine eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Wundheilung besitzen, ist es wichtig neue Erkenntnisse hinsichtlich molekularer Mechanismen in der Wundheilung zu gewinnen.

1.5 Zytokine

Zytokine sind vom Körper hergestellte Proteine, die zu einer interzellulären Kommunikation führen. Dabei steuern diese Mediatoren das Wachstum und die Differenzierung von Zellen sowie verschiedene physiologische Prozesse bei der Immunabwehr und Wundheilung. Die aus 60-200 Aminosäuren bestehenden, regulatorischen Proteine entfalten ihre Wirkung über die Bindung an Zytokinrezeptoren, welche Transmembranproteine der Zielzellen sind. Nach Bindung an den Rezeptor wird eine Signaltransduktion ausgelöst, die zu einer gezielten Genexpression führt und die Zelle letztendlich in einen bestimmten physiologischen Zustand versetzt (z.B. Differenzierung oder Proliferation) oder die Expression weiterer Proteine induziert. Die Wirkung der Zytokine kann autokrin (Bindung an produzierende Zelle), parakrin (Bindung an benachbarte Zelle) oder endokrin (Bindung an entferntere Zellen) erfolgen. Hinsichtlich der von Zytokinen ausgelösten Effekte, können Zytokine durch die Induktion verschiedener Effekte an unterschiedlichen Zielzellen pleiotrop wirken. Darüber hinaus können die Mediatoren identische Effekte auf eine Zielzelle bewirken, was als Redundanz bezeichnet wird. Oftmals agieren Zytokine zeitgleich, was zu einem synergetischen, verstärkten Effekt führt.

Zytokine können nach der Struktur ihrer Rezeptoren in bestimmte Familien eingeteilt werden. Dahingehend sind bisher folgende Zytokingruppen bekannt: Typ 1 Zytokine, IL-10-Interferon-Familie (Typ 2 Zytokine), IL-1-Familie, TGF-Familie, TNF-Familie, IL-17-Familie und Chemokine. Die IL-10-Interferon-Familie umfasst die Typ-1-Interferone (IFN- α , IFN- β , IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω), das Typ-2-Interferon IFN- γ , die Typ-3-Interferone (IL-28 α , IL-28 β , IL-29) sowie die Mitglieder der IL-10-Familie (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26) [62].

1.6 Die IL-10-Zytokinfamilie

Die IL-10-Zytokinfamilie ist eine seit etwa im Jahre 2000 bekannte Untergruppe der IL-10-Interferonfamilie, deren Mitglieder IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 und IL-26 strukturelle Gemeinsamkeiten in der Genlokalisierung, Genaufbau, Proteinstruktur besitzen und gemeinsam Rezeptorketten oder komplette Rezeptorkomplexe nutzen. Hinsichtlich ihrer biologischen Funktion lassen bisherige Studien darauf schließen, dass Mitglieder der IL-10-Zytokinfamilie wichtige Mediatoren für die Homöostase der Haut sind [63-71]. Daraus ergibt sich die Frage, ob IL-10-Zytokine während der Regeneration des verletzten Hautgewebes eine funktionelle Rolle besitzen.

1.6.1 Struktur

Die Gene für IL-10, IL-19, IL-20 und IL-24 sind im humanen Genom auf Chromosom 1 (1q32) lokalisiert. IL-22 und IL-26 befinden sich auf Chromosom 12 (12q15). Ein weiteres strukturelles Merkmal sind die ähnlichen Intron-Exon-Muster im Gen. Fünf proteinkodierende Exons besitzen die Gene von IL-10, IL-19, IL-20, IL-22 und IL-26. Das Gen von IL-24 umfasst sechs Exons [72].

Hinsichtlich der primären Proteinstruktur variiert die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der IL-10-Zytokine zwischen 9 % (IL-19 verglichen zu IL-22) und 53 % (IL-24 verglichen zu IL-10) mit zum Teil konservierten Cystein innerhalb der Primärsequenzen. Die Sekundärstruktur aller Mitglieder weist eine Bündelung von 6-7 α -Helices auf. Durch die Verknüpfung der α -Helices mit Disulfidbrückenbindungen besitzen die IL-10-Zytokine eine ähnliche Tertiärstruktur [73].

1.6.2 Zelluläre Quellen

Anhand verschiedener Studien konnte gezeigt werden, dass Immunzellen IL-10 Zytokine produzieren können. Darüber hinaus werden IL-19, IL-20 und IL-24 auch von Gewebezellen sezerniert. IL-10 wird überwiegend von Makrophagen und verschiedenen T-Zell-Populationen freigesetzt [72]. IL-22 und IL-26 werden hauptsächlich von aktivierten T-Zellen gebildet, wobei Th-22-, Th-1- und Th-17-Zellen die Produktion von IL-22 dominieren.

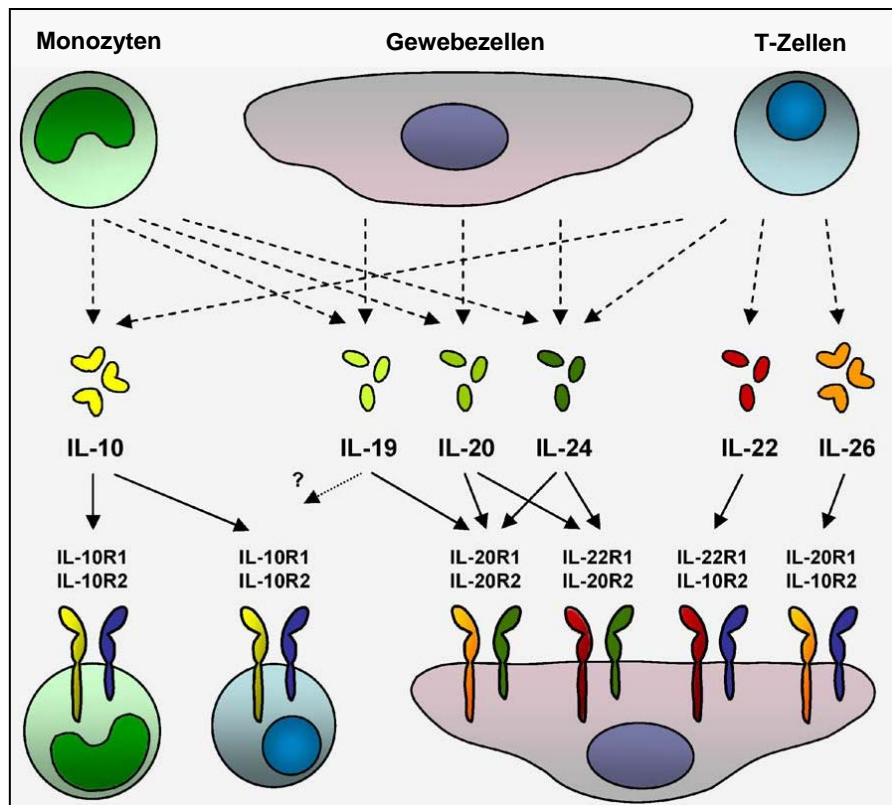


Abb.4: Produzenten und Zielzellen der IL-10-Zytokine. (Modifiziert nach [69]).

In anderen Zelltypen, wie Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen und verschiedenen Gewebezellen, konnte keine IL-22 Expression nachgewiesen werden [63, 74-77].

Zahlreiche Zellkulturexperimente und *in vivo* Studien zeigen weitere zelluläre Quellen für IL-19, IL-20 und IL-24. Mittels *in vitro* Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass nach LPS Stimulation Monozyten IL-19 produzieren (Abb. 4). Die Expression von IL-20 und IL-24 war dagegen deutlich geringer als im Vergleich zu IL-19. Dabei verstärkte IL-4 die IL-19 Produktion in den aktivierten Monozyten, wobei IL-10 hemmend wirkte [78]. Reife dendritische Zellen gelten als Hauptproduzenten von IL-20 [64]. In T-Zellen wurde bisher keine Expression von IL-19 und IL-20 gezeigt. Allerdings sind Th2-Zellen in der Lage IL-24 zu generieren [79]. IL-19, IL-20 und IL-24 können alle gemeinsam von Gewebezellen exprimiert werden. Nach IL-1 β Stimulation konnte eine stark erhöhte Expression von IL-19, IL-20 und IL-24 in Keratinozyten nachgewiesen werden [65].

1.6.3 Rezeptoren

Die IL-10-Zytokine binden über heterodimere Rezeptorkomplexe an ihre Zielzellen. Diese Rezeptorkomplexe bestehen aus einer längeren R1 und einer kürzeren R2-, transmembranen Rezeptorkette [80]. Für die IL-10-Zytokine ist charakteristisch, dass sie teilweise gemeinsam an identischen Rezeptorketten bzw. Rezeptorkomplexen binden können. So ist z.B. die IL-10R2 Untereinheit Bestandteil der Rezeptoren für IL-10 und IL-22. Der Rezeptorkomplex für IL-22 besteht zusätzlich aus der IL-22R1 Rezeptoruntereinheit, welche ebenso zusammen mit der IL-20R2 Untereinheit den IL-22R1/IL-20R2 Rezeptor (Typ2 IL-20-Rezeptorkomplex) für IL-20 und IL-24 darstellt. Diese beiden Mediatoren können zusätzlich an den IL-20R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex (Typ1 IL-20-Rezeptorkomplex) binden, welcher ebenfalls von IL-19 angesteuert wird (Abb. 4), [81-84]. Die Gene der Rezeptorketten befinden sich ebenfalls in ähnlichen Genclustern und besitzen Übereinstimmungen in ihrer Genstruktur. Die darin kodierten Proteine ergeben eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine intrazelluläre Domäne. Die intrazelluläre Domäne variiert in ihrer Länge. Dagegen ist die stark konservierte, zumeist ca. 210 AS umfassende extrazelluläre Domäne durch zwei charakteristische Fibronectin-Typ-III-Domänen gekennzeichnet [80]. Die Bindungsstelle der Zytokine liegt zwischen den extrazellulären Domänen beider Rezeptorketten [73]. Die Expression der Rezeptorkomplexe gibt einen Hinweis darauf, welche Zellen ein Ziel für die IL-10-Zytokine darstellen. Die IL-10R2 Expression wurde auf einer Vielzahl von verschiedenen Zellen nachgewiesen. Zusammen mit der IL-10R1 Untereinheit konnte der Komplex bei Immunzellen nachgewiesen werden [66]. Die Expression der IL-20R1- und IL-22R1-Rezeptorkette konnte bis dato bei keiner Immunzellpopulation nachgewiesen werden. Dagegen konnte bei verschiedenen Organen, die eine Barrierefunktion vor Umwelteinflüssen besitzen, eine Induktion dieser Rezeptoruntereinheiten gezeigt werden. Die Expression beschränkte sich vorrangig auf die Haut, Lunge, Darm und Niere. Besonders der Typ2 IL-20 Rezeptorkomplex (IL-22R1/IL-20R2) war in der Haut deutlicher hochreguliert als im Vergleich zu anderen Gewebeproben. Anhand von *in vitro* Studien wurde beobachtet, dass in primären, humanen Keratinozyten die IL-22R1 Rezeptoruntereinheit etwa zehnfach höher exprimiert war, als die IL-20R1 Rezeptoruntereinheit [64-66, 74]. Allgemein wird angenommen, dass die Bindung eines IL-10-Zytokins an der R1- Rezeptorkette zu einer Konformationsänderung des Zytokinmoleküls führt, welches daraufhin an die

zweite R2-Rezeptorkette bindet und die Signaltransduktion auslöst. Nach Bindung der IL-10-Interleukine wird überwiegend der JAK/STAT Signalweg aktiviert [80]. Dabei werden über JAK Kinasen Tyrosinreste der intrazellulären Domäne (Zytokinrezeptor-Box-3 Motiv) der R1 Ketten phosphoryliert. Diese phosphorylierten Abschnitte sind gleichzeitig Bindungsstellen für STAT Proteine, die nach Bindung phosphoryliert werden.

Mit Aktivierung der STAT Proteine migrieren sie als Dimer in den Zellkern, wo sie an entsprechende Promotoren binden und eine Genexpression induzieren. Zu den STAT Proteinen gehört STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Hinsichtlich der Signaltransduktion der IL-10-Zytokine konnte überwiegend eine STAT3 Aktivierung beobachtet werden. Der STAT3 Signalweg in Keratinozyten ist ein wichtiges Element bei der Homöostase der Haut [65].

1.6.4 Biologische Funktion

Anhand der bisher vorhandenen Erkenntnisse scheinen die IL-10-Zytokine pleiotrop zu agieren. IL-10 ist bekannt anti-inflammatorisch zu wirken und dabei die Expression des MHC Klasse 2 Komplexes in Makrophagen zu hemmen. Außerdem blockiert IL-10 die von Makrophagen ausgehende Produktion von IL-1 β und TNF α [72, 85, 86].

Hinsichtlich der biologischen Funktion von IL-19 gibt es bis dato nur Hinweise, und es wird in Publikationen kontrovers diskutiert, ob IL-19 potentiell an Immunzellen binden kann oder nicht. IL-19 bindet dagegen an Keratinozyten und löst eine STAT3 Aktivierung aus. Darüber hinaus deuten Studien an, dass IL-19 eine Rolle in inflammatorischen Hautkrankheiten spielt. Eine hohe Genexpression von IL-19 konnte in Hautarealen von Psoriasispatienten oder Patienten mit atopischer Dermatitis detektiert werden [65]. An einem Mausmodell zeigte sich, dass nach intradermaler Applikation von IL-23 in Mäusen eine erhöhte Expression von IL-19 und IL-24 in der Haut und zu einem Psoriasis-ähnlichen Hautphänotyp führte. Die Frage nach spezifischen, kutanen IL-19 Effekten ist bisher noch ungeklärt. Im Unterschied zu transgenen IL-20, IL-22 oder IL-24 Mäusen, konnte in einem transgenen IL-19 Mausmodell keine abweichenden, akanthotischen Hautveränderungen festgestellt werden [87].

Darüber hinaus wird eine pathologische Rolle von IL-19 mit rheumatoider Arthritis und Asthma assoziiert [88, 89].

IL-22 ist der zurzeit am besten charakterisierte Mediator der IL-10-Familie. Aufgrund der Rezeptorexpression bindet IL-22 an Gewebezellen, wobei die biologischen Effekte in Keratinozyten intensiv untersucht wurden [90]. Dabei stellte sich heraus, dass IL-22 die Expression antimikrobieller Proteine induziert, die Differenzierung der Keratinozyten hemmt, die Zellmobilität der Keratinozyten stimuliert, die Expression von Chemokinen fördert und IL-20 induziert. Hinsichtlich der antimikrobiellen Abwehr induziert IL-22 z.B. die Gene für Psoriasin (S100A7), Calgranulin-B (S100A9), β -Defensin-2 (hBD2) und β -Defensin-3 (hBD3). Die Genexpression für die Matrixmetalloproteinasen MMP1 und MMP3 sowie Desmocollin 1 ist nach Bindung von IL-22 ebenfalls erhöht. Dagegen wird die Expression von Genen für Keratin 1, Keratin 10 oder Kallikrein 7, die mit der Differenzierung der Keratinozyten in Zusammenhang stehen, durch IL-22 maßgeblich gehemmt [66, 67, 91]. Weiterhin wurde gezeigt, dass TNF α , IL-17, IFN γ und IL-1 β die IL-22-Effekte verstärken können [91]. Anhand dieser Erkenntnisse konnte mit weiteren Studien aufgeklärt werden, dass IL-22 bei der chronisch, inflammatorischen Hautkrankheit Psoriasis eine pathogene Rolle spielt [91]. Das T-Zell abhängige IL-22 ist in der Psoriasis proportional zum Schweregrad der Erkrankung hochreguliert und beeinflusst die Funktion der Keratinozyten wie zuvor beschrieben. Die Hemmung der terminalen Differenzierung der Keratinozyten begünstigt die bei Psoriasis-Patienten auftretende Akanthose. Die bei der Psoriasis ausgelösten Effekte der Keratinozyten entsprechen einer überschießenden Wundheilungsreaktion.

Studien unserer Arbeitsgruppe belegen, dass IL-20 in abgeschwächter Form ähnliche Effekte wie IL-22 auslöst und aufgrund seiner Expression in der Haut von Psoriasispatienten ebenfalls eine Schlüsselrolle bei den epidermalen Veränderungen in der Psoriasis spielt [92]. *In vivo* Studien mit IL-22-, IL-20- und IL-24- transgenen Mäusen zeigten außerdem, dass alle Tiere einen für die Psoriasis typischen Hautphänotyp besaßen [68, 91, 93, 94].

IL-24, auch unter mda-7 (melanoma differentiation associated gene-7) bekannt, wird oft hinsichtlich der tumorsuppressiven Eigenschaften erwähnt. In mehreren *in vitro* Studien wurde nachgewiesen, dass viral transfiziertes IL-24 spezifisch in Tumorzellen apoptotisch wirkt. Weitergehende Experimente an diversen Xenograft Mausmodellen bestätigten, dass IL-24 z.B. das Wachstum von humanen Brust-,

Lungen- und Zervixkarzinomen hemmt. Intratumorale Injektionen des IL-24 Gens mittels replikationsinkompetenter Adenoviren bei Patienten während einer klinischen Studie der Phase 1 resultierte in eine durch Apoptose verursachte signifikante Reduktion der Tumore. Die von transfizierten IL-24 bedingten zytotoxischen Mechanismen sind jedoch rezeptorunabhängig und finden ohne Aktivierung des Jak/STAT Signalweges statt [95, 96]. Chada et al. beobachteten allerdings anhand von *in vitro* Experimenten, dass bei dem sogenannten „bystander“ Effekt extrazelluläres IL-24 apoptotisch auf Melanomzellen wirkt. Dieser Effekt ist abhängig vom Typ1 Rezeptorkomplex (IL-20R1/IL-20R2), allerdings unabhängig von der Aktivierung der STAT3 Moleküle [97].

Über weitere biologische Funktionen gibt es bisher nur Hinweise. So konnte die Expression von IL-24 bei Darmentzündungen, in rheumatoider Arthritis und bei Psoriasispatienten gezeigt werden [65, 69, 98, 99]. Zwei Arbeiten deuten an, dass IL-24 in der kutanen Wundheilung involviert sein könnte. Dabei wurde die Expression von IL-24 in murinen und humanen Wunden gezeigt [70, 100].

In vitro Studien belegen, dass IL-24 ähnliche Effekte wie IL-22 in Keratinozyten auslöst [71]. Dafür spricht auch der psoriasisähnliche Hautphänotyp der in IL-22 und IL-24 transgenen Mäusen beobachtet wurde [91, 94]. Zusammen mit IL-20 konnten IL-22 und IL-24 eindeutig die STAT3 Signaltransduktion in Keratinozyten induzieren. Die Phosphorylierung der STAT3 Moleküle nach IL-19 Stimulation war dagegen deutlich geringer. Das zeigt, dass IL-24 und IL-20 die Effekte in Keratinozyten überwiegend über den IL-22R1/IL-20R2 Rezeptor auslösen [65].

Bisherige Daten lassen darauf schließen, dass Zytokine der IL-10-Familie durch die Induktion regenerativer Effekte in Keratinozyten einen wichtigen Beitrag in der Homöostase der Haut liefern. Aufgrund dieser Erkenntnisse soll untersucht werden, ob IL-10-Zytokine in der kutanen Wundheilung eine funktionelle Rolle spielen.

1.7 Ziel der Arbeit

Die Erforschung von Regulationsmechanismen des Wundheilungsprozesses kann wichtige Hinweise für zukünftige Therapiemöglichkeiten bei Patienten mit chronischen Wunden liefern. Publierte Studien belegen, dass einige Mitglieder der IL-10-Zytokinfamilie (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26) eine zentrale Rolle in der Regulation der Hauthomöostase spielen. Gerade unter inflammatorischen Bedingungen sind sie aktiv und induzieren zum Teil regenerative Effekte in Keratinozyten. Obwohl es bisher nur wenige Ergebnisse hinsichtlich ihrer Expression während der Wundheilung gibt, deuten bisherige Erkenntnisse zur Biologie der IL-10-Zytokine an, dass Mitglieder der IL-10-Zytokine im Wundheilungsprozess involviert sein könnten. Mit dieser Arbeit soll folgende Hypothese geprüft werden: Mitglieder der IL-10-Familie sind in einem murinen Tiermodell während der Wundheilung exprimiert und besitzen eine funktionale Rolle.

Durch Anwendung eines murinen *in vivo* Modells kann die Expression der Zytokine in unverletzter Haut sowie die Expressionskinetik während des Wundheilungsprozesses analysiert werden. Daran schließen sich vergleichende Wundheilungsstudien mit IL-20R1- und IL-22R1-rezeptordefizienten Mäusen mit den entsprechenden Kontrollstämmen an. Mit diesen Studien wird untersucht, ob die Mitglieder der IL-10-Zytokinfamilie und deren Rezeptorkomplexe für die Wundheilung relevant sind. Mit diesen Studien soll des Weiteren folgende Hypothese untersucht werden: Durch die gestörte Bindung der IL-10 Zytokine an IL-20R1- oder IL-22R1 Rezeptorkomplexen, besitzen IL-20R1- und IL-22R1 rezeptordefiziente Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine gestörte Wundheilungsreaktion.

Detaillierte molekularbiologische und histologische Analysen der Wunden sollen weiterhin aufzeigen, welche Effekte im Heilungsprozess, als Konsequenz der fehlenden Rezeptoruntereinheit, beeinflusst sind. Diese Studien liefern Hinweise über die Wirkmechanismen der IL-10-Zytokine im kutanen Wundheilungsprozess.

2. Material

2.1 Tierversuche

2.1.1 Mausstämme

129 IL-22R1 Knock-out Mäuse, männlich

129 SvJ (Wildtyp) Mäuse, männlich

B6 IL-20R1 Knock-out Mäuse, männlich

B6 (Wildtyp) Mäuse, männlich

Die IL-22R1 knock-out Tiere wurden von der Firma genOway S.A. generiert. Die Herstellung IL-20R1 defizienter Mäuse wurde von der Firma Miltenyi Biotec GmbH übernommen. Die mitgeführten Kontroll-Mauslinien ergaben sich aus den genetischen Hintergründen der knock-out Mäuse. Zucht und Haltung der Tiere fand in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité Universitätsmedizin Berlin in Berlin Steglitz statt. Die Wundheilungsstudien wurden in den pathogenfreien Tierhaltungsräumen der Charité Berlin in der Hessischen Straße 3-4, 10115 Berlin durchgeführt. Die Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin unter der Projektnummer G-0258/06 zugelassen und wurden nach Instituts eigenen Richtlinien durchgeführt

2.1.2 Chemikalien/Reagenzien

Dulbecco´s PBS (1x)	PAA Laboratories, Österreich
Finadyne [®] (Flunixin-Meglumin Lösung)	Essex Tierarznei, München
Forene [®] (Isofluran 100 %)	Abbott, Wiesbaden
Ketavet [®] (Ketaminhydrochlorid, 100mg/ml)	Pfizer, Karlsruhe
Rompun [®] (Xylazinhydrochlorid, 2 %)	Bayer Healthcare, Leverkusen
Natriumchloridlösung (0,9 %)	B. Braun, Melsungen
Maus Serpin A1 (rekombinant)	R&D, Wiesbaden

Softasept® N (Ethanol 75 %,
 Propanol 10 %)
 Wasser für Injektionszwecke

B. Braun, Melsungen
 B. Braun, Melsungen

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Biopsiestanze, 5 mm
 CryoPure Gefäße (1,8 ml)
 EDTA-Monovetten® (1,2 ml)
 Kanüle (0,45x13 mm)
 Kanüle für S-Monovette®
 Mull-Kompressen (steril)
 Peha-haft®, Fixierbinde
 Spritzen (1 ml)
 Tegaderm™ Roll, Transparentverband

PFM, Köln
 Sarstedt, Nürmbrecht
 Sarstedt, Nürmbrecht
 BD Microlance™, Madrid, Spanien
 Sarstedt, Nürmbrecht
 Maimed GmbH, Neuenkirchen
 Hartmann, Heidenheim
 BD Plastipak™, Madrid, Spanien
 3M Health Care, Neuss

2.1.4 Geräte

Acculab Vicon, Laborwaage
 Digitalkamera (Spiegelreflex, 1000D)
 Heizkissen
 Velbon® cx mini, Stativ
 Präzisionsmessgerät

Sartorius, Göttingen
 Canon, Krefeld
 Beurer, Ulm
 HS Imaging GmbH, Gummersbach
 Kroeplin GmbH, Schlüchtern

2.2 Molekularbiologie

2.2.1 Reagenzien und Kits

PIQOR™ SkinPatho Microarray
 Aqua-Roti®-Phenol
 Chloroform, z. A.
 DNase-/RNase-freies Wasser
 Ethanol, z. A.

Memorec Biotec, Köln
 Carl Roth GmbH, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, Deisenhofen
 Gibco BRL / Life Technologies,
 Karlsruhe
 Merck Biosciences, Schwalbach/Ts.

Glykogen	Roche, Mannheim
Invisorb [®] RNA-Kit II	InViTek GmbH, Berlin
MMLV-Reverse Transkriptase	Life Technologies, Karlsruhe
MMLV RT Puffer Set	Life Technologies, Karlsruhe
Oligo-d(T) ₁₂₋₁₈ -Primer	Amersham Biosciences, Freiburg
RNA 6000 Kit für Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
RNAasin [®] Ribonuklease-Inhibitor	Promega, Mannheim
RNA 6000LabChip [®] Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
TaqMan [™] Universal PCR Master Mix mit	
Uracil-N-Glycosylase AmpErase [®]	Applied Biosystems, Weiterstadt
UltraPure dNTP Set	Amersham Biosciences, Freiburg

2.2.2 Synthetische Oligonukleotide

Gen	Oligonukleotid-Sequenzen	eingesetzte Konzentration
mHPRT-1	5'-ATCATTATGCCGAGGATTTGGAA -3' 5'-TTGAGCACACAGAGGGCCA -3' Fam-5'-TGG ACA GGA CTG AAA GAC TTG CTC GAG ATG- BHQ3'	300 nM 300 nM 200 nM
mIL-10	5'-GAG CAA GGC AGT GGA GCA G -3' 5'-TCA AAT TCA TTC ATG GCC TTG T-3' Fam- 5'-TGA AGA GTG ATT TTA ATA AGC TCC AAG ACC AAG GTG-3'-BHQ	900 nM 900 nM 200 nM
mIL-17A	5'-GCA AAC ATG AGT CCA GGG AGA -3' 5'-TCA CTG TAG CCG CCA GGC-3' 5'-FAM-CTT CAT CTG TGT CTC TGA TGC TGT TGC TGC-3'- BHQ	900 nM 900 nM 200 nM
mIL-19	5'-GCC AAC TCT TTC CTC TGC GT -3' 5'-GGT GGC TTC CTG ACT GCA AT -3' Fam-5'-CTG GAG CGA TGT CAG GTG CAC AGA CAA T-3'-BHQ	900 nM 900 nM 200 nM
mIL-20	5'-GCA GCC TCG CCA ACT CC -3' 5'-TTG CTT CTT CCC CAC AAT GAC -3' Fam-5'-AAG GAC CTC TCA GTC TGT CAT TCT CAC ATG G-BHQ3'	900 nM 900 nM 200 nM
mIL-22	5'-CAA ACT CAG CAA TCA GCT CAG CT -3' 5'-AGC CTT CTG ACA TTC TTC TGG ATG-3' Fam-5'-CTG TCA CAT CAG CGG TGA CGA CCA G-BHQ3'	900 nM 900 nM 200 nM
mIL-24	5'-CCA CTC TGG CCA ACA ACT TCA -3' 5'-CTC ACT AAT GGG AAG CAT GGA AT -3' Fam-5'-AGT CAT CAT GTC ACA ACT ACA GCC CAG TAA GGA C-3'-BHQ3	900 nM 900 nM 200 nM
mIFN-γ	5'-CAA CAG CAA GGC GAA AAA GGCT -3' 5'-AGC TCA TTG AAT GCT TGG CG-3' Fam-5'-TGC ATT CAT GAG TAT TGC CAA GTT TGA GGT C-3'-BHQ	900 nM 900 nM 200 nM
mSerpina1b	5'-GCT TCT GTT CCT GTC TCA TCG A-3' 5'-CAC AGA GGA GAA TGC TCC CCT-3' 5'-FAM- CAC AGC CTT ATG CAC AGC CTT GCT GAG-3'-BHQ	900 nM 900 nM 200 nM

Tab. 1: Nachweissysteme für TaqMan[™]-PCR

2.2.3 Assays on Demand (AoD)

AoD	Gen-Name	NM-Nummer
huHPRT	Hypoxanthine-Guanin- Phosphoribosl-Transferase	NM_000194.2
huMMP9	Matrixmetalloproteinase 9	NM_004994.2
huSerpinA1	Serin-Peptidase-Inhibitor A1	NM_000295.3
mBD3	β- Defensin 3	NM_013756.2
mDSC1	Desmocollin 1	NM_013504.4
mIL-1b	Interleukin 1b	NM_008361.3
mIL-4	Interleukin 4	NM_021283.1
mIL-6	Interleukin 6	NM_031168.1
mK1	Keratin 1	NM_008473.2
mKLK7	Kallikrein 7	NM_011872.2
mLCN2	Lipocallin 2	NM_008491.1
mMMP2	Matrixmetalloproteinase 2	NM_008610.2
mMMP3	Matrixmetalloproteinase 3	NM_010809.1
mMMP9	Matrixmetalloproteinase 9	NM_013599.2
mMMP 10	Matrixmetalloproteinase 10	NM_019471.2
mMMP13	Matrixmetalloproteinase 13	NM_008607.1
mS100A9	Calgranulin B	NM_009114.2
mTIMP1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1	NM_001044384.1
mTGF-β	Transforming Growth Factor β	NM_01577.1
mTNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α	NM_013693.2

Tab. 2: Assays on Demand für TaqMan™-PCR

Alle Assays on Demand wurden bei Applied Biosystems (Weiterstadt) bestellt.

2.2.4 Verbrauchsmaterialien

Dispergierer OmniTip® Hard Tissue	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
MicroAmp® Optical Caps, PCR-Gefäßdeckel	Applied Biosystems, Weiterstadt
MicroAmp® Optical Tubes, PCR-Gefäße	Applied Biosystems, Weiterstadt
Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml) steril, DNase-/RNase-frei	Eppendorf, Hamburg

2.2.5 Geräte

ABI Prism® 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Weiterstadt
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
Gene Amp® PCR-System 9700, Thermocycler	Applied Biosystems, Weiterstadt
Minishaker MS2, Schüttler	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen
Thermomixer comfort, Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Multifuge® 3 S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.3 Histologie

2.3.1 Antikörper

Primäre Antikörper

Biotinylierter Anti-Maus-IL-24-mAk, Ratte	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Maus-IL-24-pAk, Ziege	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Maus-CD3-pAk, Kaninchen	Invitrogen, Carlsbad, USA

Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor 488-konjugierter Anti-Ziege-pAk, Esel	Invitrogen, Carlsbad, USA
Alexa Fluor 555-konjugierter Anti-Kaninchen-pAk, Ziege	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.3.2 Reagenzien/Chemikalien

Aceton	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
AEC, 3-Amino-9-Ethylcarbazole	Dako, Hamburg
Citratpufferkonzentrat (Pro Taqs), pH6	BIOCYC GmbH, Luckenwalde
DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole	Roche
Eindeckmittel (Entellan)	Merck Biosciences, Schwalbach
Eindeckmittel, Aquatex	Merck Biosciences, Schwalbach
Eosin	Division Chroma, Waldeck
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Hämalaun	Dr. K. Hollborn, Leipzig
Jung-Einbettmedium	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Paraffin wax	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Herbeta, Berlin
Methanol	Merck Biosciences, Schwalbach
Roticlear®	Carl Roth, Karlsruhe
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	Dako, Hamburg
TBS Pufferkonzentrat (ProTaqs), pH 7,6	BIOCYC GmbH, Luckenwalde

Wasserstoffperoxid	Merck Biosciences, Schwalbach
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe

2.3.3 Verbrauchsmaterialien

Einbettkassetten	neoLab, Heidelberg
Klingen	Microm, Walldorf
Filterpapier	Invitrogen, Karlsruhe
SuperFrost®Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen

2.3.4 Geräte

Shandon Citadel 1000, Gewebereinbettautomat	Thermo Fisher scientific,
Mikrotom, HM 560	Microm, Walldorf
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Axiolmager Z1, Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
AxioCam MRm, Mikroskopkamera	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
Axiovision software	Carl Zeiss MicroImaging, Jena
Adobe Photoshop (Version CS4)	

2.4 Westernblot-Analyse

2.4.1 Puffer und Pufferzusätze

Basis-Extraktionspuffer pH 7,5 (1 x):

TRIS-Base, 15 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl, 120 mM	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts.
KCl, 25 mM	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts.
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA), 2 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA, 2 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100, 0,5 % (v/v)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Lysepuffer auf Grundlage von Basis-Extraktionspuffer (1 x):

Dithiotreitol, 0,1 mM	Boehringer, Mannheim
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail I, 1 % (v/v)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II, 1 % (v/v)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Complete Proteinase-Inhibitor, 4 % (v/v)	Roche Diagnostics, Mannheim

TBST-Puffer pH 7,5 (1 x):

TRIS-Base, 25 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl, 150 mM	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts.
Tween 20, 0,05 % (v/v)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Block-Puffer auf Basis von TBST-Puffer (1 x):

Magermilchpulver, 5 % (w/v)	TSI GmbH, Zewen
-----------------------------	-----------------

Ak-Bindungs-Puffer auf Basis von
TBST-Puffer (1 x) :BSA, 5 % (w/v)

Serva Elektrophoresis GmbH,
Heidelberg

2.4.2 Reagenzien und Kits

BCA-Protein-Assay Kit	Perbio, Bonn
ECL-Reagent Kit	Amersham Biosciences, Freiburg

2.4.3 Antikörper

Anti-huSTAT3-pAk, Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Anti-huP-STAT3-pAk (Tyr705), Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Peroxidase-konjugierter AffiniPure F(ab') ₂ -Fragment Ziege Anti-Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg

2.4.4 Verbrauchsmaterialien

MagicMark™ XP Western Protein-Standard	Invitrogen, Karlsruhe
--	-----------------------

SeaBlue® Farbstoff-gekoppelter Protein-Standard	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Novex 4-12 % Bis-Tris-Gel	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® MES SDS Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® LDS Probenpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® reduzierendes Agenz	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Transferpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Nitrocellulose-Membran 0,2 µm - Filterpapier-Einheit	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol reinst	J.T. Baker, Griesheim
Hyperfilm - ECL™	Amersham Biosciences, Freiburg
Entwickler G153	Agfa, Köln
Fixierer G354	Agfa, Köln

2.4.5 Geräte

Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Minishaker MS2, Schüttler	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen
SpectraMax 340PC ³⁸⁴	Molecular Devices, Ismaning/München
Thermomixer comfort, Heizblock	Eppendorf, Hamburg
PowerEase® 500 Stromversorgungsgerät	Invitrogen, Karlsruhe
XCell SureLock™ Elektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
XCell II™ Blot-Modul	Invitrogen, Karlsruhe
Blotting-Schwamm	Invitrogen, Karlsruhe
Dumax 1030 Schüttler	Heidolph, Nürnberg
Bio Shaker 3D Wippschüttler	Lab4You, Berlin
ECL™ Hyperfilm-Kassette	Amersham Biosciences, Freiburg

2.5 Zymographie

2.5.1 Chemikalien/Reagenzien

Brij 35 (0,05 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid (5mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxide (10 %)	Serva, Heidelberg
Gelatine Sepharose 4B	GE Healthcare, Freiburg
Natriumchlorid (150 mM)	Merck Biosciences, Schwalbach
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	
Triton x-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma Base	Sigma-aldrich, Steinheim
Novex [®] Developing buffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Novex [®] Sample buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Novex [®] Tris-Glycin-Running buffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Novex [®] Zymogramm Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Novex [®] Zymogramm Renaturing buffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Simply Blue Stain	Invitrogen, Karlsruhe

2.5.2 Geräte

Duomax 1030, Schüttler	Heidolph, Nürnberg
XCell SureLock™ Elektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
Reax 2, Überkopfschüttler	Heidolph, Nürnberg
Trockenschrank	
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen

2.6 ELISA

2.6.1 ELISA-Kit

Mouse A1AT ELISA-Kit

GenWay, San Diego, USA

2.6.2 Geräte

Zentrifuge Hermle Z160M

neoLab, Heidelberg

SpectraMax 340PC³⁸⁴

Molecular Devices, Ismaning

2.7 Zellkultur

2.7.1 3D-Zellkultur

EpiDerm201™ skin model,
humanes Keratinozyten 3D-Modell

MatTek corporation, Ashland, USA

2.7.2 Reagenzien für die Zellstimulation

Epi 201 DM Differentiation medium
hull-24

MatTek corporation, Ashland, USA

2.7.3 Ausgewählte Verbrauchsmaterialien

6-well Zellkulturplatten

BD Biosciences, Heidelberg

2.7.4 Geräte

CO₂-Inkubator SanyoMCO-18 AIC

Cotech GmbH, Berlin

Durchlichtmikroskop Olympus BX45TF

Olympus, Hamburg

Werkbank für Sterilarbeit Hera Safe

Heraeus, Hanau

Multifuge 3 S-R

Heraeus, Hanau

Zentrifuge 5810

Eppendorf, Hamburg

3. Methoden

3.1 Tierversuche

3.1.1 Wundheilungsstudien

Für die Wundheilungsexperimente wurden 8-12 Wochen alte, männliche Mäuse verwendet. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion mit einer Injektionslösung bestehend aus Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, 10 % Vol.), 2 % Xylazinhydrochlorid (Rompun®, 5 % Vol.) und 0,9 % Natriumchlorid-lösung (85 % Vol.) narkotisiert. Dabei wurden 100 µl der Narkoselösung pro 10 g Körpergewicht der Maus injiziert. Gegen ein Austrocknen der Augen wurden die Augen der Versuchstiere mit Salbe (Bepanthen®) behandelt. Im narkotisierten Zustand wurde die Rückenhaut mit einem elektronischen Rasierapparat und Nassrasierer rasiert sowie anschließend mit ethanolhaltigen Desinfektionsmittel (Softasept®N) gereinigt. Die Rückenhaut wurde längs zur Körperachse der Maus zu einer Falte geformt, und zwei Mal mit einer Biopsie-Stanze („Biopsy Punch“, Durchmesser 4 mm) perforiert, so dass vier kreisrunde Wunden entstanden. Daraufhin erhielten die Tiere 100 µl Schmerzmittel mit dem Wirkstoff Flunixin-Meglumin (Finadyne®), welches subkutan in die Nackenfalte gespritzt wurde. Bis zum Aufwachen aus der Narkose wurden die Mäuse auf eine Wärmedecke gelegt. Nach dem Aufwachen aus der Narkose wurden die Tiere in neue Käfige zurückgesetzt. Die gewonnenen Hautbiopsien wurden bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Dokumentation und Auswertung der Wunden

Direkt nach Wundsetzung und kurz vor Tötung der Tiere wurden die Wunden der Tiere mit einer Digitalkamera aufgenommen. Für die Bestimmung der Wundheilungskinetik wurden täglich über 14 Tage die Wunden standardisiert dokumentiert. Dabei erfolgte die Digitalaufnahme von einer definierten Position der Kamera an einem Stativ und des Versuchstieres auf dem Labortisch. Für die Auswertung der Wundfläche mittels der Software VeV wound management (Vista Medical Ltd., USA) wurde parallel ein viereckiger Standard fotografiert.

Für die Bestimmung der Reepithelisierung wurde die Ratio aus Wundbreite und der Summe der Längen der Wundränder berechnet. Die jeweiligen Maße wurden mit Hilfe histologischer Aufnahmen der Wunden und der Software Photoshop Version CS4 ermittelt. Für die makroskopische Beurteilung der Wunden bezüglich der Granulations- und Reepithelisierungsphase wurden die Wunden mit Hilfe eines Punktesystems (1 Punkt: Wunde in entsprechender Phase; 0 Punkte: Wunde nicht in entsprechender Phase) bewertet, und anschließend die Anzahl der in der Granulations- bzw. Reepithelisierungsphase befindenden Wunden prozentual berechnet.

3.1.3 Topische Applikation

IL-22R1 defiziente Mäuse sowie Tiere des entsprechenden Wildtypstammes (129 SvJ) bekamen rekombinantes Maus- SerpinA1/PBS (R&D Systems) oder PBS (Kontrollgruppe) topisch auf die Wunde appliziert.

Zunächst erfolgte die Wundsetzung nach dem identischen Protokoll, wie es in Kapitel 3.1.2 beschrieben wurde. Für die Applikation wurde eine 100nM SerpinA1-PBS-Lösung hergestellt. Dafür wurden 10 µg mSerpina1 (rekombinant) in 2,22 ml PBS gelöst. Die Applikation der SerpinA1- bzw. Kontrolllösung erfolgte 42 h nach Wundsetzung durch Auflage einer 0,5 cm² großen, zurechtgeschnittenen Kompresse, die vorher mit 70 µl SerpinA1/PBS respektive PBS Lösung benetzt worden ist. Die Auflage wurde mit Hilfe eines Verbandes (Peha Haft) stabilisiert. Nach 24 h wurde der Verband inklusive der Kompressen entfernt. Die Wunden der Versuchstiere wurden nun wie zuvor bis zum 10. Tag digital fotografiert und deren Fläche analysiert.

3.1.4 Probengewinnung

Zu definierten Zeitpunkten (0 h–14 d) nach Wundsetzung wurden die Mäuse intraperitoneal mit einem Volumen von 100 µl pro 10 g Körpergewicht der Maus narkotisiert (Narkoselösung: Ketavet® 10 % Vol. Rompun® 10 % Vol. und NaCl-Lösung 80 % Vol.). Befanden sich die Tiere in tiefer Narkose, so fand eine Tötung mittels zervikaler Dislokation statt. Anschließend wurde die Rückenhaut zunächst mit Pinzette und Operationsschere vom Korpus entfernt, um dann die Wundareale mit

einem Skalpell von der Rückenhaut zu trennen, in ein Kryoröhrchen zu überführen und sofort einzufrieren (mit flüssigen Stickstoff). Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C .

3.1.5 Messung der Hautdicke

In einem separaten Versuch zur Phänotypisierung der Haut von IL-22R1 defizienten Mäusen und den dazugehörigen Wildtyp-Mäusen wurde die Hautdicke der Rückenhaut von 30 Wochen alten, männlichen Mäusen mit einem Präzisionsmessgerät (Kroeplin Längenmesstechnik) bestimmt.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Stimulation eines 3-D-Hautmodelles

Bei dem EpiDerm™ 201 Hautmodell der Firma MatTek (USA) handelt es sich um ein in Kultur gehaltenes humanes, dreidimensionales Hautmodell, welches aus Keratinozyten der Vorhaut von Neugeborenen generiert wurde. Es besitzt die Eigenschaft, dass die Keratinozyten noch kein vollständig entwickeltes Stratum corneum besitzen, sich also noch in der Differenzierungsphase befinden. Für die Stimulationsversuche wurde das Zytokin IL-24 mit einer Stammkonzentration von $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ in Medium (Epi 201 DM differentiation medium) auf eine Endkonzentration von 20 ng/ml verdünnt. Dazu wurden $12\text{ }\mu\text{l}$ der IL-24-Stammlösung 6 ml Medium zugegeben. Aus diesem Ansatz wurden 5 ml in ein Loch einer 6-Loch-Platte überführt. Medium ohne Zytokinzugabe wurde als Kontrollansatz verwendet. Die Hautmodelle wurden mit steriler Pinzette in die Ansätze überführt und für 3 d bei 37 °C und 5 \% CO_2 kultiviert. Danach wurden die Proben direkt in 1 ml RNA-Lysepuffer überführt, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in ein $1,5\text{ ml}$ Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden für die Genexpressionsanalyse weiter verarbeitet (Siehe Abschnitt 3.3.1) oder bei -80 °C gelagert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Nukleinsäure-Ebene

3.3.1.1 RNA-Isolierung

Um die Genexpression zu analysieren, wurde aus schockgefrorenen Gewebeproben die Gesamt-RNA isoliert. Dazu wurde zunächst die Gewebeprobe in 750 µl der Lyselösung des InViSorb® RNA-Kits II homogenisiert und anschließend 10 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte die Zugabe von Proteinase K für 1 h mit einer Endkonzentration von 4 mg/ml Proteinase K bei Raumtemperatur. Nach der RNA-Isolation mit dem InViSorb® RNA Kit II wird zunächst genomische DNA durch Zugabe von 40 µl Adsorbin gebunden. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation mit 14000 rpm bei 4 °C wird der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Nach Zugabe von 500 µl Phenol, 100 µl Chloroform und 50 µl Puffer A folgte die Zentrifugation für 10 min mit 14000 rpm. Dadurch wurden eine organische und eine wässrige Phase gewonnen. Nach Überführen der wässrigen RNA-haltigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß und einer Zugabe von 2 µl Glykogen sowie Isopropanol im selben Volumen wie die entsprechende wässrige Phase, erfolgte die Fällung der RNA für 60 min bei -20 °C. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm wurde das Pellet durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml eiskaltem 75 %igem Ethanol (5 min bei 14000 rpm) von überschüssigen Salzen befreit. Es folgte die Trocknung des Pellets für 2-5 min bei 60 °C und ein anschließendes Lösen in 50 µl DNase-/RNase-freiem Wasser. Die Bestimmung der Qualität und Quantität der isolierten RNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung der RNA-Moleküle innerhalb eines RNA-Analysechips mit dem Agilent 2100 Bioanalyser realisiert. Dabei wird die Gesamt-RNA-Konzentration als Summe der ribosomalen 18S- und 28S-RNA, deren Menge proportional zur isolierten „messenger“ RNA (mRNA) ist, in Bezug zu einem Standard (RNA 6000 Ladder) berechnet. Die gewonnenen RNA-Proben wurden entweder sofort in cDNA umgeschrieben oder bei -80 °C gelagert.

3.3.1.2 Verdau genomischer DNA und cDNA-Synthese

Vor Beginn der cDNA Synthese wurden die RNA Proben einem DNA-Verdau unterzogen, um mögliche Reste an genomischer DNA vor der Umschreibung zu eliminieren. Dafür wurden 28,5 µl Probenansatz mit 3,3 µl DNase 1 Puffer und 1 µl DNase für 30 min bei 37 °C versetzt. Der Verdau wurde unter Zugabe von 4 µl Inaktivierungsreagenz und ständigen mischen für 2 min gestoppt. Nach Zentrifugation bei 10000 g für 2 min wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Für die Analyse der Genexpression mittels Polymerase-Kettenreaktion mit revers transkribierter mRNA (RT-PCR) ist zunächst die Umschreibung der isolierten RNA in komplementäre „complementary“ DNA (cDNA) notwendig, da die für die PCR-Reaktion verwendete *Taq*-Polymerase eine DNA-Polymerase darstellt. Die cDNA-Synthese erfolgt durch eine komplementäre Bindung von kurzen DNA-Sequenzen, welche als „Primer“ bezeichnet werden. Die hier verwendeten Primer sind ein Gemisch aus 12 bis 18 bp langen Polydesoxythymidinen („Oligo d(T)-Primer“). Für die reverse Transkription wurde eine aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV) stammende RNA-abhängige DNA-Polymerase (MMLV-RT) verwendet. Nach einer Inkubation von 5 min bei 75 °C mit 0,005 µg/ml Oligo d(T)₁₂₋₁₈ und anschließender Lagerung für 5 min auf Eis wurde die mRNA mit folgenden Ansatz versetzt: Enzym-spezifischem Puffer (First Strand Buffer), 10 mM Dithiothreitol, 250 µM jedes der vier Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 Einheit/ml des Ribonuklease-Inhibitors RNAsin und 5 Einheiten/ml MMLV-RT. Der Probenansatz wurde nun 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die cDNA-Synthese bei 42 °C für 60 min in einem Thermo-Cycler begonnen. Durch eine 5-minütige Denaturierung des Enzyms bei 95 °C wurde die cDNA-Synthese abgestoppt und die Proben abgekühlt. Die cDNA Proben wurden bei -20 °C gelagert.

3.3.1.3 Quantitative Realtime-PCR

Die TaqManTM-PCR ist eine quantitative „real time“-RT-PCR-Methode (qPCR). Sequenz-spezifische Primer (Vorwärtsprimer und Rückwärtsprimer) und DNA-Sonde lagern sich an die durch Hitzedenaturierung gebildete einzelsträngige cDNA an. An

der verwendeten DNA-Sonde ist am 5'-Ende ein Reporterfarbstoff (6-Carboxy-Fluorescein, FAM) und am 3'-Ende ein Quencherfarbstoff (black hole quencher, BHQ) gekoppelt, wobei die Nähe der Farbstoffe zueinander zu einer Unterdrückung der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes führt. Während der PCR-Reaktion wird der Reporterfarbstoff durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der verwendeten Polymerase von der DNA-Sonde abgetrennt, wodurch die Nähe zum Quencherfarbstoff zerstört und Fluoreszenz frei wird. Somit steigt das Fluoreszenzsignal bei jedem Amplifikationszyklus proportional zur Amplifikation der Zielsequenz. Die unterdrückte Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes durch den Quencherfarbstoff wird als „Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) beschrieben [102, 103].

Zur Bestimmung von huSerpina1, huMMP9, miL-1, miL-4, miL-6, mTNF α , mTGF β , mTIMP1, mMMP2, mMMP3, mMMP9, mMMP10, mMMP13, mDSC1, mKLK7, mK1, mS100A9, mLCN2, mBD3 und der Referenzgene huHypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT) und mHPRT mittels TaqManTM-PCR wurden in einem 25 μ l-Ansatz (pro Reaktionsgefäß) 11,25 μ l einer cDNA-Verdünnung (1:10,25 in DNase-/RNase-freiem Wasser) 13,75 μ l PCR-Mix zugegeben. Der PCR-Mix bestand aus dem TaqManTM Universal PCR Mastermix, der jeweiligen Sonde und den zielgenspezifischen 3'- und 5'-Primern (Assay on Demand der Firma Applied Biosystems).

Zur Bestimmung von miL-17A, miL-19, miL-20, miL-22, miL-24, miFN γ , mSerpina1 und des Referenzgens mHPRT wurden in einem 25 μ l-Ansatz (pro Reaktionsgefäß) 1 μ l einer cDNA-Verdünnung (Verdünnung in DNase- / RNase-freiem Wasser) mit 20 μ l PCR-Mix versetzt. Der PCR-Mix bestand aus dem TaqManTM Universal PCR Mastermix, der jeweiligen Sonde, zielgenspezifischen 3'- und 5'-Primern (Sequenzen und Konzentration der synthetischen Oligonukleotide im Abschnitt 2.2.2).

Mit Beginn der quantitativen PCR wurde der Ansatz zunächst zur Aktivierung der Uracil-N-Glycosylase für 2 min bei 50 °C inkubiert. Die Funktion der Uracil-N-Glycosylase besteht in der Degradation uracil-haltiger PCR Produkte, die zu einer Kontamination führen können. Durch Erhöhung der Temperatur auf 95 °C für 10 Minuten wurde die Uracil-N-Glycosylase inaktiviert, deren Abbauprodukte zerstört und die Polymerase irreversibel aktiviert.

Bei der nun stattfindenden Zwei-Schritt-PCR wurden zunächst die DNA-Doppelstränge durch Hitzdenaturierung bei 95 °C für 15 s getrennt. Im folgenden Schritt lagerten sich Sonde und Primer an die einzelsträngige DNA durch Abkühlung

auf 60 °C an, was die Neusynthese des Doppelstrangs (kombinierter Hybridisierungs- Elongations-Schritt) während 1 min initiierte. Durch eine zyklische Wiederholung (45 Zyklen) von Denaturierung und Hybridisierung/Elongation wird die Zielsequenz exponentiell vermehrt. Die Amplifikation erfolgte parallel zum Referenzgen HPRT jeweils als Dreifachbestimmung. Für die Analyse wurde der ABI Prism[®] 7700 Sequence Detector mit der Software SDS Version 1.6.3 verwendet. Die Bestimmung der Expression der Zielgene wurden zum Referenzgen HPRT normalisiert, was mit Hilfe des ΔCt Wertes, der Differenz zwischen der Schwellen-Zyklenzahl des zu quantifizierenden Gens und der des Referenzgens, als $2^{-\Delta\text{Ct}}$ dargestellt wurde.

3.3.1.4 cDNA-Microarray-Analyse

Die genomweite Genexpressionsanalyse wurde von Wundbiopsien IL-22R1^{-/-} defizienter Mäuse und Wildtyp-Mäusen (129 SvJ) 2 Tage nach Wundsetzung ermittelt. Dafür wurde gesamt RNA isoliert und quantifiziert (Siehe Abschnitt 3.3.1.1). Die Microarray-Analyse wurde durch das Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik in Regensburg (KFB) durchgeführt. Dies schließt die Umschreibung der Proben-RNA in ss-cDNA, Markierung, Hybridisierung, Waschen, Färben, Scannen und Datenanalyse ein. Die Proben wurden auf einen Mouse Genome 430 2.0 Array chip der Firma Affymetrix hybridisiert. Damit konnte die Expression von 34000 charakterisierten Genen der Maus ermittelt werden. Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals erfolgte mit der Affymetrix GeneChip[®] Operating 1.4 und Expression Console 1.1 Software (GCOS).

3.3.2 Protein-Ebene

3.3.2.1 Western Blot

Die Methode des Western Blotting ist ein immunologisches Nachweisverfahren, bei dem elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran (z.B. Nitrocellulose) übertragen werden. Über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen bleiben die Proteine an der Trägermembran immobilisiert. Die Proteine können nun spezifisch identifiziert werden. Dazu inkubiert

man die Trägermembran mit einem primären Antikörper, welcher für das jeweilige Protein spezifisch ist. Nach Zugabe eines sekundären, mit einem Enzym gekoppelten Antikörpers, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, kann der Protein-Antikörperkomplex detektiert werden. Hierbei werden die auf eine Trägermatrix aufgetragenen Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran transferiert. Durch hydrophobe Wechselwirkungen werden diese auf der Trägermembran immobilisiert und können nachfolgend durch Bindung eines primären Axs, welcher für das relevante Protein spezifisch ist, identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde ein mit Peroxidase assoziierter sekundärer Ak verwendet. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol, wodurch Chemilumineszenz erzeugt wird. Diese elektromagnetische Strahlung wird mit Hilfe eines Autoradiographie-Filmes (ECL-Hyperfilm) aufgenommen.

3.3.2.1.2 Herstellung von Zelllysaten

Die Lyse der Wundbiopsien erfolgte mechanisch und durch einen Triton-X-basierenden Lysepuffer. Triton-X ist ein nichtionisches Detergenz, welches Zellmembran-Protein-Komplexe zerstört. Die Anwesenheit verschiedener Proteinaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren stellt ein Schutz vor proteolytischer Degradation und vor einer Dephosphorylierung der Proteine im Zelllysate dar. Für die Lyse wurden die Wundbiopsien in 300 µl Lysepuffer und mechanisch mittels Homogenisierer lysiert. Das Reaktionsgefäß wurde weiterhin für 10 min bei 4 °C geschüttelt bevor es bei 12000 g für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert wurde. Die Überstände konnten anschließend in ein auf Eis vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt werden.

3.3.2.1.3 Proteinquantifizierung

Der Proteingehalt der Serumproben wurde auf Grundlage der Biuret-Reaktion ermittelt. Für die Messung der Serumproben wurde das BCA Protein Assay Kit verwendet. Der Proteinstandard entspricht einer Konzentrationsreihe einer BSA-Lösung und wurde mit dem Verdünnungspuffer der Proben hergestellt. Jeweils 25 µl der Standards und der Probe wurden in eine 96-Well-Platte transferiert und 200 µl einer Lösung (1 Teil 4 % Kupfersulfat-Lösung, 50 Teile Bicinchoninsäure-Lösung)

zugegeben. Mit Hilfe eines Plattenschüttlers wurden die Proben zunächst für 30 s resuspendiert und anschließend für 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nachdem die Zellkulturplatte auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die photometrische Messung der Absorption bei 562 nm durchgeführt.

3.3.2.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Verwendung des anionischen Detergenz SDS führt bei hohen Temperaturen dazu, dass die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine zerstört wird und alle Proteine negativ geladen sind. Im elektrischen Feld können die Proteine aufgetrennt werden. Dabei wandern größere Moleküle aufgrund höherer Reibungskräfte langsamer als kleinere Moleküle. Die Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteinbanden erfolgt anhand eines Proteinmarkers. Für die Gelelektrophorese bestand jeder Ansatz aus 20 µl Zelllysate (normalisierte Proben), 7,5 µl 4x LDS Proben-Puffer und 2,5 µl 10x reduzierendes Agens. Als Proteinmarker dienten der MagicMark XP™ Western-Standard und der SeaBlue® Protein Standard, welche zu gleichen Teilen verwendet wurden. Nach einer Inkubation von 5 min bei 95 °C wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Nachdem das Gel in die Gelelektrophorese-Kammer platziert wurde, die mittlere Kammer mit 200 ml 1x SDS Laufpuffer und 1 ml Antioxidant aufgefüllt und die äußere Kammer mit 600 ml 1x SDS Laufpuffer aufgefüllt wurde, fand die Probenauftragung statt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 V für 35 min.

3.3.2.1.5 Blotting

Das Blotting definiert den Transfer in horizontaler Ebene im elektrischen Feld der in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran. Dafür wurde das Gel zwischen Filterpapier und Nitrozellulosemembran mit einem weiteren Filterpapier platziert und von Schwämmen umgeben in eine Blotting-Kammer eingelegt. Der Transfer der Proteine erfolgt in Richtung der Anode. Nach Zugabe von Transfer-Puffer zum Blotting-Modul und nach Auffüllen der äußeren Kammern mit destilliertem Wasser wurde der Transfer bei 30 V und 170 mA für 1 h durchgeführt.

3.3.2.1.6 Immunnachweis

Die mit Proteinen beladene Nitrozellulosemembran wurde zunächst für 5 min in 1x TBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen mit 5 % Milchpulver in TBST für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in 1x TBST, wurde der Membran der primäre Antikörper zugegeben. Dafür wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit einem primären Kaninchen Anti-hu-pAk (polyklonaler Antikörper) in einer Verdünnung von 1:1000 (Anti-P-STAT3, Anti-STAT3) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in TBST-Puffer, wurde der sekundäre Ziege Anti-Kaninchen-mAk in einer 1:4000 Verdünnung (in Block-Puffer) für 1 h bei Raumtemperatur zugegeben. Alle Inkubations- und Waschschrirte wurden schüttelnd bei 35 Upm durchgeführt.

3.3.2.1.7 Signalentwicklung

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran dreimalig und für je 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit 5 ml ECL für 1 min. Die Detektion der Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines ECL-Hyperfilm in einer Filmkassette realisiert. Nach Zugabe des belichteten Films in Entwicklerlösung wurde ein Bandenmuster erkennbar. Nach Schwenken in Fixierlösung wurde der Film fertiggestellt.

3.3.2.2 Immunassay- Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA ist eine Nachweismethode für Proteine, die durch eine enzymatische Farbreaktion detektiert werden. Für die Quantifizierung von alpha1-Antitrypsin wurde ein ELISA System mit dem Sandwich-Prinzip verwendet. Dafür ist ein Antikörper an einer festen Phase (z.B. Vertiefung einer Mikrotiterplatte) verankert und bindet Antigene einer zugegebenen Probe. Der nachfolgend zugegebene, mit einem Reporterenzym konjugierte Detektionsantikörper bindet an andere Epitope des Zielmoleküls. Das Reporterenzym realisiert bei der anschließend zugegebenen Substratlösung einen Farbumschlag, welcher photometrisch bei einer entsprechenden Wellenlänge quantifiziert werden kann.

Im Rahmen der Wundheilungsstudien wurde der Proteingehalt an α 1-Antitrypsin in Seren von Mäusen nach Wundsetzung bestimmt. Für die Quantifizierung wurde das ELISA-Kit der Firma GenWay (San Diego, USA) verwendet. Die Serumproben und im Kit enthaltenen Proteinstandards wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit immobilisierten anti-Maus α 1-Antitrypsin Antikörper zugegeben. Nach einer Inkubation von 60 min bei Raumtemperatur erfolgte die Entfernung nicht gebundener Proteine mittels dreimaliger Zugabe des Waschpuffers. Danach wurde der Enzym-konjugierte Antikörper für eine weitere Stunde zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde dabei abgedunkelt gelagert. Nach erneuten Waschschritten wurden die nicht gebundenen konjugierten Antikörper aus den Reaktionsgefäßen eliminiert. Nach der Zugabe des Chromogens (3, 3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB; Wasserstoffperoxid in Zitronensäurepuffer, pH3,3) erfolgte eine Inkubation (dunkel) für 5 min. Der Farbumschlag wurde mit der im Kit enthaltenen Stop-Lösung beendet, und die Farbtintensität bei 450 nm gemessen. Die exakte Quantifizierung der Proben wurde über die Werte des definierten Proteinstandards ermittelt.

3.4 Histologie

3.4.1 Fixierung und Einbettung in Paraffin

Wundbiopsien oder Rückenhaut wurden auf Filterpapier gelegt und in Einbettkassetten aufbewahrt. Die Einbettkassetten wurden anschließend in 4 % gepufferter Formaldehydlösung für mindestens 24h aufbewahrt. Für die Einbettung wurde der Gewebeeinbettautomat mit den Einbettkassetten bestückt. Die Proben wurden zunächst 20 min mit Wasser gewaschen. Danach folgte die Entwässerung mit 70 % Ethanol für 50 min und in einem weiteren Schritt für 60 min. Die Einbettkassetten wurden dann in 96 % Ethanol für 45 min inkubiert. Danach folgte die Zugabe von Ethanol (absolut) für 50 min und zweimal 60 min. Vor der Einbettung wurden die Proben zunächst für 45 min mit Xylol, danach für 60 min mit Xylol, versetzt. Die Einbettung erfolgte unter Zugabe von Paraffin für 90 min und darauf folgend mindestens 120 min.

3.4.2 Anfertigen von Paraffinschnitten

Paraffinblöcke wurden bei -20 °C vorgekühlt und anschließend in die Halterung eines Mikrotoms eingespannt. Danach wurden Gewebeschnitte von 2 µm angefertigt. Nach kurzer Lagerung im Wasserbad (56 °C), konnten die Schnitte auf Objektträger gezogen werden. Anschließend wurden die Objektträger bei 65 °C im Trockenschrank für mindestens 2 h getrocknet.

3.4.3 Anfertigen von Gefrierschnitten

Schockgefrorene Gewebeproben wurden auf einer gekühlten Schnitthalterung für das Mikrotom in Einbettmedium (Jung-Leica Microsystems GmbH, Deutschland) eingebettet. Die eingebetteten Proben wurden bei -25 bis -30 °C im Mikrotom geschnitten. Die 6 µm dicken Gewebeschnitte wurden unmittelbar nach dem Schnitt auf beschichtete Objektträger transferiert. Anschließend fand die Fixierung der Schnitte in Aceton für 10 min bei -20 °C statt.

3.4.4 Hämatoxylin Eosin Färbung

Die Hämatoxylin Eosin Färbung ist eine standardisierte Färbemethode in der Histologie. Dabei werden zwei Einzelfärbungen an Gefrier-oder Paraffinschnitten durchgeführt, wobei Hämatoxylin säurehaltigen Strukturen wie Zellkerne, DNA und das endoplasmatische Retikulum im Gewebe bzw. in der Zelle anfärbt. Eosin färbt basische Strukturen von Plasmaproteinen und Kollagen an. Die Gefrierschnitte wurden zunächst 1h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 30 s mit 70 % Ethanol inkubiert. Danach wurden die Proben für 30 s in destilliertem Wasser gehalten und anschließend für 90 s mit Hämatoxylin gefärbt. Der ersten Färbung folgte ein Waschgang unter laufendem Leitungswasser für 3 min. Die Schnitte wurden nun für 20 s mit Eosin gefärbt und anschließend für jeweils 30 s in 70 %-, 96 %- und absoluten Ethanol entwässert. Nach der Inkubation mit Xylol für 30 s wurden die Präparate mit Eindeckmittel (Entellan®) beschichtet.

3.4.5 Immunhistochemie

Vor der Immunfärbung wurden die Paraffinschnitte zunächst deparaffiniert. Dies wurde durch eine Inkubation in 99 % -, 80 %-, 70 % Ethanol für jeweils 3 min und Zugabe von Wasser für 2 min sowie von TBS für 5 min realisiert. Durch die Fixierung mit Formaldehydlösungen können cross-link Verbindungen mit Proteinen entstehen, wodurch Antigene verdeckt werden. Damit die Antikörper am Epitop des Antigens binden können, wurden die Schnitte demaskiert. Citratpufferlösungen können diese Proteinverbindungen brechen und somit die Epitope zugänglich machen. 80 ml Citratpuffer (50x, pH 6) wurde in einen Dampftopf mit Wasser gegeben und auf 85 °C vorgewärmt. Die Objektträger wurden nun für 20-25 min erhitzt und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die Proben dreimal mit TBS für 5 min gewaschen.

Danach folgte die Zugabe des primären, biotinylierten Antikörpers (biotinylierter Ratte-anti IL-24 Maus Antikörper, 25 µg/ml, R&D) über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaliger Waschung mit TBS für 5 min, wurden für 1h die Schnitte mit Streptavidin und Meerrettich-Peroxidase in 1 % BSA Lösung (1:300 Verdünnung, DAKO) inkubiert. Erneut wurden den Schnitten dreimal für je 5 min TBS zugegeben. Nun folgte die Zugabe des Chromogens (3-Amino-9-Ethylcarbazole, AEC, DAKO) für 20 min. Nach drei weiteren Waschschritten für je 5 min mit TBS wurden die Schnitte für 2 min mit Hämalaun gegengefärbt und anschließend für 10 min mit Leitungswasser gespült. Die Schnitte wurden nun mit Eindeckmittel (Aquatex, Merck) beschichtet und mikroskopisch begutachtet.

3.4.6 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzdetektion wurde in der AG Loddenkemper (jetzt AG Kühl) durchgeführt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Schnitte zunächst mit dem primären Antikörper für 60 min bei 37 °C inkubiert und nach weiteren Wasch- und Blockierungsschritten mit dem Fluorochrom-konjugierten, sekundären Antikörper für 60 min behandelt. Nach weiteren Waschschritten wurde mittels 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Verdünnung 1:1000, Roche, Deutschland) gegengefärbt und die Schnitte anschließend eingedeckt (Fluoromount-G, Southern Biotech, USA). Bei der

Immunfluoreszenz wurden folgende primäre Antikörper verwendet: polyklonaler Ziege anti-Maus IL-24 Antikörper (Verdünnung 1:10; R&D Systems, USA), polyklonaler Kaninchen anti-CD3 Maus Antikörper (Verdünnung 1:10; Dako). Folgende Fluorochrom-konjugierte Antikörper wurden benutzt: Alexa Fluor 488-konjugierter Esel anti-Ziege Antikörper (Verdünnung 1:200; Invitrogen, USA), Alexa Fluor 555-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Antikörper (Verdünnung 1:200, Invitrogen, USA).

3.5 Zymographie

3.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Die Lyse der Wundbiopsien für die Zymographie erfolgte ebenfalls mechanisch und durch einen Triton-X-basierenden Lysepuffer. Als Lysepuffer wurde der zuvor definierte Arbeitspuffer verwendet. Unter Zugabe von 500 µl Puffer wurde das Wundgewebe mittels Homogenisator zerstört. Nach einer Zentrifugation von 5 min, bei 12000 g und 4 °C wurde der Überstand von dem im Pellet vorhandenen Zellmaterial in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Proben wurden bei -80 °C gelagert oder zur sofortigen Proteinbestimmung weiterverwendet.

3.5.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit in identischer Weise, wie in Abschnitt 3.3.2.1.3 beschrieben.

3.5.3 Aufreinigung der Proteinextrakte

Die nach Lyse der Wundbiopsien erhaltene Proteinlösung wurde vor der zymographischen Detektion aufgereinigt und somit die Matrixmetalloproteasen isoliert. Die dafür notwendige Gelatine Sepharose-Lösung (GE Healthcare) wurde zunächst mit Arbeitspuffer gewaschen. Gleiche Volumenanteile Sepharose-Lösung und Arbeitspuffer wurden in einem Eppendorfgefäß vermischt und unter Rotation 15

min bei 4 °C im Kühlschrank gewaschen. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 3000 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und der Waschschrift zwei weitere male wiederholt. Die gewaschene Gelatine-Sepharose-Lösung wurde zu den Proben gegeben, die zuvor anhand der Proteinquantifizierung normalisiert wurden. Die Inkubation erfolgte nun bei 4 °C für eine Stunde unter Rotation. Danach wurden die Proben für 5 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Vor Zugabe des Elutionspuffers wurde das Pellet wie zuvor beschrieben dreimal gewaschen. Nach Zugabe des Elutionspuffers rotierte das Probengefäß für 30 min bei 4 °C. Danach wurden die Proben erneut für 5 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthält das gereinigte Proteinextrakt.

3.5.4 Zymographie

Die Zymographie ist ein speziell für matrixdegradierende Proteasen bestimmtes Nachweisverfahren. Ein aufgereinigtes Proteingemisch wird auf Basis der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Das Trenngel enthält Gelatine, welches von den in der Probe vorhandenen Gelatinasen verdaut werden kann. Nach Färbung des Gels bleiben die Positionen an denen sich die Proteasen befanden ungefärbt und heben sich als farblose Banden vom Rest des Gels ab.

Nach Vorbereitung der Elektrophoresekammer und Verdünnung der benötigten Puffer wurde das Gel (Novex® Zymogramm Gel, Invitrogen) mit den Proben beladen. Pro Geltasche fand eine Beladung mit 5 µl Proteinextrakt, 5 µl Probenpuffer (Novex® SDS-Sample Puffer, Invitrogen) und 5 µl entionisierten Wasser statt. Bei einer angelegten Spannung von 125 V und einer Stromstärke von 30-40 mA wurde die Elektrophorese für 90 min durchgeführt. Nach der Auftrennung des Proteingemisches wurde das Gel in Renaturierungspuffer unter Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abgießen des Renaturierungspuffers wurde zunächst für 30 min Entwicklungspuffer hinzugegeben. Dieser Schritt wurde wiederholt und das Gel langsam schüttelnd etwa 18 h (über Nacht) bei 37 °C inkubiert. Das Gel wurde nun dreimalig für 5 min mit entionisierten Wasser gewaschen. Daraufhin wurde das Gel für 30 min bei Raumtemperatur mit der Färbelösung (Simply blue Safe Stain, Invitrogen) inkubiert und anschließend mit

entionisierten Wasser für 1-3 h gewaschen. Das Gel konnte nun durch digitale Fotografie dokumentiert werden.

3.6 Statistik

Für die Bestimmung der Signifikanz unterschiedlicher Parameter in rezeptordefizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Mit Hilfe dieser statistischen Methode können nicht normalverteilte, unabhängig zueinander stehende Stichproben zweier Grundgesamtheiten miteinander verglichen werden.

Die Daten der Stimulation dreidimensionaler Keratinozytenkulturen mit IL-24 und PBS wurden statistisch mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentest ausgewertet. Dieser statistische Test vergleicht nicht normalverteilte, abhängige Stichproben miteinander. Mann-Whitney-U-Test und Wilcoxon-Rangsummentest eignen sich für die Analyse geringer Stichprobenzahlen. Die Testergebnisse wurden in P-Werte umgerechnet. Sie geben das maximale Niveau an bei der die Nullhypothese nicht gegeben ist. Eine statistische Signifikanz von $p \leq 0,05$ wird mit „*“, von $p \leq 0,01$ mit „**“ und von $p \leq 0,001$ mit „***“ bewertet. Die statistische Auswertung erfolgte für alle Datensätze mit Hilfe der SPSS Version 12.0 Software.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse der Genexpression von IL-10 Zytokinen in kutaner Wundheilung

Mit Hilfe von *in vivo* Studien am Mausmodell wurde untersucht, inwieweit Interleukine der IL-10 Zytokinfamilie am kutanen Wundheilungsprozess beteiligt sind. Da von IL-26 kein murines Homolog bekannt ist, wurde zunächst die Expression von IL-19, IL-20, IL-22 und IL-24 in unverletzter Haut und in Wundbiopsien analysiert. Dafür wurde RNA aus dorsalen Hautbiopsien von Wildtypmäusen (129 SvJ) isoliert und nach cDNA Synthese eine qPCR durchgeführt. Die Genexpressionsanalyse ergab, dass IL-19 und IL-22 in unverletzter Haut nicht exprimiert waren. IL-20 wurde in unverletzter Maushaut dagegen eindeutig exprimiert. Eine im Vergleich zu IL-20 um etwa hundertfach reduzierte Expression konnte für IL-24 beobachtet werden (Abb. 5).

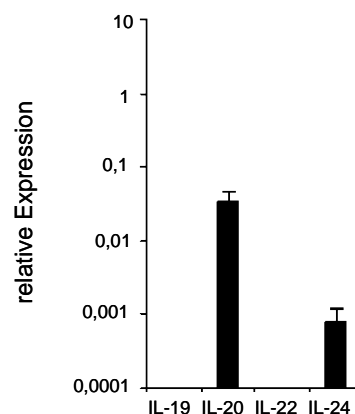


Abb.5: IL-10 Zytokine in unverletzter Haut. Die Genexpression von IL-10 Zytokinen wurde in Hautbiopsien von Wildtyp-Mäusen (129 SvJ) mittels qPCR und relativ zur Expression des Haushaltsgens HPRT bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 4-6 Proben (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes).

Für die Expressionskinetik während der Wundheilung wurden zu definierten Zeitpunkten nach Wundsetzung Wundbiopsien entnommen und für die qPCR aufgearbeitet. Dabei stellte sich heraus, dass IL-19 nach Wundsetzung während des Heilungsverlaufes induziert wird und ein Expressionsmaximum am ersten Tag nach der Wundsetzung erreicht. Das Expressionsniveau blieb während der ersten drei Tage etwa bestehen, reduzierte sich aber ab dem fünften Tag nach der Verwundung.

IL-20 wurde über den gesamten Wundheilungsprozess konstitutiv reguliert. Eine erhöhte Expression zeigte sich am Tag 3 nach Wundsetzung. IL-22 konnte zu keinem definierten Zeitpunkt detektiert werden. Dagegen erhöhte sich die Expression von IL-24 in der frühen Wundheilungsphase. Die maximale Expression konnte am dritten Tag nach Wundsetzung beobachtet werden und lag damit 1200-fach über dem Expressionsniveau von IL-24 in unverletzter Haut. Während der Gewebereparatur war IL-24 neben IL-19 innerhalb der IL-10 Zytokinfamilie der am stärksten exprimierte Mediator (Abb. 6).

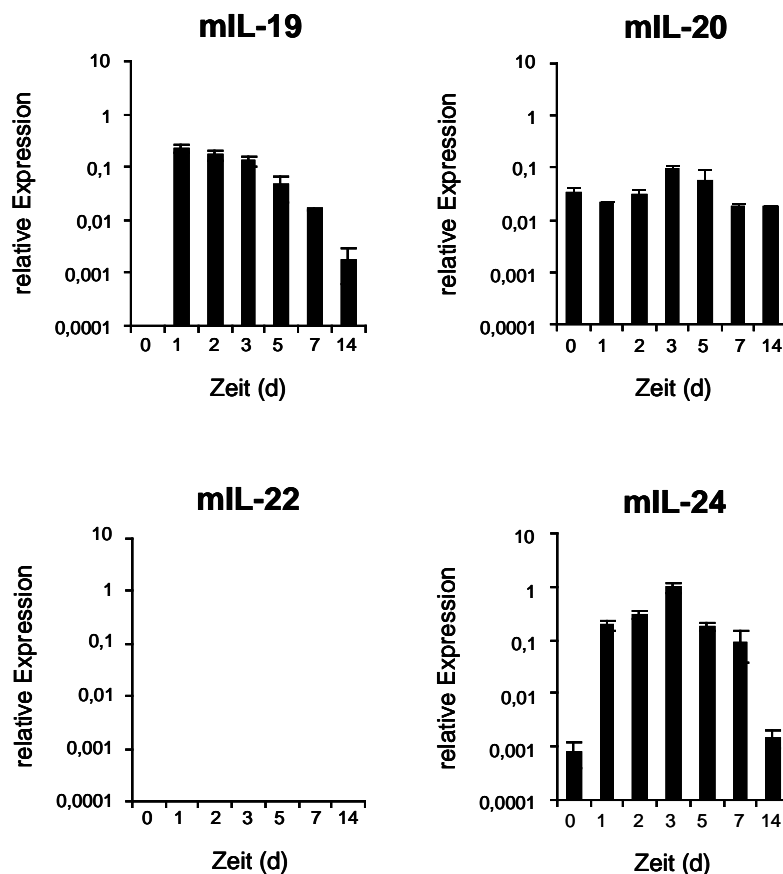


Abb.6: IL-10 Zytokine in kutaner Wundheilung. Die Genexpression von IL-10 Zytokinen wurde in Wundbiopsien von Wildtyp-Mäusen (129 SvJ) zu definierten Zeitpunkten post Wundsetzung gemessen. Der Zeitpunkt „0“ steht für unverletzte Haut. Die Genexpression wurde mittels qPCR und relativ zur Expression des Haushaltsgens HPRT bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 4-8 Proben (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes).

4.2 Signaltransduktion der IL-10 Zytokine

Interleukine vermitteln Signale via Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Im Falle der IL-10 Familienmitglieder, stellte die Phosphorylierung von STAT3 Proteinen einen wesentlichen Signaltransduktionsweg bisher dar [65, 81]. Anhand des

Proteinnachweises phosphorylierter STAT-Proteine sollte untersucht werden, ob die JAK/STAT3-Signaltransduktion im Mausmodell aktiviert wurde. Mit am siebten Tag nach Wundsetzung gewonnenen Wundbiopsien von Wildtyp-Mäusen (129SvJ) wurde mittels Western Blot eine Analyse hinsichtlich der Phosphorylierung von STAT3 Proteinen durchgeführt (Abb. 7). Die für die Messung verwendeten Wundproben wurden sieben Tage nach Wundsetzung entnommen und, wie in Abschnitt 3.3.2.1 beschrieben, aufgearbeitet.

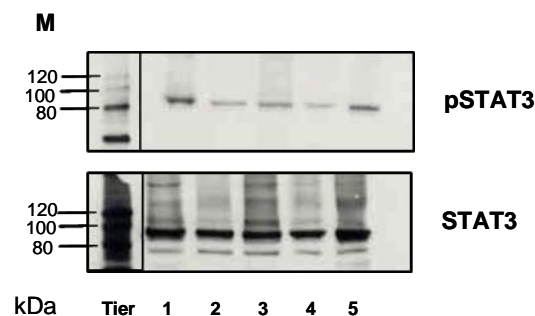


Abb.7: STAT3 Phosphorylierung in kutaner Wundheilung. Die Präsenz von STAT3 und pSTAT3 wurde in Wundbiopsien (7d nach Wundsetzung) von Wildtyp-Mäusen (129SvJ) mittels Westernblot-Analyse bestimmt (n=5).

Anhand des Bandenmusters bei etwa 86kDa ist klar zu erkennen, dass in allen fünf Versuchstieren eine Phosphorylierung von STAT3 Proteinen während der Wundheilung stattfand. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass IL-10 Zytokine eine funktionelle Rolle in der kutanen Wundheilung besitzen.

4.3 Wundheilung in rezeptordefizienten Mäusen

Damit IL-10 Zytokine Effekte vermitteln können, muss zunächst die Bindung an heterodimeren Rezeptorkomplexen erfolgen. IL-20 und IL-24 können an den IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex und den Rezeptor bestehend aus der IL-20R1 und IL-20R2 Rezeptoruntereinheit binden. Für den IL-20R1/IL-20R2 Rezeptor stellt IL-19 ebenfalls ein Ligand dar [62, 65, 80-82].

Um die Funktionalität der IL-10 Zytokine genauer zu bestimmen, wurden Wundheilungsstudien mit rezeptordefizienten Mäusen durchgeführt. Dabei wurde der Wundheilungsverlauf makroskopisch an IL-20R1-, IL-22R1- knock-out Mäusen sowie an den entsprechenden Wildtyp-Mäusen analysiert. Für alle Wundheilungsversuche

wurden männliche Mäuse in einem Alter von 8-10 Wochen verwendet. Durch die fehlende IL-20R1 Rezeptorkette besitzen die Mäuse keinen intakten IL-20R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex. Der Verlust der IL-22R1 Rezeptoruntereinheit führt zu einer Defizienz funktioneller IL-22R1/IL-20R2 und IL-22R1/IL-10R2 Rezeptorkomplexe. Während der Zucht und nach den Versuchen wurden die Tiere nach Entnahme von Schwanzbiopsien von technischen Assistenten der Arbeitsgruppe genotypisiert.

4.3.1 Wundheilung in IL-20R1 defizienten Mäusen

Der Wundschluss von IL-20R1 defizienten Mäusen (IL-20R1^{-/-}/C57B6) und den Wildtyp-Tieren (C57B6) wurde nach Wundsetzung täglich mit Digitalfotografie dokumentiert. Die Wundfläche von vier Wunden pro Maus wurde anschließend über eine Software ausgewertet.

Nach makroskopischer Beurteilung der Wunden sowie nach Beurteilung des Verhaltens der Tiere nach dem operativen Eingriff war kein Unterschied erkennbar. Die Messung der Körpergewichte während des Heilungsprozesses offenbarte bei den Versuchstieren beider Stämme einen identischen Verlauf der Mittelwerte der Körpergewichte (Abb. 8). Nach Analyse der Wundflächen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den IL-20R1 defizienten Mäusen und den Kontroll-Tieren des Wildtypstammes festgestellt werden. Bereits nach 24h betrug die relative Wundfläche im Durchschnitt 58% bei den IL-20R1 defizienten Mäusen und 52% bei den Wildtyp-Mäusen. Sieben Tage nach Wundsetzung betrug die Wundfläche bei beiden Versuchsgruppen weniger als 10% bezogen auf die Wundfläche kurz nach Wundsetzung. Am zehnten Tag nach der Verwundung waren die Wunden bei den IL-20R1 KO Mäusen und dem entsprechenden Wildtyp-Stamm geschlossen (Abb. 8).

Weiterhin wurden die Wunden pro Zeitpunkt danach zugeordnet, ob sie sich in einer Granulations- oder Reepithelisierungsphase befinden. Dafür wurde jede Wunde makroskopisch auf dem Digitalfoto beurteilt. Die Auswertung erfolgte verblindet von einer Mitarbeiterin, die am vorherigen Ablauf des Experimentes nicht beteiligt war. Nach Zuordnung der Wundheilungsphasen konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden. Bereits ein Tag nach Wundsetzung begann bei etwa 40% der Wunden die Granulation. Fünf Tage nach Wundsetzung setzte bei 50% der KO-Wunden und 41% der Wildtyp-Wunden der Tiere die Reepithelisierung ein. Am siebten Tag nach der Wundsetzung waren alle beobachteten Wunden in der Reepithelisierungsphase. Da IL-20R1 KO- und die

dazugehörigen Wildtyp-Mäuse einen identischen Phänotyp hinsichtlich der makroskopischen Wundheilung zeigen, muss man annehmen, dass IL-20R1 Rezeptorkomplexe nicht entscheidend im Wundheilungsprozess involviert sind (Abb. 8).

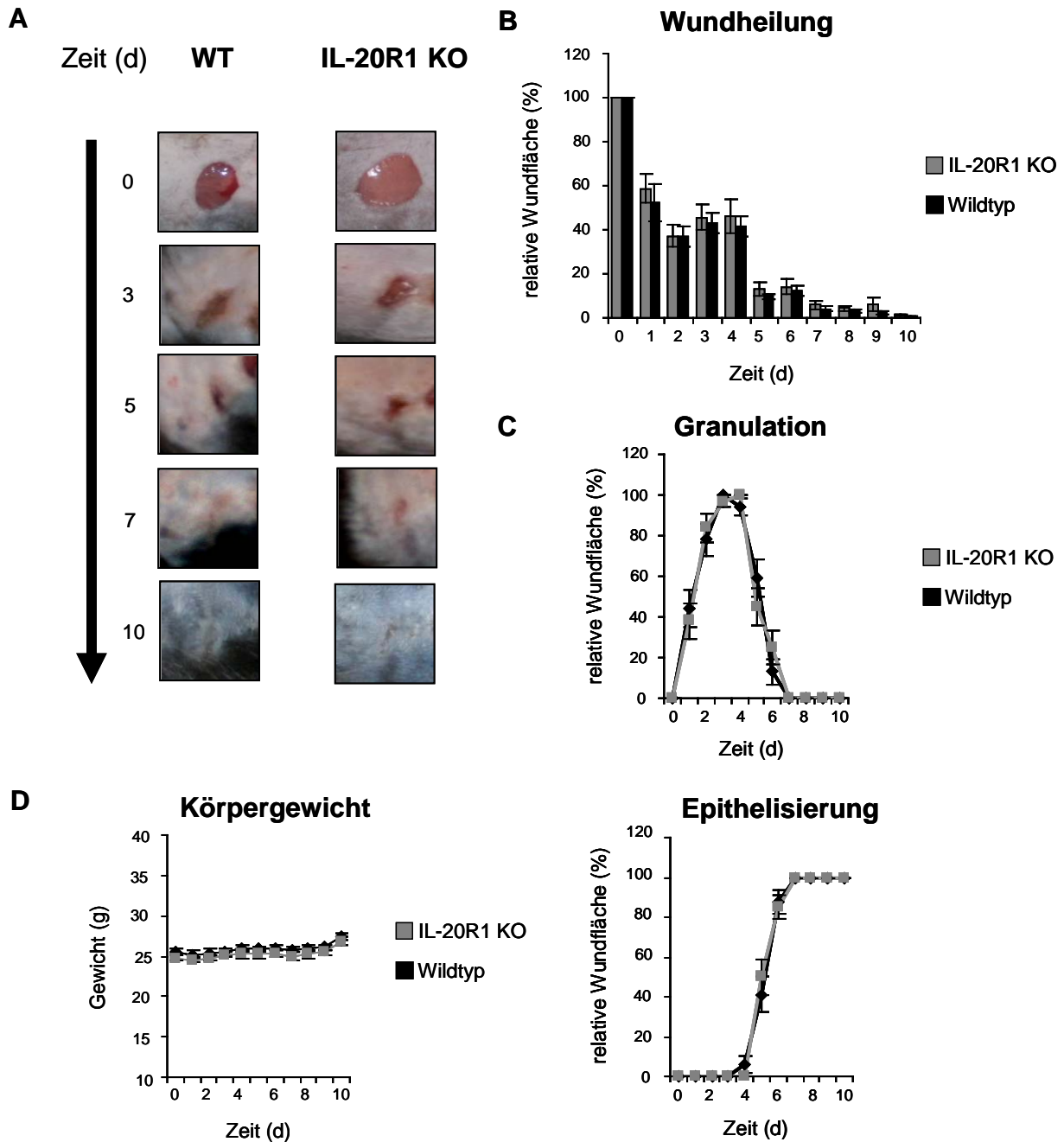


Abb.8: Kutane Wundheilung in IL-20R1 defizienten Mäusen. IL-20R1 defizienten Mäusen (IL-20R1^{-/-} / B6) und Wildtyp-Mäusen (B6) wurden dorsal vier Wunden gestanzt. (A,B) Die Wunden wurden zu definierten Zeitpunkten digital fotografiert. Die Wundfläche aller Wunden von 8 Tieren pro Gruppe wurde mittels VEV wound management software bestimmt. Dargestellt ist die Wundfläche relativ zur Wundfläche unmittelbar nach Wundsetzung. (C) Makroskopische Beurteilung (verblindet) der Wunden nach Wundphasen über ein scoring system (+/-). Die relative Anzahl der Wunden der IL-20R1^{-/-}- und WT-Mäuse, die sich in der jeweiligen Phase befinden, werden gezeigt. (D) Körpergewicht von IL-20R1^{-/-}- und WT-Mäuse während des Wundschlusses.

(B,C,D) Dargestellt sind die Ergebnisse von je 8 Tieren pro Gruppe (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes).

4.3.2 Wundheilung in IL-22R1 defizienten Mäusen

Analog zu den IL-20R1 defizienten Mäusen wurden Wundheilungsstudien mit IL-22R1 defizienten Mäusen (IL-22R1^{-/-} 129SvJ) und den Mäusen des Wildtypstammes (129 SvJ) durchgeführt.

IL-24 und IL-20 sind Liganden für den IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex. Über den IL-22R1/IL-10R2 Rezeptor bindet IL-22 an entsprechenden Zielzellen.

Bei Beurteilung der unverletzten Haut konnten keine phänotypischen Unterschiede zwischen IL-22R1 defizienten Mäusen und den dazugehörigen Wildtyp-

Tieren festgestellt werden. Histologisch wie auch nach Messung der Hautdicke waren keine Unterschiede identifizierbar. Die Messung der Hautdicke (Hautbiopsie, dorsal) ergab bei 30 Wochen alten, männlichen IL-22R1 defizienten Tieren ein Mittelwert von 0,45 mm. Die Tiere des Wildtypstammes besaßen im Mittel eine Hautdicke von 0,44 mm (Abb. 9).

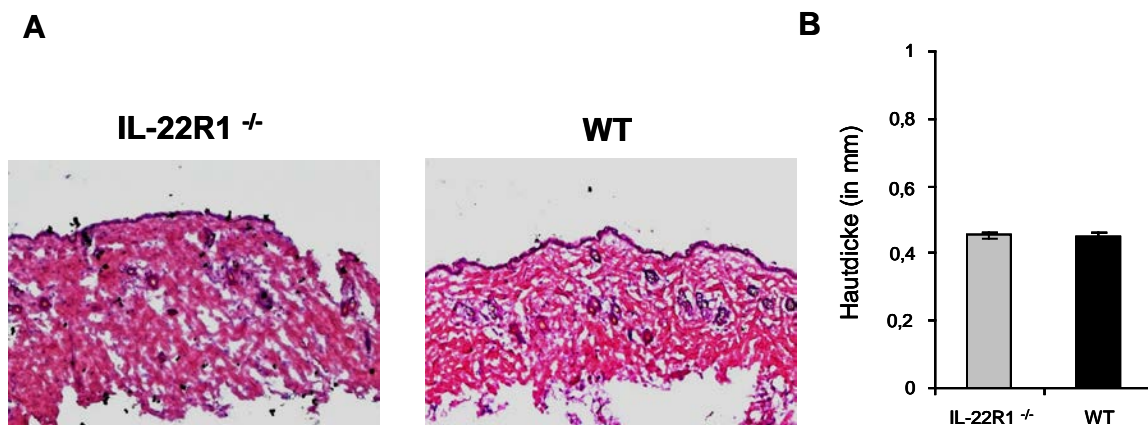
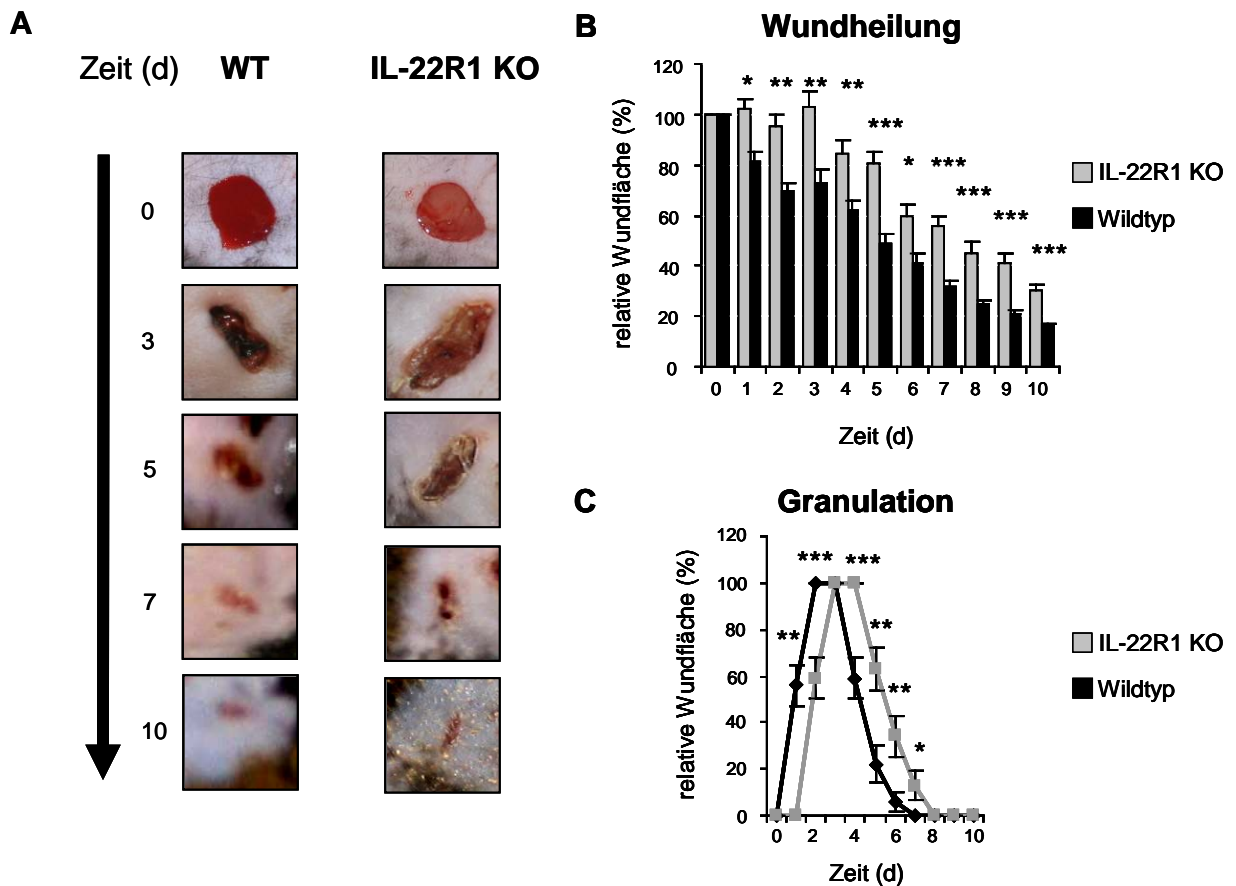


Abb.9: Hautphänotyp in IL-22R1^{-/-} KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. (A) Dargestellt sind repräsentative Bilder histologischer Schnitte von Hautbiopsien (dorsal) von 10 Wochen alten männlichen IL-22R1 defekten KO-Maus (IL-22R1^{-/-}, 129 SvJ) und dem korrespondierenden Wildtypstamm (129 SvJ). (B) Abgebildet ist der Mittelwert der Hautdicke der dorsalen Haut von 30 Wochen alten, männlichen IL-22R1 KO-Mäusen (IL-22R1^{-/-}, 129 SvJ) und dem korrespondierenden Wildtypstamm (129 SvJ). Pro Gruppe wurde die Hautdicke von 18-20 Tieren bestimmt.

Die Analyse der Wundflächen während des Heilungsprozesses ergab allerdings, dass die IL-22R1 defizienten Tiere eine signifikante Verzögerung des Wundschlusses im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen aufwiesen (Abb. 10). Während

der ersten drei Tage war keine deutliche Abnahme der Wundfläche bei den KO-Tieren zu erkennen. Der größte Flächenunterschied konnte am dritten Tag nach der Wundsetzung ermittelt werden. Die relative, durchschnittliche Wundfläche der IL-22R1 defizienten Tiere betrug 103 %. Die Wunden der Wildtyp-Mäuse hatten dahingehend eine durchschnittliche Fläche von 73 %. Die gestörte Wundheilung der KO-Tiere konnte über den gesamten Heilungszeitraum beobachtet werden. Die Unterschiede spiegeln sich auch bei der Bewertung der Wunden hinsichtlich der Granulations- und Epithelisierungsphase wieder. 55 % der Wunden der Wildtyp-Tiere befanden sich am dritten Tag nach der Wundsetzung schon in der Granulationsphase. Dagegen konnte bei den IL-22R1 defizienten Mäusen nur für 16 % der Wunden eine Granulation ermittelt werden. Am siebten Tag nach Wundsetzung befanden sich 61 % der Wildtyp-Wunden in der Reepithelisierungsphase, wogegen bei 22 % der KO-Wunden dieser Status festgestellt werden konnte (Abb.10).



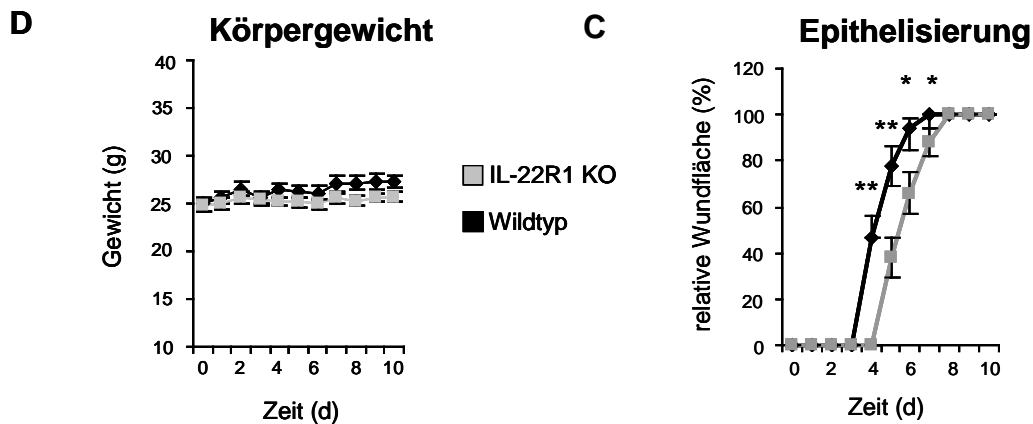


Abb.10: Kutane Wundheilung in IL-22R1 defizienten Mäusen. IL-22R1 defizienten Mäusen (IL-22R1^{-/-} / 129SvJ) und Wildtyp-Mäuse (129SvJ) wurden dorsal vier Wunden gestanzt. (A,B) Die Wunden wurden zu definierten Zeitpunkten digital fotografiert. Die Wundfläche aller Wunden von 8 Tieren pro Gruppe wurde mittels VEV wound management software bestimmt. Dargestellt ist die Wundfläche relativ zur Wundfläche unmittelbar nach Wundsetzung. (C) Makroskopische Beurteilung (verblindet) der Wunden nach Wundphasen über ein scoring system (+/-). Die relative Anzahl der Wunden der IL-22R1^{-/-}- und WT-Mäuse, die sich in der jeweiligen Phase befinden, werden gezeigt. (D) Körpergewicht von IL-22R1^{-/-}- und WT-Mäuse während des Wundschlusses. (B,C,D) Dargestellt sind die Ergebnisse von je 8 Tieren pro Gruppe (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau wurde mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Der Grad des Wundschlusses hängt im Wesentlichen von der Reepithelisierung des Wundbereiches ab. Aufgrund der auf makroskopischer Ebene gewonnenen Erkenntnisse wurde die Reepithelisierung von IL-22R1 defizienten Mäusen und den entsprechenden Wildtyp-Mäusen anhand histologischer Abbildungen der Wunden näher untersucht. Dafür wurde bei jeweils einer Wunde von 5 verschiedenen Mäusen pro Zeitpunkt die Ratio aus gesamter Wundbreite und der Länge der Wundränder berechnet (Abb.11). Drei Tage nach Wundsetzung war die Reepithelisierungsrate zwischen IL-22R1 defizienten- und Wildtyp-Mäusen signifikant unterschiedlich. Im Mittel waren bei den KO Tieren 48,9 % der Wundbreite epithelisiert. Dagegen wiesen die Wunden der Wildtyp-Tiere eine Reepithelisierungsrate von 73,9 % auf. Die Reepithelisierung am fünften Tag nach der Verwundung betrug 69,6 % bei den KO-Wunden und 79,9 % bei den Wildtyp-Proben. Am siebten Tag erhöhten sich die Werte auf 95,6 % bei den KO-Tieren und auf 107,8 % bei den Wildtyp-Tieren. Am Tag fünf und sieben nach Wundsetzung konnten zwar Unterschiede hinsichtlich der Reepithelisierung bei beiden Gruppen festgestellt werden, allerdings war die Differenz nicht signifikant und deutlich geringer als am dritten Tag nach

Wundsetzung. Darüber hinaus war bei den Schnitten der Wildtyp-Proben schon 3 Tage nach Wundsetzung die Bildung von Granulationsgewebe erkennbar. In den KO-Proben war Granulationsgewebe, zeitlich verzögert, am fünften Tag nach Wundsetzung nachweisbar. Die Ergebnisse dieser Wundheilungsergebnisse bestätigen die makroskopischen Beobachtungen und geben Hinweis darauf, dass IL-22R1-Rezeptorkomplexe essentiell für den Wundheilungsprozess sind. Speziell der IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex scheint für die Wirkung von IL-24 während der inflammatorischen Phase von entscheidender Bedeutung zu sein.

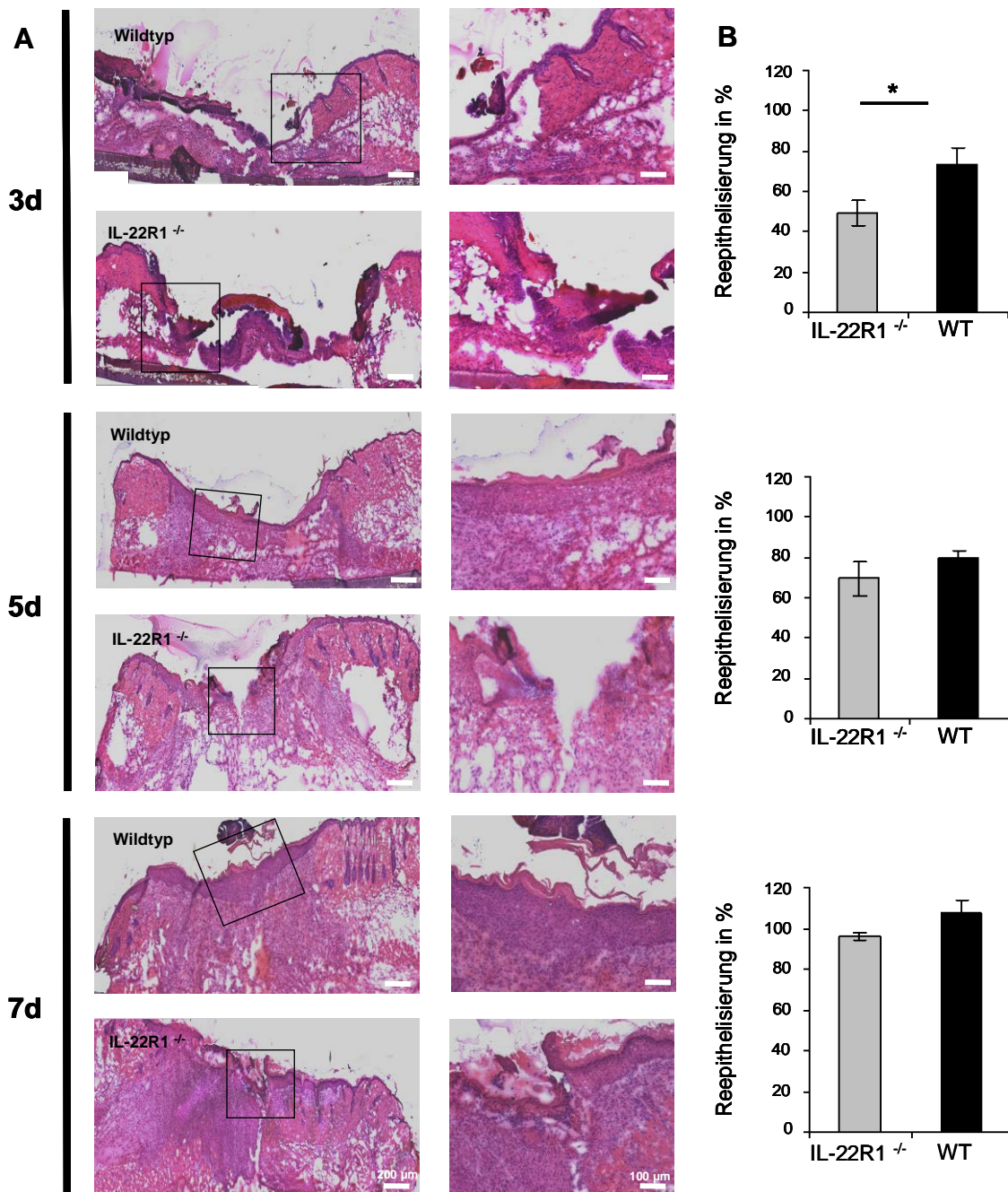
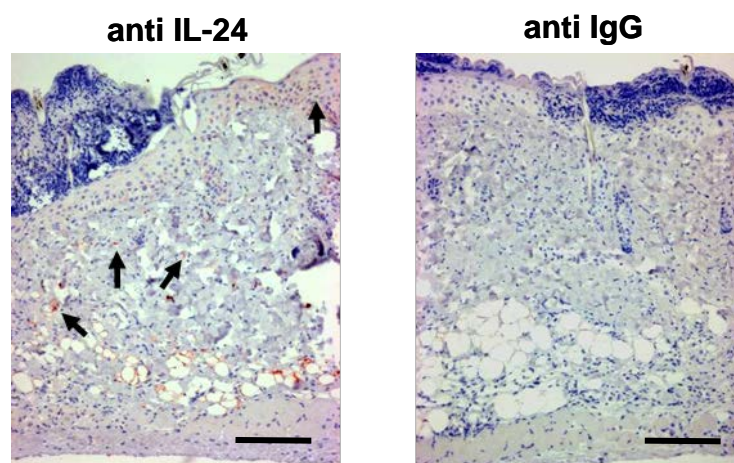


Abb.11: Re-epithelisierung in Wunden von IL-22R1 defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen. (A) Hämalaun- und Eosin- gefärbte Gefrierschnitte von Wunden 3, 5 und 7 Tage nach Wundsetzung. Pro Zeitpunkt ist jeweils eine Wunde einer KO-und WT-Maus in 50 facher bzw. 100 facher Vergrößerung dargestellt. (B) Die Re-epithelisierung in Wunden ist in Prozent als Ratio aus der Länge des Wundepithels zur Gesamtbreite der Wunde dargestellt. Für jeden Zeitpunkt wurde eine Wunde von 5 Mäusen pro IL-22R1^{-/-} -und WT Gruppe analysiert. Das Signifikanzniveau wurde mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt (*p<0,05).

4.4 IL-24 in kutaner Wundheilung

Die bisherigen Ergebnisse geben Hinweis darauf, dass IL-24 durch Bindung an den IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex eine wesentliche Rolle im Wundheilungsprozess besitzt. In den ersten Tagen der Wundheilung wird dieser Mediator auf mRNA Ebene hochreguliert und erreicht sein Expressionsmaximum am Tag 3 nach der Wundsetzung. Immunhistologische Untersuchungen hatten das Ziel, IL-24 auf Proteinebene im Wundbereich zu lokalisieren und dadurch Rückschlüsse auf mögliche Zielzellen und Quellen von IL-24 ziehen zu können. Für die immunhistologischen Studien wurden Paraffinschnitte aus Wundbiopsien von Mäusen (Wildtyp, 129 SvJ) am dritten Tag nach Wundsetzung verwendet. Die IL-24 positiven Zellen befanden sich im epidermalen Bereich nahe des Wundrandes (Abb.12). Einige IL-24 positive Zellen konnten auch im dermalen Bereich detektiert werden.



Wunde, 3 Tage nach Wundsetzung

Abb.12: Lokalisation von IL-24 im Wundbereich. Paraffinschnitte von Wundbiopsien (3d) aus Wildtyp-Mäusen (129 SvJ). Die schwarzen Pfeile markieren IL-24 positive Zellen. Als Negativkontrolle wurden die Schnitte mit Maus-anti-IgG Antikörper behandelt. Die Bilder entsprechen einer 100 fachen Vergrößerung und der Skalierungsbalken 100µm.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Keratinozyten mögliche Zielzellen und Quellen für IL-24 während der Heilung sein können. Ferner können Monozyten und T-Zellen mögliche IL-24 Produzenten sein [65, 79]. Die IL-24 Expression wurde zusätzlich mittels Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Über eine Doppelfärbung wurde ermittelt, ob T-Zellen (CD3-positive Zellen) als IL-24 Produzenten in Frage kommen. Für den Versuch wurden Paraffinschnitte aus Hautbiopsien (entspricht unverletzter Haut) sowie aus Wundbiopsien (Maus, Wildtyp 129SvJ) von Tag 3 und Tag 10 nach Verwundung untersucht. Die IL-24 gefärbten Schnitte der unverletzten Haut zeigten im Vergleich zu den Proben vom dritten Tag nach Verwundung deutlich weniger IL-24 positive Zellen (Abb. 13).

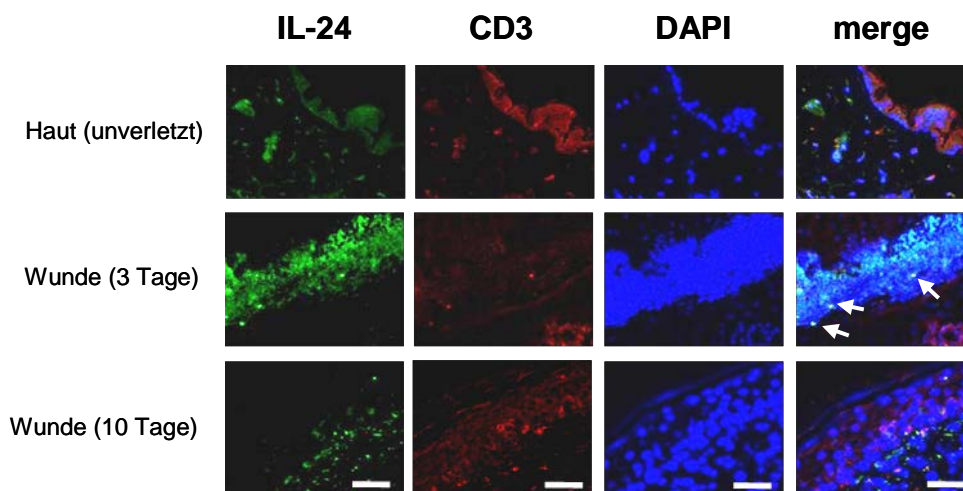


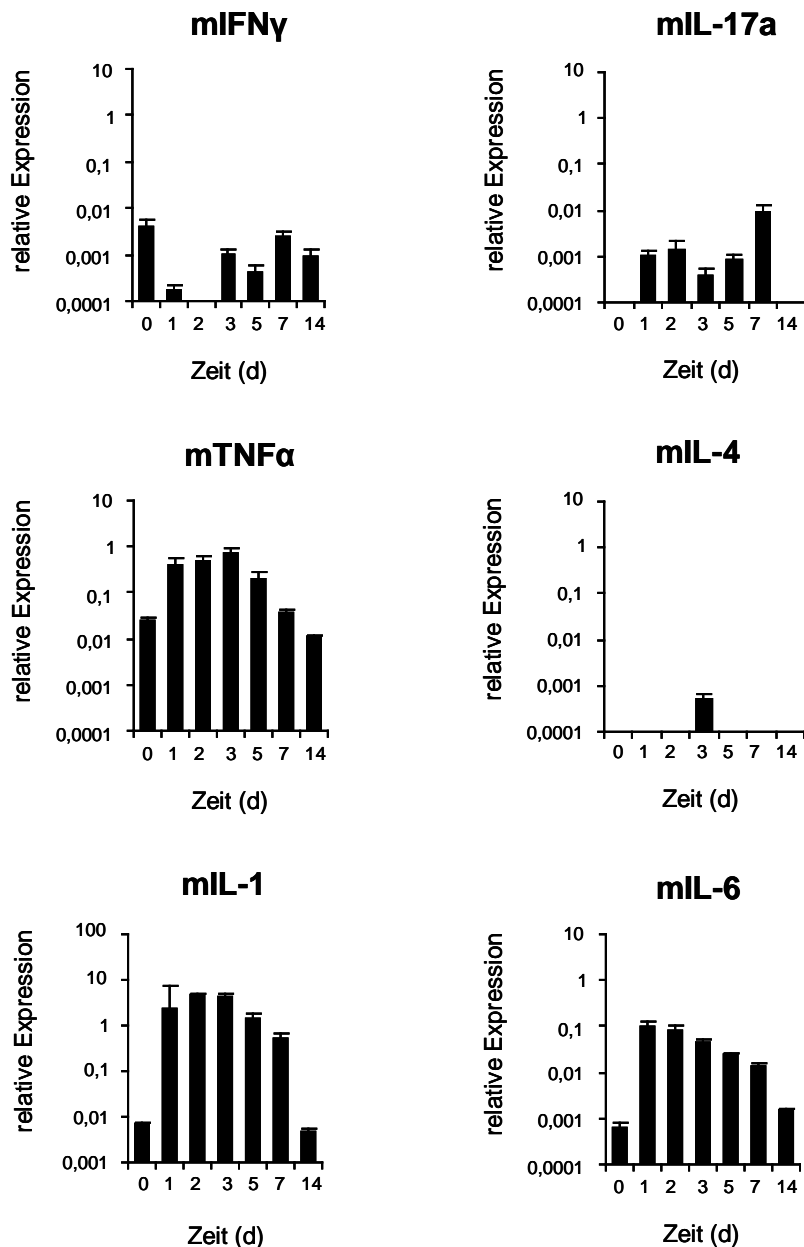
Abb.13: Produzenten von IL-24. Immunfluoreszenzfärbung von IL-24, CD3 und DAPI in Paraffinschnitten von unverletzter Haut, Wundbiopsien 3 Tage und 10 Tage nach Wundsetzung aus Wildtyp-Mäusen (129SvJ). Die Doppelfärbung zeigte IL-24- und CD3- positive Zellen auf, welche mit weißen Pfeilen markiert sind. Die Darstellung erfolgte in 400 facher Vergrößerung. Der Skalierungsbalken entspricht 12,5µm.

Die Fluoreszenzintensität ist für IL-24 am Tag 3 nach Wundsetzung am höchsten. Bei den Schnitten der Wundbiopsien vom zehnten Tag nach der Verwundung war die Anzahl IL-24 positiver Zellen deutlich reduziert. Die Doppelfärbung auf CD3 positive Zellen zeigte, dass T-Zellen Produzenten für IL-24 sein können.

Anhand der immunhistologischen Ergebnisse konnte die IL-24 Expression auf Proteinebene bestätigt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die IL-24 Expression verstärkt in der frühen Wundheilungsphase statt fand, und der Mediator in der Epidermis und Dermis des Wundareals lokalisiert war. Dabei konnten CD3-positive Zellen als potentielle Produzenten von IL-24 während der Wundheilung identifiziert werden.

4.5 Zytokinexpression in kutaner Wundheilung

Viele Studien belegen, dass im Rahmen der Geweberegeneration eine Vielzahl von Zytokinen wichtige zelluläre Vorgänge koordinieren [10-12]. Mit Hilfe von weiteren Expressionsanalysen wurde die IL-24 Expression mit der Expression anderer Mediatoren während des Wundheilungsverlaufes verglichen. Damit konnte eingeschätzt werden, welche Relevanz IL-24 während der Gewebereparatur verglichen zu weiteren Wundheilungsmediatoren besitzt. Nach der Messung von 8 Kandidatengenen war die höchste relative Expression in unverletzter Haut und während der Wundheilung bei TGF β erkennbar. Die inflammatorischen Zytokine IL-1, TNF α und IL-6 wurden in unverletzter Haut deutlich geringer exprimiert als TGF β .



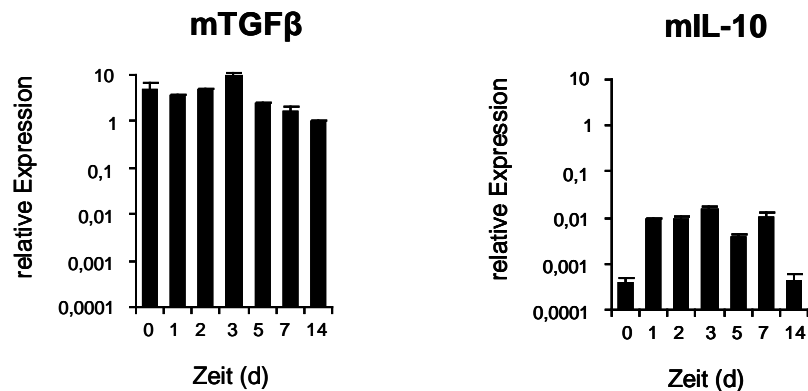


Abb.14: Zytokinprofil in kutaner Wundheilung. Die Genexpression von ausgewählten Zytokinen wurde in Wundbiopsien von Wildtyp-Mäusen (129 SvJ) zu definierten Zeitpunkten post Wundsetzung gemessen. Der Zeitpunkt „0“ steht für unverletzte Haut. Die Genexpression wurde mittels qPCR durch Normalisierung auf das Haushaltsgens HPRT bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 5-8 Proben (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes).

Mit Wundsetzung konnte bei allen Mediatoren eine Hochregulation in der frühen, inflammatorischen Phase beobachtet werden. Bei IL-6 war das Expressionsmaximum am Tag 1 nach Wundsetzung nachweisbar. Anschließend reduzierte sich die Zytokin-Expression und erreichte am Tag 14 nach Wundsetzung etwa das Expressionsniveau von unverletzter Haut. Die maximale Expression von IL-1 und $\text{TNF}\alpha$ war am zweiten und dritten Tag nach Wundsetzung zu beobachten. Unter den T-Zell Zytokinen $\text{IFN}\gamma$, IL-17A und IL-4 war $\text{IFN}\gamma$ in unverletzter Haut sowie ab dem dritten Tag nach Wundsetzung mit einem Expressionsmaximum am Tag 7 nach Wundsetzung deutlich exprimiert. IL-17A war ebenfalls am siebten Tag nach Wundsetzung am stärksten hochreguliert. Die gemessene relative Expression von IL-17A am Tag 7 war verglichen zu $\text{IFN}\gamma$ viermal höher. IL-4 konnte nur am dritten Tag nach der Verwundung nachgewiesen werden. Diese Daten lassen darauf schließen, dass Th-17 Zellen verstärkt in der proliferativen Phase der Wundheilung aktiv waren. Das Th-2 Zell Zytokin IL-4 wurde nur am dritten Tag nach Verwundung detektiert. Th-2 Zellen schienen bei der Gewebereparatur eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (Abb. 14).

Vergleicht man die Expressionskinetik aller gemessenen Zytokine in Relation zu dem jeweiligen Expressionsmaximum, so fällt auf, dass IL-1 und $\text{TNF}\alpha$ einen sehr ähnlichen Verlauf der Expression im Vergleich zu IL-24 besitzen. Beim Vergleich der Expression der Zytokine in normaler Haut und während der ersten drei Tage nach

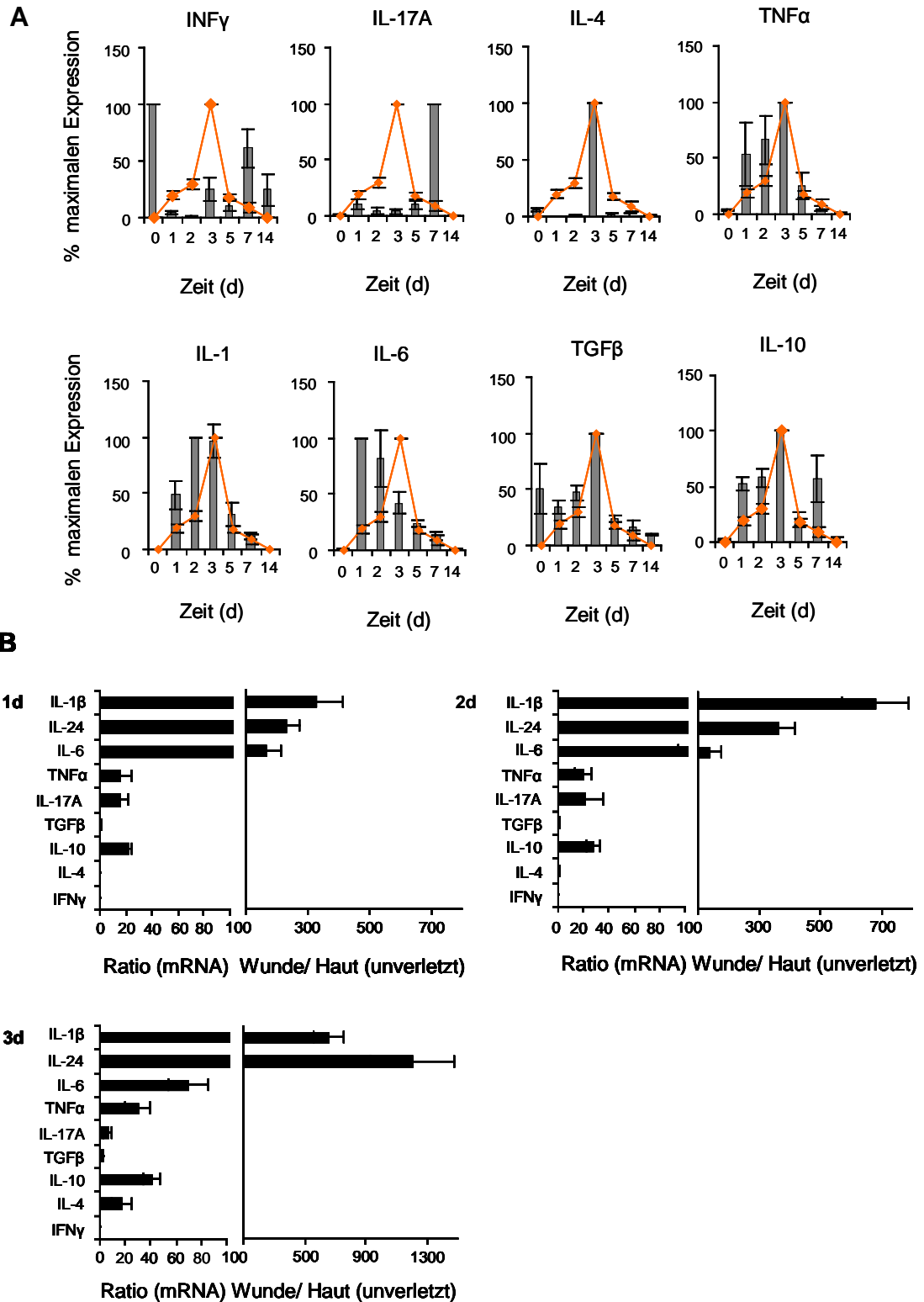


Abb.15: Regulation von IL-24 und weiteren Mediatoren. (A) Relative Expressionskinetik ausgewählter Wundheilungszytokine in Bezug zur eigenen maximalen Expression während der Wundheilung. Jede Kinetik ist mit dem Expressionsprofil von IL-24 (orangefarbener Graph) dargestellt. (B) Regulation ausgewählter Zytokiner während der ersten drei Tage nach Wundsetzung. Dargestellt ist die Ratio der Genexpression in unverletzter Haut und zu dem jeweiligen Zeitpunkt nach Wundsetzung. Abgebildet sind die Ergebnisse von 5-8 Proben (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes).

Verwundung, war IL-1 während der ersten zwei Tage noch vor IL-24 das am stärksten hochregulierte Zytokin. Am Tag 2 nach Wundsetzung war die IL-1 Expression 700 fach höher als in unverletzter Haut. Am dritten Tag nach Wundsetzung war IL-24 das am stärksten induzierte Zytokin mit einer fast 1200 fachen Erhöhung der Expression relativ zur normalen Haut (Abb. 15). Diese Daten deuten darauf hin, dass IL-24 ein essentielles Zytokin für die kutane Wundheilung ist.

4.6 Die Rolle von IL-24 und IL-22R1/IL-20R2 in kutaner Wundheilung

Für die Klärung der Wundheilungsstörung in IL-22R1 defizienten Mäusen sollten physiologische Unterschiede im Heilungsprozess zwischen den rezeptordefizienten Tieren und den Kontrollmäusen untersucht werden.

Zunächst wurde die Genexpression der für die IL-22R1 Untereinheit relevanten IL-10 Zytokine analysiert. Nach Analyse der Genexpression der an die IL-22R1 Rezeptoruntereinheit bindenden Interleukine IL-20, IL-22 und IL-24 war kein signifikanter Unterschied in der Expressionskinetik festzustellen. Allerdings konnten, im Unterschied zu den Kontrollmäusen, in Wunden von IL-22R1 defizienten Mäusen eine Expression von IL-22 nachgewiesen werden (Abb. 16).

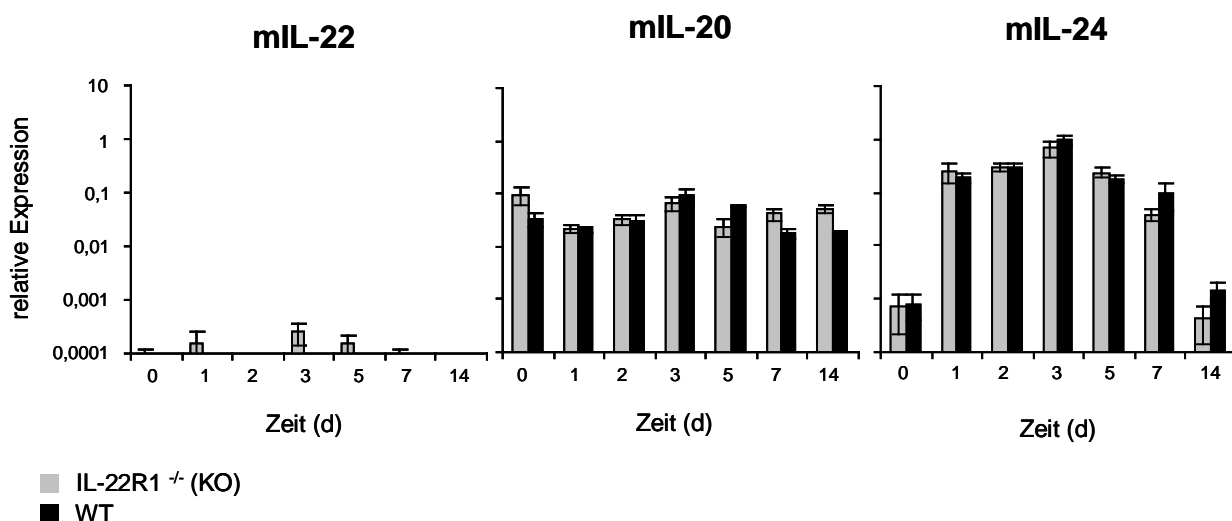


Abb.16: Expression von IL-20, IL-22 und IL-24 in IL-22R1 defizienten Mäusen während der Wundheilung. Die Genexpression von IL-10 Zytokinen wurde in Wundbiopsien von IL-22R1 defizienten Mäusen (IL-22R1^{-/-}, 129 SvJ) und Wildtyp-Mäusen (129 SvJ) zu definierten Zeitpunkten post Wundsetzung gemessen. Der Zeitpunkt „0“ steht für unverletzte Haut. Die Genexpression wurde mittels qPCR und relativ zur Expression des Haushaltgens HPRT bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 5-8 Proben (Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes).

Bisherige Studien hinsichtlich der biologischen Funktion der IL-10 Zytokine in der Haut zeigten, dass diese Mediatoren die Mobilität der Keratinozyten, deren Differenzierung sowie antimikrobielle Abwehrmechanismen beeinflussen können [66, 67, 71]. Die Zellmobilität ist zum Beispiel von der proteolytischen Aktivität der Matrixmetalloproteinasen (MMP) abhängig. In der kutanen Wundheilung besitzen diese Enzyme eine wichtige Rolle. Sie ermöglichen zum Beispiel die Aktivierung von Wachstumsfaktoren, den Abbau extrazellulärer Proteine für die ungehinderte Migration von Endothelzellen sowie die für die Epithelisierung notwendige Migration von Keratinozyten.

4.6.1 Aktivität von Matrixmetalloproteasen

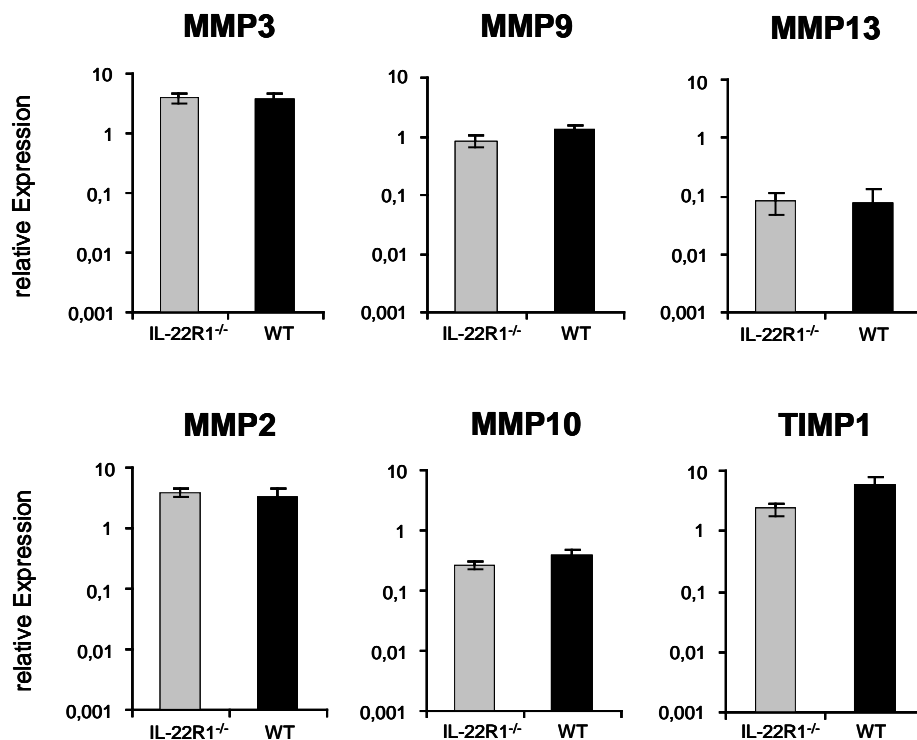
Auf mRNA Ebene wurde neben MMP9 und MMP2, MMP10, MMP13 und ein MMP Inhibitor (TIMP1) in Proben von Wildtyp- und IL22R1 defizienten Mäusen untersucht. Es konnten keine signifikante Unterschiede hinsichtlich der Genexpression festgestellt werden.

Eine geeignete Methode für den Nachweis von MMP9 und MMP2 stellt die auf Gelatine basierte Zymographie dar. Mit dieser Methode kann die aktive und passive Form des proteolytischen Enzyms quantifiziert werden. Dafür wurden Wundbiopsien von KO und Wildtyp-Mäusen vom dritten Tag nach der Verwundung lysiert, die vorhandenen Proteine quantifiziert und anschließend mit Gelatine-Sepharose aufgereinigt. Dadurch konnten die im Proteingemisch vorhandenen MMPs extrahiert werden. Die gewonnenen MMP Proteine wurden nun in einem SDS-Gel mit Gelatine elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die MMPs mit speziellen Puffersystemen renaturiert und aktiviert. An der jeweiligen Position des Enzyms fand ein proteolytischer Verdau von Gelatine statt, was nach Färbung des Gels zu deutlich sichtbaren, farblosen Banden führte.

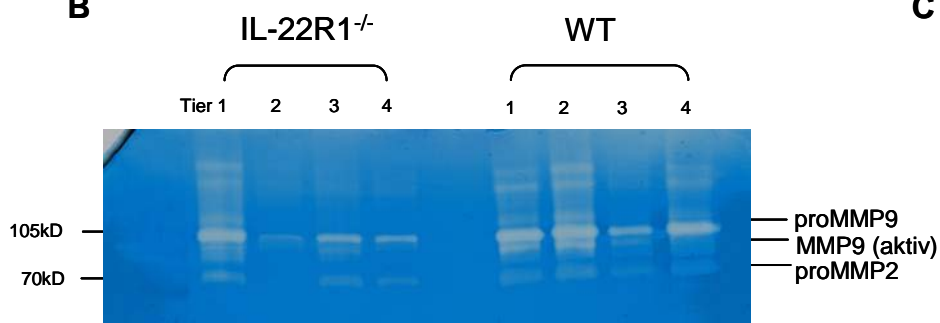
Nach zymographischer Elektrophorese und anschließender densitometrischer Analyse der Banden kann zusammengefasst werden, dass die Proben der Wildtyp-Mäuse eine durchschnittlich höhere Konzentration an MMP9 in passiver wie aktiver Form besaßen. Die Banden für die passive Enzymvariante konnte anhand des Markers bei 105 kDa detektiert werden, die aktive Form bei 95 kDa. MMP2 konnte nur in passiver Form bei allen Proben nachgewiesen werden (Bande bei 70 kDa), wobei die Wildtyp-Proben eine höhere Konzentration aufwiesen (Abb. 17). Nach

Auswertung der MMP9 Banden, könnte die Aktivität dieser Matrixmetalloprotease über die IL-22R1 Rezeptorkomplexe und IL-24 reguliert werden. Diese Hypothese wurde mit Hilfe von *in vitro* Experimenten falsifiziert. Anhand von Stimulationsversuchen mit humanen, dreidimensionalen Keratinozytenkulturen sollte anhand der MMP9- Expression untersucht werden, ob IL-24 ein möglicher Induktor für MMP9 während der kutanen Wundheilung sein kann. Zur Kontrolle wurden die Kulturen mit Medium stimuliert. In 5 unabhängigen Versuchen zeigte sich, kein signifikanter Unterschied (Abb. 17). IL-24 schien somit kein direkter Induktor für MMP9 zu sein.

A



B



C

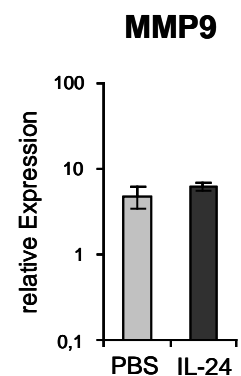


Abb.17: Expression von Matrixmetalloproteinasen in IL-22R1 defizienten- und Wildtyp-Mäusen während der inflammatorischen Wundheilungsphase. (A) Die Genexpression von verschiedenen MMPs und einem Proteaseinhibitor (TIMP1) wurde 3 Tage nach Wundsetzung von IL-22R1 defizienten Mäusen (IL-22R1^{-/-}, 129 SvJ) und Wildtyp-Mäusen (129 SvJ) analysiert. Die Genexpression wurde mittels qPCR und relativ zur Expression des Haushaltgens HPRT bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 5-6 Proben (Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes). (B) Zymographische Analyse von Gelatinasen (MMP9, MMP2) in Wundbiopsien vom dritten Tag nach Wundsetzung. Das Gelfoto zeigt ein Bandenmuster, mit dem die aktive und passive Form von MMP9 und die passive Form von MMP2 nachgewiesen werden konnte. (C) Dreidimensionale, humane Keratinozytenkulturen wurden in 5 unabhängigen Versuchen mit IL-24 oder PBS als Kontrolle stimuliert. Die Genexpression von MMP9 wurde relativ zum Haushaltsgen HPRT gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert der Genexpression von 5 Versuchen.

4.6.2 Differenzierung der Keratinozyten

Aufgrund des hemmenden Einflusses von IL-10 Zytokinen auf die Differenzierung von Keratinozyten wurden damit assoziierte Gene analysiert. Die dafür verwendeten Proben waren drei Tage nach Verwundung gewonnene Wundbiopsien von IL-22R1 defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Bei den untersuchten Kandidatengenen handelte es sich um Kallikrein-7 (KLK7), Keratin-1 (K1) und Desmocollin-1 (DSC1). Bei allen Kandidatengenen war die Expression in den Wunden der KO-Tiere minimal, nicht signifikant erhöht (Abb. 18).

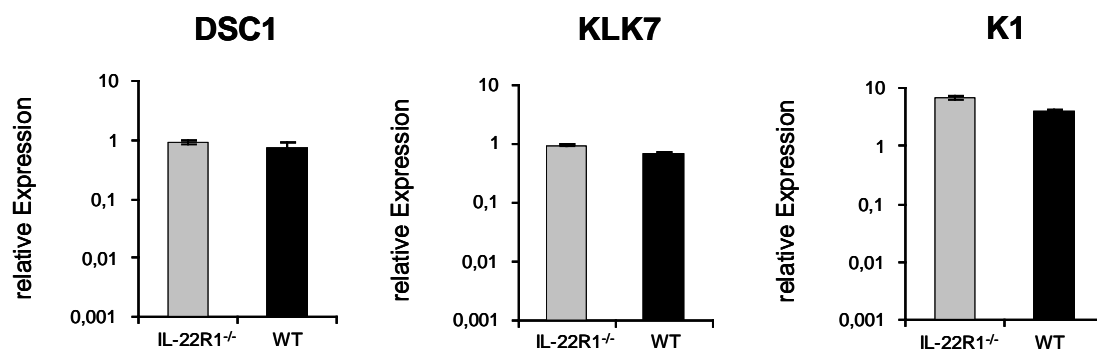


Abb.18: Expression von Keratinozytendifferenzierung assoziierter Gene in IL-22R1 defizienten- und Wildtyp- Mäusen während der inflammatorischen Wundheilungsphase. Die Genexpression von Desmocollin 1 (DSC), Kallikrein-7 (KLK7) und Keratin 1 (K1) wurde in drei Tage alten Wunden von IL-22R1 defizienten Mäusen (IL-22R1^{-/-}, 129 SvJ) und Wildtyp-Mäusen (129 SvJ) analysiert. Die Genexpression wurde mittels qPCR und relativ zur Expression des Haushaltsgens HPRT bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 5-6 Proben (Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes).

4.6.3 Antimikrobielle Abwehr

Verschiedene Studien zeigten, dass einige IL-10 Mitglieder die antimikrobielle Antwort in Keratinozyten induzieren können [66, 71]. Für den Vergleich zwischen den IL-22R1 Tieren und den dazugehörigen Wildtyp-Tieren wurden die identischen Proben verwendet, wie in 4.6.2 beschrieben. Die analysierten Kandidatengene waren S100A9, Lipocalin-2 (LCN2) und beta Defensin-3 (BD3). Das für das S100A9 Protein assoziierte Gen war in den Wildtyp-Proben fast doppelt so hoch exprimiert wie in den IL-22R1 defizienten Wunden. Dagegen konnte man eine fast doppelt so hohe Expression von BD3 und LCN2 in den KO Wunden verglichen zu den Wildtyp-Wunden beobachten. Alle ermittelten Unterschiede waren allerdings nach statistischer Analyse nicht signifikant (Abb. 19).

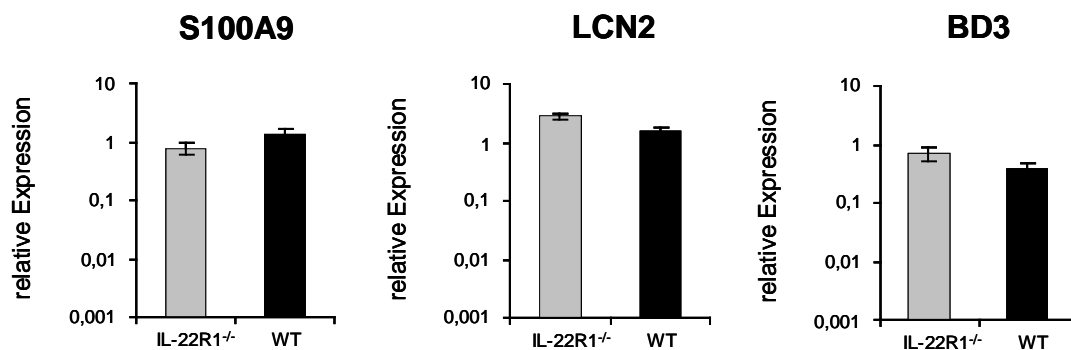


Abb.19: Expression von antimikrobielle Proteine kodierende Gene in IL-22R1 defizienten- und Wildtyp-Mäusen während der inflammatorischen Wundheilungsphase. Die Genexpression von Protein S100-A9 (S100A9), Lipocalin-2 (LCN2) und beta Defensin-3 (BD3) wurde in drei Tage alten Wunden von IL-22R1 defizienten Mäusen (IL-22R1^{-/-}, 129 SvJ) und Wildtyp-Mäusen (129 SvJ) analysiert. Die Genexpression wurde mittels qPCR und relativ zur Expression des Haushaltgens HPRT bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 5-6 Proben (Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes).

4.6.4 Genomweite Expressionsanalyse

Um Hinweise hinsichtlich der physiologischen Ursachen für die Wundheilungsverzögerung während der frühen Wundheilungsphase bei IL-22R1 defizienten Mäusen zu erhalten, wurde die Genexpression in Wunden von IL-22R1 defizienten Mäusen und den Wildtyp Mäusen untersucht. Dafür wurden von zwei Mäusen pro Mausstamm jeweils eine Wunde am Tag 2 nach Wundsetzung entnommen und RNA isoliert. Somit wurden für die genomweite Genexpressionsanalyse mittels Microarray zweimal ein Paar, bestehend aus der IL-22R1^{-/-}-Probe und Wildtyp-Probe, analysiert. Für die Messung der Proben wurde das

KFB - Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik in Regensburg, unter der Leitung von Dr. Christoph Moehle, beauftragt. Mit Hilfe des Mouse Genome 430 2.0 Arrays der Firma Affymetrix konnte die Expression von 34000 annotierten Genen der Maus ermittelt werden. Insgesamt konnten 42 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene mit gleicher Tendenz in den Duplikaten detektiert werden. Bezogen auf die Gesamtheit der gemessenen Gene entspricht das einem Anteil von 0,12 %. Dabei stellte sich heraus, dass von den 42 Genen 2 Gene in den den Wildtyp-Proben stärker reguliert waren als bei den KO-Proben. Dabei handelt es sich um SerpinA1b und SerpinA1a, die zwei Isoformen des Serin-Peptidase Inhibitors der Klasse A1 kodieren (Abb.). Serpina1b ist in den Wildtyp-Wunden ca. 12-19-fach höher reguliert als in den KO-Wunden. Die Expression von Serpina1a war in den Wildtyp-Proben etwa doppelt so hoch wie in den KO-Proben. Von reduziert exprimierten Genen der Wildtyp-Proben konnten 12 Gene dem epidermalen Fettstoffwechsel zugeordnet werden, und 9 Gene sind mit dem Glukosemetabolismus assoziiert. Weitere Gene konnten dem Immunsystem, Signaltransduktion, zu extrazellulären Matrixproteinen und apoptotischen Prozessen zugeordnet werden (Abb. 20). Mittels qPCR wurden anschließend mehrere Wundbiopsien (n=5-8) von IL-22 R1^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen hinsichtlich der Expression von ausgewählten Genen (z.B. Retn, Mogat1, Gpd1) untersucht, die nach Microarray-Analyse unterschiedlich reguliert waren. Die Validation der Microarray-Daten führte zu dem Ergebnis, dass bis auf SerpinA1 keine der auserwählten Kandidatengene signifikant unterschiedlich in KO- und Wildtyp-Wundbiopsien exprimiert wurden. Einzig bei der Messung von Serpina1b zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Die Serpina1b Expression in Wunden IL-22R1 defizienter Mäuse war 2 sowie 3 Tage nach Wundsetzung war dreifach bzw. sechsfach niedriger exprimiert als in den Wunden der Wildtyp-Mäuse (Abb. 21). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression des Serin-Peptidase Inhibitors A1 während des Wundschlusses über Rezeptorkomplexe mit der IL-22R1 Rezeptoruntereinheit reguliert werden kann.

UniGene	Gen-Symbol	Name	Ratio relative Expression	
			WT/KO Paar 1	WT/KO Paar 2
Mm.278475	Serpina1b	Serin-Peptidase Inhibitor A 1b	18,78	11,63
Mm.439692	Serpina1a	Serin-Peptidase Inhibitor A 1a	2,08	3,24
Mm.266867	Pck1	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase	-7,44	-4,66
Mm.34819	Itih4	Inter alpha-trypsin Inhibitor, schwere Kette 4	-3,51	-9,35
Mm.278475	Adrb3	Adrenerger Rezeptor, beta 3	-7,55	-3,95
Mm.275975	Gys2	Glykogen Synthase 2	-9,84	-2,91
Mm.1181	Retn	Resistin	-8,95	-2,79
Mm.200941	Saa2	Serum Amyloid A2	-4,17	-4,15
Mm.291280	Slc36a2	Solute carrier Familie 36	-4,65	-3,49
Mm.15295	Ephx2	Epoxide Hydrolase 2	-5,55	-2,8
Mm.252391	Gpd1	Glyzerol-3-phosphat-dehydrogenase	-4,82	-3,19
Mm.41325	Mogat1	Monoacylglycerol O-acyltransferase 1	-4,87	-2,63
Mm.236443	Fasn	Fettsäuresynthase	-3,76	-3,19
Mm.3841	Cox8b	Cytochrom C oxidase, Untereinheit 8b	-4,92	-2,41
Mm.151485	Paqr9	Progesteron- und adiponectin Rezeptor Familienmitglied 9	-3,7	-3,06
Mm.10026	Cidec	Zelltod induzierender DFFA Effektor c	-3,32	-3,30
Mm.4407	Cfd	Komplementfaktor C	-3,32	-3,00

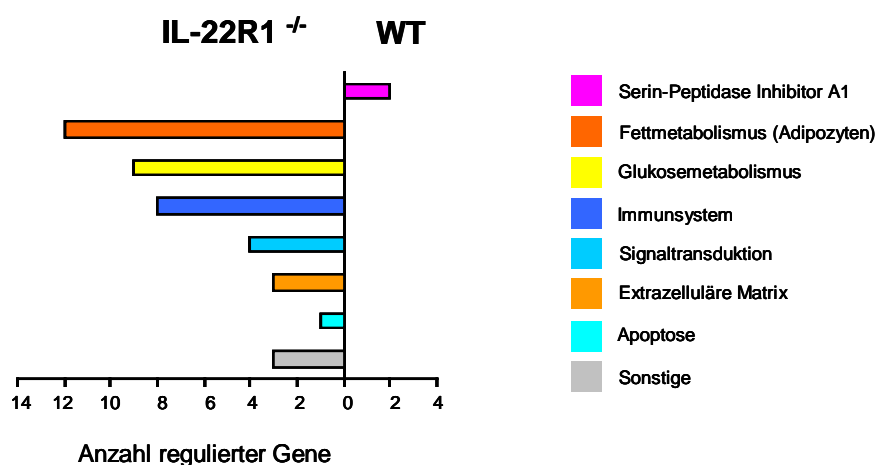


Abb.20: Genomweite Genexpressionsanalyse in Wunden IL-22R1 defizienter- und Wildtyp-Mäusen. (A) Die Genexpression von zwei Tage alten Wunden einer IL-22R1 defizienten Maus sowie einer Wildtyp-Maus (129 SvJ) (jeweils n=2) wurden analysiert. Es sind 17 Gene dargestellt, die in beiden Vergleichspaaren signifikant unterschiedlich exprimiert worden sind. Die jeweilige Expressionsratio eines Vergleichspaares ist abgebildet. (B) Gruppierung der insgesamt 42 unterschiedlich exprimierten Gene in die biologische Funktion der kodierten Proteine.

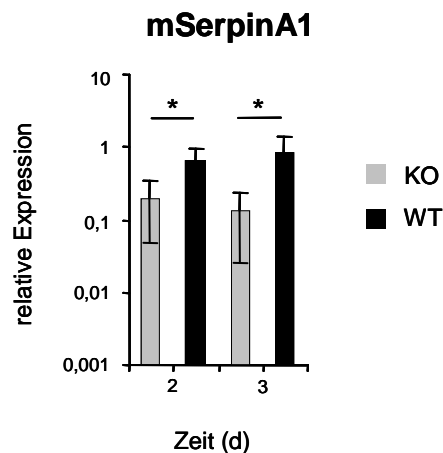


Abb.21: Expression von Serin Peptidase Inhibitor A1 in IL-22R1 defizienten-und Wildtyp-Mäusen während der Wundheilung. Die Genexpression von SerpinA1 wurde in Wundbiopsien von IL-22R1 defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen (129 SvJ) vom zweiten und dritten Tag nach Wundsetzung bestimmt. Die Genexpression wurde mittels qPCR und relativ zur Expression des Haushaltsgens HPRT bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 6 Proben (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau wurde mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

4.7 Serin-Peptidase Inhibitor A1 (Serpina1)

4.7.1 Regulation von SerpinA1

Mit Hilfe von *in vitro* Studien sollte zunächst festgestellt werden, inwiefern die Expression des Serin-Peptidase Inhibitor A1 durch das Interleukin-24 in Keratinozyten induziert werden kann. Dazu wurden in drei unabhängigen Experimenten humane, dreidimensionale Keratinozytenkulturen mit IL-24, oder PBS als Kontrolle, für 72h stimuliert. Nach Auswertung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationsexperimenten war bei jedem Versuch die SerpinA1 Expression in den IL-24 stimulierten Proben höher als in den mit Medium behandelten Proben. Im Mittel konnte eine um das sechsfach gesteigerte Expression beobachtet werden (Abb. 22).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man annehmen, dass IL-24 ein wichtiger Induktor von SerpinA1 während der Geweberegeneration ist.

Mitglieder der Serin-Peptidase Inhibitoren sind Akute Phase Proteine. Mit Messung der Konzentration von SerpinA1, auch bekannt als alpha-1-Antitrypsin, in Plasma von IL-22R1 defizienten –und Wildtyp-Mäusen wurde untersucht, ob es auch Unterschiede in der systemischen Regulation von SerpinA1 gibt. Dazu wurde die SerpinA1 Konzentration in Plasma von unverletzten KO- und Wildtyp-Mäusen sowie von Mäusen 3 Tage nach Wundsetzung untersucht. Im unverletzten Zustand zeigten die KO Proben eine durchschnittliche Konzentration von 11,94 mg/ml, die Konzentration von SerpinA1 in Wildtyp-Mäusen betrug dagegen durchschnittlich 10,02 mg/ml. Drei Tage nach Wundsetzung an der Rückenhaut blieb das Konzentrationsniveau bei den KO-Tieren mit 11,73 mg/ml etwa identisch. Die Konzentration in den Wildtyp-Proben erhöhte sich mit durchschnittlich 13,66 mg/ml im Vergleich zum SerpinA1 Gehalt in den unverletzten Tieren und lag dabei etwas über dem Niveau der KO-Tiere. Die analysierten Unterschiede waren nicht signifikant. Anhand der SerpinA1 Bestimmung im Plasma war erkennbar, dass im Verlauf der Wundheilung SerpinA1 auch systemisch induziert wurde. Die Rezeptoruntereinheit IL-22R1 scheint daran beteiligt zu sein, da die Konzentration in IL-22R1 defizienten Tieren nahezu unverändert blieb (Abb. 22). Aufgrund der deutlich reduzierten Genexpression von SerpinA1 in Wunden von IL-22R1 defizienten Mäusen verglichen zu Wildtyp-Mäusen scheint dieser Peptidase Inhibitor hauptsächlich während der Wundheilung lokal im Wundbereich, anstatt systemisch, reguliert zu werden.

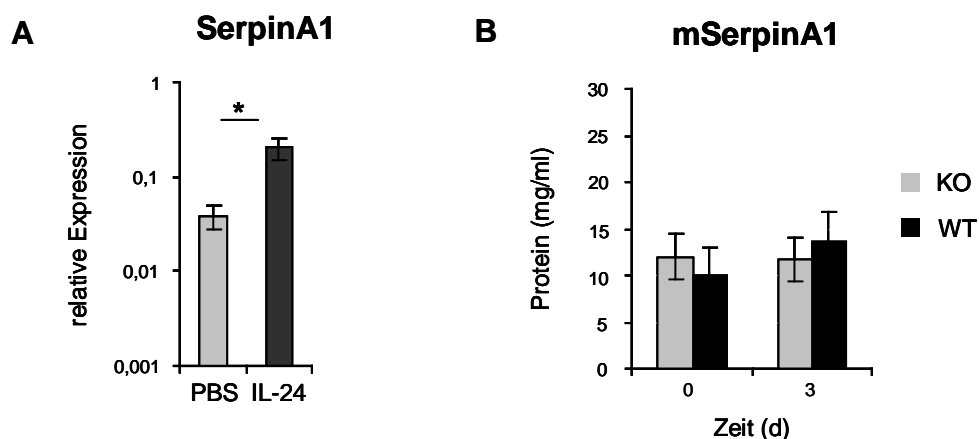


Abb.22: IL-24 induzierte Expression von SerpinA1. (A) Ein humanes, dreidimensionales Keratinozytenmodell wurde für 72h mit IL-24 und PBS (Kontrollversuch) stimuliert. Die Genexpressionsanalyse fand mittels qPCR statt. Als Referenzgen wurde HPRT verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse von 6 Versuchen (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

(B) Konzentrationsbestimmung von SerpinA1 (α 1-Antitrypsin) in Plasmaproben von unverwundeten IL-22R1 defizienten –und Wildtyp-Mäusen sowie drei Tage nach Wundsetzung. Es sind die Proteinkonzentrationen von jeweils 7-8 Proben pro Zeitpunkt abgebildet (Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes).

4.7.2 Topische Applikation von SerpinA1

Die bisherigen Daten geben noch keinen Hinweis, ob SerpinA1 im Rahmen der kutanen Wundheilung funktional ist. Steht die bei den IL-22R1 defizienten Tieren beobachtete Wundheilungsverzögerung in Zusammenhang mit der Regulation von SerpinA1? Aufgrund dieser Fragestellung wurden erneut *in vivo* Wundheilungsstudien durchgeführt bei denen eine SerpinA1-PBS Lösung topisch auf Wunden von IL-22R1 defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen appliziert wurde. Die Kontrollgruppen wurden jeweils nur mit PBS behandelt. IL-22R1 defizienten Mäusen sowie den entsprechenden Wildtyp-Mäusen (8 Mäuse pro Gruppe) wurden, wie zuvor beschrieben, auf der Rückenhaut Wunden gesetzt. Zwei Tage nach Wundsetzung, der Zeitpunkt mit eindeutiger Wundheilungsverzögerung, wurde den Tieren die jeweilige Lösung mit Hilfe von fixierten Kompressen für 24 h appliziert. Anschließend erfolgte täglich die digitale Dokumentation und Auswertung der Wunden bis zum siebten Tag nach Wundsetzung. Bei den mit PBS behandelten Mäusen zeigte sich eine wie zuvor (Abb.) beobachtete Verzögerung der Wundheilung. Drei Tage nach Wundsetzung betrug die relative Wundfläche bei den Wildtyp-Tieren 66,94 %. Die relative Wundfläche bei den IL-22R1 defizienten Mäusen betrug dagegen 86,87 %. Selbst bei zunehmender Abnahme der Wundfläche im Heilungsverlauf war stets ein signifikanter Unterschied in der Wundfläche beider Gruppen erkennbar.

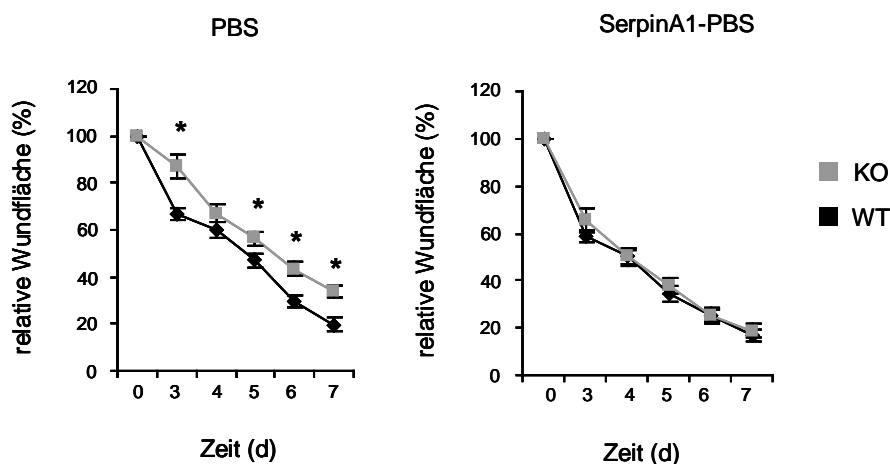


Abb.23: Topische Applikation von SerpinA1 auf Wunden IL-22R1 defizienter-und Wildtyp-hMäuse. Am zweiten Tag nach Wundsetzung wurde den Tieren für 24h eine SerpinA1-PBS-Lösung, oder nur PBS (Kontrolle) appliziert. Dargestellt ist die Wundfläche relativ zur Wundfläche unmittelbar nach Wundsetzung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (\pm Standardfehler des Mittelwertes) aus zwei unabhängig durchgeführten Versuchen dargestellt. Pro Gruppe (Applikation/Genotyp) wurden 8 Tiere verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

Dieser Unterschied konnte bei den mit SerpinA1-PBS Lösung behandelten Mäusen nicht festgestellt werden. Am vierten Tag nach Wundsetzung war die relative Wundfläche von 49,94 % bei den KO-Tieren und 50,04 % bei den Wildtyp-Tieren nahezu identisch. An den folgenden Zeitpunkten war die relative Wundfläche der Wildtyp-Wunden zu 0,5-3 % geringer als bei den KO-Wunden. Nach topischer Applikation von SerpinA1 war somit keine verzögerte Wundheilung bei den IL-22R1 defizienten Mäusen zu beobachten (Abb. 23). Der Serin Peptidase Inhibitor A1 war während der frühen Wundheilungsreaktion funktional. Daraus lässt sich ableiten, dass Rezeptorkomplexe der IL-22R1 Untereinheit während der Wundheilung in der Regulation von SerpinA1 involviert sind.

5. Diskussion

5.1 Die Expression von IL-10 Zytokinen in kutaner Wundheilung

Das Ziel dieser Promotionsarbeit war die Rolle von IL-10 Zytokinen in der kutanen Wundheilung zu identifizieren. Der kutane Wundheilungsprozess ist ein komplexer, dynamischer Vorgang, bei dem eine Vielzahl an Mediatoren und Zelltypen die Regeneration der Haut koordinieren. Aufgrund der Komplexität des Heilungsprozesses war es notwendig Wundheilungsstudien an dem *in vivo* Modell der Maus durchzuführen. Gerade für die Aufklärung der Funktionen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in der Wundheilung haben sich transgene Mausmodelle bewährt [104]. Trotz weniger Unterschiede hinsichtlich des Aufbaus der Mauhaut zur Haut des Menschen (Hautdicke, Hautmuskel Panniculus Carnosus) ist die Physiologie der murinen Wundheilung der humanen Gewebereparatur nahezu identisch, und Mäuse sind daher ein geeignetes Modellsystem zur Aufklärung neuer Zytokin vermittelter Prozesse in kutaner Wundheilung [105].

Die Expression von IL-26 wurde in dieser Arbeit nicht verfolgt, da bisher kein murines Homolog für diesen Mediator bekannt ist. Für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung von IL-19, IL-20, IL-22 und IL-24 in der kutanen Wundheilung, wurden in dieser Arbeit zwei knock-out Mausstämme (IL-22R1^{-/-} 129 SvJ; IL-20R1^{-/-} C57/B6) mit einer Defizienz in der IL-22R1- und IL-20R1-Rezeptoruntereinheit sowie die Wildtypstämme mit identischen, genotypischen Hintergrund (129 SvJ, C57/B6) als Modell verwendet.

Um eine Relevanz der ausgewählten IL-10-Zytokine für den Heilungsprozess ermitteln zu können, wurde zunächst die Genexpression von IL-19, IL-20, IL-22 und IL-24 in unverletzter Haut von einem Wildtypstamm (129 SvJ) analysiert. Für IL-19 sowie IL-22 konnte keine Expression festgestellt werden. IL-24 war dagegen relativ gering exprimiert. Die Expression von IL-20 war im Vergleich zu IL-24 um etwa hundertfach erhöht. Mit Verwundung bleibt das Expressionsniveau von IL-20 etwa gleich. Lediglich am dritten Tag nach Wundsetzung ist die Expression um etwa das Dreifache erhöht. IL-22 konnte zu keinem gemessenen Zeitpunkt detektiert werden. IL-19 sowie IL-24 wurden in der frühen Wundheilungsphase stark hochreguliert. IL-19 zeigt eine maximale Expression am Tag 1 und 2 nach der Verwundung. Vom dritten

Tag an nimmt die Expression ab. Die Expression von IL-24 ist am dritten Tag nach Verwundung um etwa 1200fach, bezogen auf das Expressionsniveau in unverletzter Haut, erhöht. Die Höhe der Expression nimmt ab dem dritten Tag ab und erreicht am Tag 14 nach Verwundung etwa das Expressionsniveau der unverletzten Haut. Für IL-19 gibt es bisher noch wenig Hinweise hinsichtlich einer physiologischen Rolle in der Haut. In Läsionen von Psoriasis-Patienten war IL-19 im Vergleich zu nicht betroffenen Bereichen deutlich hochreguliert [65, 106]. Eine biologische Funktion von IL-19 im Rahmen der Psoriasis ist bisher noch unbekannt. IL-19 überexprimierende Mäuse besaßen keinen psoriasisähnlichen Phänotyp [87]. Ein Zusammenhang von IL-19 mit Wundheilung konnte bisher nur in einer wissenschaftlichen Arbeit hergestellt werden. Poindexter et. al. wiesen IL-19 und IL-22 am Tag 7 nach Wundsetzung in murinen Proben nach [70]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass IL-22 in regenerative Prozesse der Darmschleimhaut involviert ist. Hinsichtlich der kutanen Wundheilung deuten *in vitro* Experimente an, dass IL-22 einen migrationsfördernden Effekt auf Keratinozyten ausübt. Anhand von murinen *in vivo* Studien konnte außerdem 3 h nach der Entstehung von Brandwunden IL-22 detektiert werden [101, 107, 108]. Im Unterschied zu diesen Arbeiten konnte in der hier durchgeführten Wundheilungsstudie kein IL-22 in den Wildtyp-Wunden nachgewiesen werden. Ein Grund könnte der verwendete 129SvJ Mausstamm sein, welcher sich von den Stämmen in den zuvor beschriebenen Arbeiten unterscheidet. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass der Zeitpunkt der Probenentnahme (Entfernung Wundbiopsie) nicht mit dem tatsächlichen Zeitpunkt der IL-22 Expression während der Wundheilung übereinstimmte. Bezüglich der Methodik hat der Nachweis von IL-22 in Mausproben funktioniert, da Positivkontrollen parallel gemessen wurden, um methodische Fehler auszuschließen. IL-22 scheint in dem hier verwendeten Wundheilungsmodell keine Rolle zu spielen. Zu IL-20 gibt es bisher keine Daten für eine Funktion während des Heilungsprozesses.

In einer im Jahre 1999 erschienenen Publikation deutete sich eine mögliche Rolle von IL-24 in der kutanen Wundheilung an. Soo et al. fanden während ihrer Wundheilungsstudien am Rattenmodell heraus, dass das zu IL-24 homologe Gen C49a im Wundbereich exprimiert war. Die aktuellere Arbeit von Poindexter et al. bestätigt zum Teil die hier ermittelte Expressionskinetik von IL-24. In humanen Wundbiopsien von 2- und 6- Tage alten Wunden wurde IL-24 auf Proteinebene

nachgewiesen. In 10 Tage alten Wunden blieb eine IL-24 Expression dagegen aus [70]. Bisherige Studien hinsichtlich der Biologie von IL-24 fokussierten hauptsächlich auf die tumorsuppressiven Eigenschaften von IL-24 nach viraler Transfektion in Krebszellen. Dieser hemmende Effekt ist allerdings rezeptorunabhängig vermittelt [95]. Die exakte physiologische Rolle von IL-24 in der Homöostase der Haut ist bis dato noch ungeklärt.

Die aufgestellte Hypothese hinsichtlich der Expression von IL-10 Zytokinen unter inflammatorischen Bedingungen in der Wundheilung konnte anhand der in der Arbeit ermittelten Expression von IL-10-Zytokinen (IL-19, IL-20 und IL-24) in unverletzter Haut und mittels entsprechender Expressionskinetiken während des Heilungsprozesses bestätigt werden.

5.2 Die Funktionalität von IL-19, IL-20 und IL-24 in der kutanen Wundheilung

Die folgende Fragestellung richtete sich an die Funktionalität der hochregulierten IL-10 Zytokine während der Gewebereparatur. Dieser Schwerpunkt der Arbeit wurde über a) den Nachweis der Signaltransduktion und b) anhand von Wundheilungsstudien mit rezeptordefizienten Mäusen analysiert.

Nach Bindung am IL-20R1/IL-20R2 bzw. IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex aktivieren IL-19, IL-20 und IL-24 die JAK/STAT Signalkaskade. Dabei konnte hauptsächlich die Phosphorylierung von STAT3 beobachtet werden [65, 81, 82, 99]. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden phosphorylierte und unphosphorylierte STAT3 Proteine in Wundbiopsien von Wildtyp-Mäusen, 7 Tage nach Wundsetzung, mittels Western-Blot Analyse bestimmt. In allen Proben konnten phosphorylierte STAT3 Proteine nachgewiesen werden. Andere Arbeiten belegen, dass der STAT3 Signaltransduktionsweg ein wichtiges Element während der Wundheilung ist. So konnten STAT3 Moleküle in migrierenden Keratinozyten des Wundrands nachgewiesen werden. Außerdem zeigten KO-Mäuse mit einer keratinozytenspezifischen Defizienz von STAT3 eine gestörte Wundheilung, die womöglich an einer eingeschränkten Migration von Keratinozyten lag [109, 110]. Auch wenn andere Mediatoren, wie EGF und HGF, den Jak/STAT3 Signalweg aktivieren können, so lassen die phosphorylierten STAT3 Proteine in den 7d alten Wunden vermuten, dass IL-19, IL-20 und IL-24 während des Heilungsprozesses funktional sind [111, 112].

Durch die Expression der IL-20R1/IL-20R2 und IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplexe in Keratinozyten sind diese wichtige Zielzellen für IL-19, IL-20 und IL-24 [65]. Zur Klärung der Frage, ob diese IL-10-Mitglieder eine funktionelle Relevanz im Heilungsprozess besitzen, wurden erstmalig Wundheilungsexperimente mit IL-20R1- und IL-22R1- defizienten Mäusen und den Wildtyp-Mäusen mit identischen, genetischen Hintergrund durchgeführt. Aufgrund der fehlenden Rezeptoruntereinheiten sind die entsprechenden Rezeptorkomplexe unvollständig, wodurch die IL-10 Zytokine keine Signaltransduktion auslösen können, und die damit assoziierte Genexpression ausbleibt.

Nach makroskopischer Analyse der Wundfläche von IL-20R1 defizienten Mäusen (IL-20R1^{-/-} /C57B6) und den korrelierenden Wildtyp-Mäusen (C57B6), konnte ab Wundsetzung während des Heilungsverlaufes kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch nach makroskopischer Beurteilung der Wunden hinsichtlich der Wundheilungsphasen der Granulation und Epithelisierung ergaben sich zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede. Der sichtbare Verlauf der Wundheilung verlief in beiden Gruppen nahezu identisch. Anhand dieser Ergebnisse kann man zwar nicht ausschließen, dass IL-19, IL-20 und IL-24 Liganden für den IL-20R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex während der Heilung sind. Jedoch scheint die Bindung über diesen Rezeptorkomplex nicht relevant zu sein. Bis jetzt ist bekannt, dass IL-19 nur über den IL-20R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex binden kann. Obwohl IL-19 in der frühen Wundheilungsphase massiv hochreguliert wird, ist aufgrund der hier gezeigten Wundschlusskinetik von IL-20R1 defizienten Mäusen eine essentielle Funktion für IL-19 im kutanen Wundheilungsprozess der Maus fraglich.

In einem weiteren Telexperiment wurde die Wundschlusskinetik von IL-22R1 defizienten Mäusen (IL-22R1^{-/-} /129SvJ) mit den Kontrollmäusen (129SvJ) verglichen. Die Wundheilungsreaktion verlief bei beiden Gruppen deutlich langsamer als bei den IL-20R1 defizienten Mäusen und dem dazugehörigen Wildtypstamm. Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass es sich bei beiden Telexperimenten um unterschiedliche Mausstämme handelte. Die IL-20R1-KO Mäuse wurden auf einen C57/B6 Hintergrund generiert (Wildtypstamm: C57/B6). Die IL-22R1-KO-Mäuse besaßen dagegen einen 129SvJ Hintergrund (Wildtypstamm: 129SvJ). Arbeiten anderer Gruppen belegen, dass Mäuse unterschiedlicher Stämme durchaus verschiedene Wundheilungsreaktionen aufweisen können [113, 114].

Nach Analyse der Wundfläche zwischen den IL-22R1 defizienten Mäusen und den entsprechenden Wildtyp-Mäusen ergaben sich signifikante Unterschiede an jedem gemessenen Zeitpunkt. Unmittelbar nach Wundsetzung verringerte sich kontinuierlich die Wundfläche bei den Wildtyp-Mäusen. Dagegen war bei den IL-22R1 defizienten Tieren bis zum dritten Tag nach Wundsetzung keine Reduktion der Wundfläche zu erkennen. Erst nach dem dritten Tag reduzierte sich die Wundfläche der IL-22R1 defizienten Mäuse. Bei den IL-22R1 Tieren setzt somit eine, verglichen zu den Wildtyp-Tieren, verzögerte Wundheilungsreaktion ein. Nach makroskopischer Begutachtung der Wundphasen konnte festgestellt werden, dass die Granulations- und Epithelisierungsphase bei den KO-Tieren verzögert einsetzt. Diese Unterschiede waren signifikant. Um diese Beobachtungen weiter zu untersuchen, wurden Wundbiopsien zu drei Zeitpunkten nach Verwundung histologisch untersucht. Dabei wurde die relative Reepithelisierungsrate in gleicher Weise wie in zuvor veröffentlichten Wundheilungsstudien bestimmt [16, 34, 115]. Am dritten Tag nach Wundsetzung war die Reepithelisierung in den Wildtyp-Wunden in signifikanter Weise weiter fortgeschritten als in den Wunden IL-22R1 defizienter Tiere. Diese Beobachtung bestätigt die verzögerte Wundschlusskinetik der IL-22R1-KO-Tiere während der inflammatorischen Wundheilungsphase. Die histologische Bewertung sowie die Messung der Rückenhautdicke ergaben keine Unterschiede im Hautphänotyp (unverletzt) zwischen IL-22R1 defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Aufgrund dieser Daten lässt sich ableiten, dass Rezeptorkomplexe mit der IL-22R1 Rezeptoruntereinheit für eine intakte Wundheilungsreaktion bzw. Reepithelisierung absolut essentiell sind.

Die IL-22R1 Rezeptorkette scheint im Vergleich zur IL-20R1 Rezeptorkette von größerer Bedeutung zu sein. In vergangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression der IL-22R1 Rezeptoruntereinheit in Keratinozyten um ein zehnfaches höher war als die IL-20R1 Rezeptoruntereinheit [65]. Die hier gewonnenen Ergebnisse und bisherigen Erkenntnisse lassen vermuten, dass IL-24 an Keratinozyten eher über den IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex als über den IL-20R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex bindet.

Die gestörte Wundheilungsreaktion der KO-Tiere während der ersten drei Tage nach Wundsetzung korreliert sehr gut mit der stark erhöhten Expression von IL-24 in der frühen Wundheilungsphase. Anhand dieser Ergebnisse kann man interpretieren, dass in der inflammatorischen Wundheilungsphase IL-24 vermittelte Funktionen über

die Bindung an den IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex für eine ungestörte, funktionelle Wundheilung der Haut relevant ist.

Meine Hypothese, dass aufgrund einer gestörten Bindung von IL-10 Zytokinen an IL-20R1-oder IL-22R1 Rezeptorkomplexen, Mäuse mit einer IL-20R1-und IL-22R1 Rezeptordefizienz eine im Vergleich zu Kontrollmäusen gestörte Wundheilungsreaktion besitzen, konnte anhand dieser Daten nur für IL-22R1-KO-Mäuse bestätigt werden. Daraus ergibt sich eine relevante, funktionale Rolle für IL-24, nach Bindung an den IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex, im kutanen Heilungsprozess. Da zwischen IL-20R1-KO-Mäusen und den Kontrollmäusen keine Unterschiede im Heilungsverlauf feststellbar waren, scheint die Aktivität von IL-19 über Bindung an den IL-20R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex weniger essentiell für den Wundheilungsverlauf zu sein.

5.3 IL-24 in kutaner Wundheilung

Mit Hilfe immunhistologischer Analysen und anschließender Immunfluoreszenzfärbung wurde IL-24 auf Proteinebene nachgewiesen und im Wundbereich lokalisiert. Dafür wurden Paraffinschnitte von Wundproben aus Wildtyp-Mäusen 3 d und 10 d nach Verwundung sowie Paraffinschnitte aus unverletzter Haut angefertigt. Anhand der Immunfluoreszenzfärbung war die Zahl der IL-24 positiven Zellen im Wundbereich verglichen zur unverletzten Haut und den Wunden vom zehnten Tag deutlich höher. Das bestätigt die ermittelte Expressionskinetik von IL-24 auf mRNA Ebene. Die maximale Konzentration von IL-24 in der Wundheilung liegt zeitlich in der frühen inflammatorischen Phase. Nach immunhistologischer Detektion von IL-24 am dritten Tag nach Wundsetzung konnten IL-24 positive Zellen in der Epidermis des Wundrandes sowie im dermalen Wundbereich ermittelt werden. Daraus könnte man schlussfolgern, dass Keratinozyten nicht nur als Zielzellen eine Schlüsselfunktion für die Mediatoreigenschaft von IL-24 darstellen, sondern auch potentielle Produzenten für IL-24 sind. In früheren *in vitro* Studien konnten humane Keratinozyten als IL-24 Produzenten identifiziert werden [65]. Auch Poindexter et al. wiesen in ihrer Wundheilungsstudie nach, dass Keratinozyten starke IL-24 Produzenten sind. Darüber hinaus stellte sich in dieser Studie heraus, dass Makrophagen während des Heilungsprozesses zusätzlich IL-24 exprimierten [70]. In dieser Promotionsarbeit wurde anhand von doppelten Immunfluoreszenzfärbungen

untersucht, ob T-Zellen ebenfalls einen Beitrag zur IL-24 Sekretion im Wundheilungsprozess leisten. Nach Doppelfärbungen konnten CD-3/IL-24-positive Zellen nachgewiesen werden und somit erstmals T-Zellen als weitere Produzenten für IL-24 in der Wundheilung identifiziert werden. In einer Arbeit von 2011 konnte bereits gezeigt werden, dass Th2-Zell-Populationen in der Lage sind IL-24 zu exprimieren [79]. Anhand dieser Ergebnisse kann man zusammenfassend sagen, dass Keratinozyten wichtige Zielzellen von IL-24 sind und gemeinsam mit T-Zellen diesen Mediator produzieren. Für die Frage welche T-Zell-Populationen für die IL-24 Expression verantwortlich sind, werden in Zukunft zusätzliche Analysen notwendig sein. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Makrophagen während der Wundheilung IL-24 induzieren.

5.4 IL-24 in der inflammatorischen Phase der Wundheilung

Hinsichtlich der kutanen IL-24 Expression deuten bisherige Studien an, dass inflammatorische Bedingungen die IL-24 Produktion unterstützen können. In einem Mausmodell bei dem in Maushaut lokal eine Entzündungsreaktion mittels DNFB (2,4-Dinitro-1-Fluorobenzol) ausgelöst wurde, zeigte sich eine um etwa 1000 fach erhöhte Genexpression von IL-24 als in unbehandelter Maushaut [65]. Ergänzende *in vitro* Studien zeigten, dass Keratinozyten nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , IL-4 und IFN- γ , eine erhöhte IL-24 Expression besaßen [65, 70].

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand darin die Expression verschiedener Zytokine im Wundheilungsverlauf der Maus (Wildtyp, 129 SvJ) zu messen. Anhand dieser Daten konnte die Expressionsintensität und Expressionskinetik dieser Mediatoren mit IL-24 verglichen werden.

Bei den untersuchten Mediatoren handelte es sich um TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-17a, IL-4, IFN γ , TGF β und IL-10. Die Expression der T-Zell-Zytokine IFN γ , IL-4 und IL-17a war im Vergleich zu den anderen gemessenen Kandidaten deutlich geringer und fand zeitlich eher in der proliferativen Phase statt. Aufgrund dieser Daten kann man annehmen, dass T-Zellen im Vergleich zu anderen Zellpopulationen während der Wundheilung eine eher untergeordnete Rolle spielen. Der Literatur nach sind T-Zellen hauptsächlich in der Proliferationsphase aktiv. Über die exakte Funktion herrscht noch Uneinigkeit. Ab dem fünften Tag post Wundsetzung migrieren CD4+

Zellen in den Wundbereich, wobei die Th1-Zellen dabei die dominierende Subpopulation im Vergleich zur Anzahl der Th-2 Zellen ist. Th-17 Zellen konnten auch in früher Wundheilungsphase detektiert werden [101]. Nach diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Keratinozyten die Hauptproduzenten von IL-24 in der frühen Wundheilungsphase sind.

Im Vergleich zu T-Zell Zytokinen, konnte in den Wunden eine hohe, konstitutive Expression von TGF β an allen gemessenen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass dieser Mediator in allen Phasen der Wundheilung eine Schlüsselfunktion einnimmt, wo z.B. die Migration neutrophiler Granulozyten, angiogenetische Prozesse und die Transformation von Myofibroblasten gesteuert wird [14, 35, 36, 116]. IL-10 war in den hier untersuchten Proben nahezu konstitutiv exprimiert und zeigte dabei eine leicht erhöhte Expression am dritten Tag nach Wundsetzung. Diese Daten bestätigen Erkenntnisse anderer wissenschaftlicher Studien. So konnte ein Expressionsmaximum für IL-10 am dritten Tag nach Verwundung ebenfalls festgestellt werden. IL-10 soll dabei anti-inflammatorisch wirken, die Migration neutrophiler Granulozyten hemmen und somit die proliferative Phase einleiten [23, 24, 117].

Die Gene für IL-1 β , IL-6 und TNF α wurden in der frühen Wundheilungsphase stark hochreguliert. Das unterstreicht Erkenntnisse aus verschiedenen *in vivo* Studien, die eine wichtige Rolle dieser Mediatoren in der Initialisierung der inflammatorischen Phase durch Migration von neutrophilen Granulozyten und in der Induktion weiterer Zytokine sehen [16, 17, 118, 119]. *In vitro* Experimente zeigten dabei, dass IL-1 β die Expression von IL-24 in humanen Keratinozyten im Vergleich zu den unstimulierten Zellen steigern konnte [65]. Betrachtet man in den hier untersuchten Wunden die Expressionskinetiken in Relation zur maximalen Expression von IL-24, so wird deutlich, dass IL-1 β und TNF α im Heilungsprozess kinetisch ähnlich wie IL-24 exprimiert werden. Das gibt einen Hinweis darauf, dass diese Zytokine die IL-24 Produktion möglicherweise während der frühen Wundheilungsphase stimulieren.

Anhand der gewonnenen Expressionsergebnisse wurde die Ratio der Genexpression der analysierten Zytokine zwischen unverletzter Haut und in den Wunden während der ersten drei Tage nach Wundsetzung analysiert. Dabei fiel auf, dass IL-1 β und IL-24 die am stärksten hochregulierten Zytokine waren. Am dritten Tag nach Wundsetzung war IL-24 mit einer etwa 1200 fach erhöhten Expression der am stärksten hochregulierte Mediator während der inflammatorischen Phase. Daraus

lässt sich ableiten, dass eine wichtige biologische Bedeutung für IL-24 im kutanen Wundheilungsprozess besteht.

Nach Beurteilung der Daten der Zytokinkinetik im Wundheilungsverlauf lassen sich folgende Schlüsse ziehen: a) Aufgrund der übereinstimmenden Expressionsdaten mit anderen Arbeiten, eignet sich das hier verwendete Mausmodell für die funktionelle Untersuchung der IL-10 Zytokine in der Wundheilung. b) Die IL-24 Produktion in der inflammatorischen Phase kann durch die pro-inflammatorische Umgebung stimuliert werden. c) Da IL-24 eines mit am stärksten hochregulierte Zytokin war, besitzt dieser Mediator eine Schlüsselfunktion in der inflammatorischen Phase der kutanen Wundheilung.

5.5 Die Biologische Rolle von IL-24 in der kutanen Wundheilung

Aufgrund der IL-24 Expression und der auftretenden Wundheilungsverzögerung in IL-22R1 defizienten Mäusen scheint dieses Zytokin aktiv im Heilungsprozess über die Bindung an den IL-22R1/IL20R2 Rezeptorkomplex beteiligt zu sein. Die Frage nach der Funktion dieser Zytokin Rezeptor-Interaktion im Heilungsprozess bleibt damit jedoch unbeantwortet. Bisher ist die exakte Rolle von IL-24 in der Physiologie der Haut noch nicht eindeutig geklärt. Die Daten geben nur einen Hinweis darauf, dass ähnliche Effekte reguliert werden, die auch nach Bindung von IL-22 an Keratinozyten induziert werden können [71, 90]: die Hemmung der terminalen Keratinozytendifferenzierung, die Induktion antimikrobieller Peptide und die Induktion von Matrixmetalloproteinasen für eine erhöhte Zellmobilität.

Zur Klärung der Frage welche physiologischen Prozesse in IL-22R1 defizienten Mäusen während der Heilungsreaktion beeinträchtigt sind, wurde zunächst die Genexpression einiger IL-22R1 assoziierter Zytokine in Wunden von IL-22R1 defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen verglichen. Die für die IL-22R1 Rezeptorkette relevanten Zytokine sind IL-20, IL-22 und IL-24. Die IL-22R1 defizienten Tiere zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren eine Expression von IL-22 am Tag 1, 3 und 5 nach Verwundung. Jedoch war die Expression sehr gering, weshalb eine biologische Relevanz von IL-22 im Heilungsprozess zu diesen Zeitpunkten fraglich erscheint. Die Genexpression von IL-20 und IL-24 war nahezu identisch zwischen KO- und Wildtyp-Mäusen. Diese Ergebnisse zeigen zunächst, dass der gestörte Heilungsprozess der KO-Tiere nicht auf Unterschiede in der

Zytokinregulation basiert. Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass bei IL-24 keine autokrine Regulation über den IL-22R1/IL-20R2 Rezeptor während der Wundheilung stattfindet.

Um mögliche Ursachen für die gestörte Wundheilungsantwort bei den IL-22R1 defizienten Mäusen zu identifizieren, wurde die Genexpression einiger Kandidatengene in 3 Tage alten Wunden von IL-22R1 defizienten Mäusen und den Wildtyptieren hinsichtlich antimikrobieller Abwehr, Keratinozytendifferenzierung und Zellmigration untersucht. Die Zellmigration ist in der kutanen Wundheilung entscheidend von der proteolytischen Aktivität der Matrixmetalloproteinasen abhängig. Allerdings nehmen diese zinkabhängigen Endopeptidasen eine Schlüsselrolle in jeder Phase der Wundheilung ein. So können z.B. MMP3, MMP9 und MMP13 die Aktivität einiger Chemokine während der Inflammation steuern [120-122] und sind essentiell für die Migration der Keratinozyten während der Re-epithelisierung [123, 124]. In der hier beschriebenen Arbeit wurde die Genexpression von MMP3, MMP9, MMP13, MMP2, MMP10 und dem Inhibitor TIMP1 bestimmt. Bei allen untersuchten Kandidatengenen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den IL-22R1 defizienten Mäusen und den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Mittels zymographischer Analyse wurde MMP9 und MMP2 in 3 Tage alten Wunden auf Proteinebene verglichen. Die Methode hat den Vorteil, dass auch die jeweilige aktive Form der Gelatinasen nachgewiesen werden kann. Nach Betrachtung der Gele war die Bandenintensität der passiven MMP9 Form bei den Wildtyp-Tieren erkennbar höher als bei den KO-Proben. Das könnte darauf hindeuten, dass IL-24 über den IL-22R1/20R2 Rezeptor die MMP9 Expression reguliert werden kann. Zusätzliche *in vitro* Experimente zeigten dagegen keine signifikanten Unterschiede in der MMP9 Expression zwischen unstimulierten und stimulierten dreidimensionalen Keratinozytenkulturen. So kann der nach der Zymographie festgestellte Unterschied in der MMP9 Expression als sekundärer Effekt interpretiert werden.

Hinsichtlich der Keratinozytendifferenzierung wurde die Genexpression der Kandidatengene DSC1 (Desmocollin 1), KLK7 (Kallikrein 7) und K1 (Keratin 1) gemessen. Auch hier war die Expression in den KO- und Wildtyp-Proben nahezu identisch. Die Genexpressionsanalyse der Gene S100A9 (Calgranulin B), LCN2 (Lipocalin 2) und BD3 (beta-Defensin 3), die für antimikrobielle Peptide kodieren, zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass während des Heilungsprozesses diese Gene

über die IL-22R1 Rezeptoren hochreguliert werden. Allerdings zeigen diese Daten, dass die Defizienz der IL-22R1 Rezeptoruntereinheit keinen entscheidenden Einfluss auf die Expression dieser Gene im Wundbereich in der inflammatorischen Phase (Tag 3 nach Wundsetzung) hat und somit nicht in Zusammenhang mit der verzögerten Wundheilungsantwort der KO-Mäuse steht. Weiterhin zeigen Studien, dass die untersuchten Kandidatengene auch von anderen Zytokinen induziert werden können. In humanen Keratinozyten wurde festgestellt, dass die Genexpression von β -Defensin-3 durch IL-1 β , IFN γ , TNF α , TGF α und IGF-1 induziert wurde [20, 125-127]. IL-1 β und TNF α regulieren ebenfalls die Regulation von MMP9 in murinen Fibroblasten und Keratinozyten [128].

Um mögliche Ursachen für die verzögerte Wundheilung in IL-22R1 defizienten Mäusen aufzuklären, wurde die Genexpression in Wunden der inflammatorischen Phase (Tag 2 nach Wundsetzung) von IL-22R1 defizienten Mäusen und von Wildtyp-Mäusen mittels einer Microarray-Analyse genomweit untersucht. Nach dem Vergleich von jeweils zwei gemessenen Wunden stellte sich heraus, dass 47 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert waren. Bemerkenswert ist, dass davon 45 Gene in den KO-Proben höher reguliert waren als in den Wildtyp-Proben. Nach Klassifizierung der Gene konnte der größte Teil dem epidermalen Lipidmetabolismus, Glukosemetabolismus und der Immunabwehr zugeordnet werden. Allerdings konnten die Expressionsunterschiede einiger Kandidatengene (Retn, Gpd1, Mogat1, Agpat2, Ucp1) nach Validierung mittels qPCR nicht bestätigt werden.

Die bei der Microarray Analyse höher exprimierten Wildtyp-Gene sind assoziiert mit der Serin-Peptidase-Inhibitor Familie. Der Serin-Peptidase Inhibitor A1b war nach Microarray-Analyse das am stärksten differentiell exprimierte Gen. Zusätzliche Messungen mittels qPCR bestätigten, dass die Expression von SerpinA1b in den KO- und Wildtyp-Wunden 2 bzw. 3 Tage nach Wundsetzung signifikant unterschiedlich war. Am zweiten Tag nach Wundheilung war die Expression dieses Gens um ein dreifaches in den Wildtyp-Proben erhöht. Am dritten Tag war das Gen sechsmal so hoch reguliert wie in den KO-Proben. Zusätzliche *in vitro* Experimente mit einem humanen, dreidimensionalen Keratinozytenmodell machten deutlich, dass IL-24 ein potentieller Induktor für SerpinA1 sein kann. Nach Stimulation mit IL-24 war die Expression von SerpinA1 sechsmal höher als in den mit Medium stimulierten Kontrollansätzen. Anhand dieser Ergebnisse ist es denkbar, dass der Serin Peptidase Inhibitor durch Bindung von IL-24 am IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex

induziert werden kann und in Zusammenhang mit der frühen Wundheilungsstörung der IL-22R1 defizienten Mäuse steht.

SerpinA1 ist ebenfalls als alpha-1-Antitrypsin bekannt. Alpha-1-Antitrypsin ist ein akute-Phase-Protein und im menschlichen Organismus der dominierende Serin-Peptidase-Inhibitor, welcher vorrangig von Hepatozyten gebildet wird. Außerdem wurden auch Monozyten, alveoläre Epithelzellen, Keratinozyten und Epithelzellen des Intestinaltraktes als Produzenten identifiziert [129-133]. Eine Hauptfunktion besteht in der Hemmung von Serinproteinasen, wobei die höchste Affinität zur Protease Elastase neutrophiler Granulozyten besteht. Darüber hinaus wirkt alpha-1-Antitrypsin anti-inflammatorisch und immunregulatorisch, da der Peptidaseinhibitor die Infiltration von neutrophilen Granulozyten zum entzündeten Gewebe sowie die Freisetzung von IL-8, IL-1 β , TNF α und IL-6 im Blut reduzieren kann [134, 135]. In der Medizin ist bekannt, dass bei Menschen mit einer genetisch bedingten alpha1-Antitrypsin-Defizienz Lungenemphysem, Leberzirrhose, chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder subkutane Panniculitis diagnostiziert werden kann [133, 136-138].

Zunächst galt es nach Gewinnung der Expressionsdaten herauszufinden, ob Unterschiede in der systemischen alpha-1-Antitrypsin Regulation während der frühen Wundheilungsphase in IL-22R1 defizienten Mäusen und den entsprechenden Wildtyp-Tieren bestehen. Dazu wurde alpha1-Antitrypsin in Blutplasma von unverletzten Mäusen und 3 Tage nach Wundsetzung mittels eines Immunoassays bestimmt. Zu beiden Zeitpunkten gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Konzentration des Peptidaseinhibitors war in den Proben der unverletzten KO-Mäuse verglichen zu den Wildtyptieren leicht erhöht und entsprach nahezu dem 3 Tage nach Wundsetzung ermittelten Wert. Dagegen nahm die alpha-1-Antitrypsin-Konzentration um 14% in den Wildtyptieren zu. Somit ist bei den Wildtyp-Tieren zu beobachten, dass während des Heilungsprozesses dieses akute-Phase Protein hochreguliert wird. Dagegen bleibt das Niveau in den KO-Mäusen etwa gleich. Die Konzentrationsunterschiede waren nicht signifikant. Anhand dieser Daten kann man schlussfolgern, dass während des Heilungsprozesses alpha1-Antitrypsin zwar systemisch hochreguliert wird, aber die maßgebliche Regulation im Wundbereich über die Bindung von IL-24 an den IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex der Keratinozyten stattfindet.

Die topische Applikation von rekombinanten Maus-SerpinA1 Proteinen auf Wunden von IL-22R1 defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen sollte klären, ob SerpinA1 eine funktionelle Rolle für den Heilungsdeffekt der IL-22R1 defizienten Mäuse besitzt. Dafür wurden 42h nach Wundsetzung IL-22R1 defizienten Tieren und Wildtyp-Mäusen für 24h eine SerpinA1/PBS Lösung oder nur PBS zur Kontrolle topisch appliziert. Nach makroskopischer Analyse der Wundfläche wurde untersucht, ob es Unterschiede im Wundschluss zwischen den jeweiligen zwei Versuchsgruppen gibt. Die mit PBS behandelten Tiere zeigten eine unterschiedliche Wundschlusskinetik, die durch eine, wie zuvor beschriebenen, verzögerten Heilungsantwort der IL-22R1 defizienten Tiere, verglichen mit den Wildtyp-Mäusen, gekennzeichnet war. Dagegen konnte nach SerpinA1 Applikation kein signifikanter Unterschied zwischen den Wundflächen der IL-22R1 defizienten- und Wildtyp-Mäuse festgestellt werden. Mit Einbeziehung der *in vitro* Daten der IL-24 Stimulation zeigen die Ergebnisse, dass SerpinA1 ein durch IL-24 und die Rezeptoruntereinheit IL-22R1 regulierter Peptidaseinhibitor ist. Weiterhin kann man schlussfolgern, dass die Expression von SerpinA1 durch IL-24 induziert wird und für eine funktionelle, akute Wundheilung essentiell ist.

Hinsichtlich der physiologischen Bedeutung von SerpinA1 in der Haut gibt es bisher wenige Arbeiten. Einen klaren Zusammenhang mit der kutanen Wundheilung beschreiben drei unabhängig voneinander durchgeführte Studien. Dabei wurde gezeigt, dass alpha1-Antitrypsin in Patienten mit chronischen Wunden nicht detektiert werden konnte, jedoch bei Patienten mit akuter, funktionaler Wundheilung nachweisbar war. Aufgrund des alpha-1-Antitrypsinmangels stellten sie eine erhöhte Aktivität von neutrophiler Elastase verbunden mit einer verstärkten Degradation des zur Granulationsschicht gehörenden Fibronektins fest [139, 140]. In einer aktuelleren Studie wurde die Proteinexpression in Wundexsudaten von Patienten mit chronischen und akuten Wunden untersucht. Dabei konnten signifikante Unterschiede bei verschiedenen Proteaseinhibitoren festgestellt werden. SerpinA1 war in akut heilenden Wunden doppelt so hoch reguliert wie in chronischen Wunden. Auffällig war ebenfalls der in chronischen Wunden höher exprimierte Gehalt an neutrophiler Elastase [51]. Aufgrund der anti-proteolytischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften von SerpinA1 [129, 130], ist es denkbar, dass dieser Inhibitor ein wichtiges Element für den Übergang aus der inflammatorischen

Phase in die proliferative Phase ist und somit essentiell für den akuten Heilungsverlauf ist.

Einige wissenschaftlichen Arbeiten zeigen allerdings auch ein Zusammenhang von SerpinA1 mit der Regeneration der epidermalen Barriere. So vermuten Sevilla et al. nach Studien an einem Mausmodell mit gestörter epidermaler Barriere, dass SerpinA1 für die Regeneration der epidermalen Barriere eine Schlüsselrolle einnimmt, da es die epidermale proteolytische Aktivität im Stratum corneum kontrolliert und somit die Abschuppung der Korneozyten beeinflusst [130].

Hinsichtlich der regenerativen Eigenschaften von alpha-1-Antitrypsin untersuchte eine Arbeitsgruppe mit Hilfe von *in vitro* Studien den Einfluss des Peptidaseinhibitors auf Fibroblasten. Dabei konnte eine gesteigerte Proliferation sowie erhöhte Prokollagensynthese beobachtet werden [141].

Obwohl die verminderte SerpinA1 Expression in Zusammenhang mit der Wundheilungsverzögerung IL-22R1 defizienter Mäuse steht, kann über die exakte Funktion von SerpinA1 zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Dafür sind weitere Wundheilungsstudien an IL-22R1 defizienten Mäusen notwendig.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal eine funktionelle Rolle für IL-24 während der inflammatorischen Phase der kutanen Wundheilung. Verglichen zu bekannten Zytokinen in der Wundheilung, war IL-24 der am höchsten hochregulierte Mediator am Tag 3 nach Wundsetzung im Vergleich zum Expressionsniveau in unverletzter Haut. Für die Funktion von IL-24 im Heilungsverlauf ist der IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex relevant. In Wundheilungsstudien dieser Arbeit konnte dazu zum ersten mal belegt werden, dass bei Mäusen mit einer Defizienz der IL-22R1 Rezeptoruntereinheit eine verzögerte Wundheilungsreaktion mit verlangsamter Reepithelisierung verglichen zu den Kontrollmäusen nachweisbar war. Durch zusätzliche Experimente konnte ermittelt werden, dass eine verminderte Expression des Serin Peptidase Inhibitors A1 mit der gestörten Wundheilungsantwort assoziiert ist.

Anhand dieser Studien kann man schlussfolgern, dass IL-24 als Vertreter der IL-10-Zytokinfamilie, ein neuer funktionaler Mediator während der inflammatorischen Phase der Wundheilung ist, welcher nach Bindung am IL-22R1/IL-20R2 Rezeptorkomplex von Keratinozyten die Expression von SerpinA1 induziert. Aufgrund der anti-proteolytischen und immunregulatorischen Eigenschaften von SerpinA1 [129, 130],

ist es denkbar, dass IL-24 eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Überganges aus der inflammatorischen Phase in die proliferative Phase besitzt.

6. Zusammenfassung

Die kutane Wundheilung ist ein komplexer, streng regulierter Prozess bei dem Zytokine und Wachstumsfaktoren die Funktionen verschiedener Zelltypen während der Heilung steuern. Gestörte Regulationsmechanismen der Wundheilung können chronische Wunden verursachen. Um in Zukunft Therapien der chronischen Wundversorgung verbessern zu können, ist es wichtig neue Regulationsmechanismen der Wundheilung zu identifizieren. Bisherige Erkenntnisse hinsichtlich der Biologie der IL-10-Zytokinfamilie zeigen, dass einige Mitglieder der IL-10-Familie, durch Bindung an IL-22R1- und IL-20R1-Rezeptorkomplexe, in Keratinozyten regenerative Effekte induzieren und eine wichtige Rolle für die Homöostase der Haut spielen.

Das Ziel der Arbeit war, mit Hilfe von *in vivo* Studien den Einfluss der IL-10-Zytokine auf die kutane Wundheilung zu untersuchen.

Für die Aufklärung der biologischen Funktion der IL-10-Zytokine im kutanen Wundheilungsprozess wurden *in vivo* Wundheilungsstudien mit IL-22R1-, IL-20R1-rezeptordefizienten Mäusen und den entsprechenden Wildtypstämmen durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten nach Wundsetzung wurden die Wunden makroskopisch ausgewertet und mittels molekularbiologischer Methoden (qPCR, Immunhistologie, Western Blot, ELISA) analysiert.

Nach Bestimmung der Genexpression in unverletzter und verwundeter Haut konnte gezeigt werden, dass IL-19 und IL-24 die am stärksten hochregulierten IL-10-Zytokine während der inflammatorischen Phase der Wundheilung waren. Dagegen war IL-20 konstitutiv exprimiert, und IL-22 weder in unverletzter Haut, noch während des Wundheilungsprozesses hochreguliert.

In weiteren Wundheilungsstudien konnte makroskopisch zwischen den IL-20R1 defizienten Mäusen (IL-20R1^{-/-}; B6) und den Wildtyp-Mäusen (B6) eine identische Wundheilungsreaktion festgestellt werden. Dagegen zeigten Mäuse mit einer Defizienz der IL-22R1 Untereinheit (IL-22R1^{-/-}; 129SvJ) eine im Vergleich zum Wildtypstamm (129SvJ) verzögerte Wundschlusskinetik, die sich in der frühen inflammatorischen Phase der Wundheilung manifestierte. IL-22R1-Rezeptorkomplexe scheinen demnach für einen akuten Wundheilungsverlauf essentiell zu sein. Nach Messung von Genen bekannter IL-22R1 vermittelter Effekte, die in Zusammenhang mit der antimikrobiellen Abwehr, Zellmobilität und

Keratinozytendifferenzierung stehen, konnten keine Expressionsunterschiede am dritten Tag nach Wundsetzung in Wunden von IL-22R1 defizienten- und von Wildtyp-Mäusen detektiert werden. Weiterführende genomweite Microarray-Analysen mit anschließender qPCR-Validierung zeigten, dass der Serin-Peptidase Inhibitor A1 in Wunden von IL-22R1 defizienten Mäusen am dritten Tag nach Wundsetzung um ein etwa sechsfaches niedriger exprimiert war als in den Wunden der Wildtyp-Mäuse. Appliziert man SerpinA1 zwei Tage nach Wundsetzung topisch für 24 h auf Wunden IL-22R1 defizienter Mäuse, so ist im weiteren Heilungsverlauf keine verzögerte Wundheilungsreaktion zu erkennen. Zellkulturexperimente zeigten außerdem, dass IL-24 ein potentieller SerpinA1 Induktor in Keratinozyten ist.

Hinsichtlich der Ergebnisse dieser Arbeit kann man schlussfolgern, dass IL-24, nach Bindung an den Typ 2 IL-20 Rezeptorkomplex (IL-22R1/IL-20R2), in der inflammatorischen Phase der kutanen Wundheilung ein essentielles Zytokin für den akuten Heilungsverlauf zu sein scheint. Dabei besitzt IL-24 eine Schlüsselrolle für die Induktion des Serin-Peptidase Inhibitors A1 in Keratinozyten. Aufgrund der anti-proteolytischen und immunregulatorischen Eigenschaften von SerpinA1 scheint IL-24 daher ein wichtiger Mediator für den Übergang aus der inflammatorischen- in die proliferative Wundheilungsphase und somit für einen funktionellen Wundheilungsverlauf zu sein. Die hier identifizierte neue Rolle von IL-24 kann in Zukunft für die Therapie von Patienten mit chronischen Wunden wichtige Hinweise liefern und dazu beitragen, die inflammatorischen Bedingungen innerhalb der Wunde zu steuern und gleichzeitig die proliferative Phase zu initiieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Lazarus, G.S., et al., *Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing*. Arch Dermatol, 1994. 130(4): p. 489-93.
2. Li, J., J. Chen, and R. Kirsner, *Pathophysiology of acute wound healing*. Clin Dermatol, 2007. 25(1): p. 9-18.
3. Welt, K., et al., *Skin diseases in Europe. Wound healing*. Eur J Dermatol, 2009. 19(4): p. 413-6.
4. Purwins, S., et al., *Cost-of-illness of chronic leg ulcers in Germany*. Int Wound J, 2010. 7(2): p. 97-102.
5. Segre, J.A., *Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders*. J Clin Invest, 2006. 116(5): p. 1150-8.
6. Lee, S.H., S.K. Jeong, and S.K. Ahn, *An update of the defensive barrier function of skin*. Yonsei Med J, 2006. 47(3): p. 293-306.
7. Schneider, M.R., *Genetic mouse models for skin research: Strategies and resources*. Genesis, 2012. 50(9): p. 652-64.
8. Schunck, M., C. Neumann, and E. Proksch, *Artificial barrier repair in wounds by semi-occlusive foils reduced wound contraction and enhanced cell migration and reepithelization in mouse skin*. J Invest Dermatol, 2005. 125(5): p. 1063-71.
9. O'Shaughnessy, R.F. and A.M. Christiano, *Inherited disorders of the skin in human and mouse: from development to differentiation*. Int J Dev Biol, 2004. 48(2-3): p. 171-9.
10. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. 341(10): p. 738-46.
11. Bennett, N.T. and G.S. Schultz, *Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors*. Am J Surg, 1993. 165(6): p. 728-37.
12. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2006. 117(7 Suppl): p. 12S-34S.
13. Scheithauer, M. and H. Riechelmann, *[Review part I: basic mechanisms of cutaneous woundhealing]*. Laryngorhinootologie, 2003. 82(1): p. 31-5.

14. Heldin, C.H. and B. Westermark, *Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor*. *Physiol Rev*, 1999. 79(4): p. 1283-316.
15. Wood, L.C., et al., *Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis*. *J Invest Dermatol*, 1996. 106(3): p. 397-403.
16. Lin, Z.Q., et al., *Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice*. *J Leukoc Biol*, 2003. 73(6): p. 713-21.
17. Gallucci, R.M., et al., *Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice*. *FASEB J*, 2000. 14(15): p. 2525-31.
18. Grimstad, O., et al., *Cellular sources and inducers of cytokines present in acute wound fluid*. *Wound Repair Regen*, 2011. 19(3): p. 337-47.
19. Winterbourn, C.C. and A.J. Kettle, *Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome*. *Antioxid Redox Signal*, 2012.
20. Harder, J., et al., *Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic*. *J Biol Chem*, 2001. 276(8): p. 5707-13.
21. Dorschner, R.A., et al., *Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus*. *J Invest Dermatol*, 2001. 117(1): p. 91-7.
22. Steinstraesser, L., et al., *Host defense peptides in wound healing*. *Mol Med*, 2008. 14(7-8): p. 528-37.
23. Sato, Y., T. Ohshima, and T. Kondo, *Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 265(1): p. 194-9.
24. Peranteau, W.H., et al., *IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation*. *J Invest Dermatol*, 2008. 128(7): p. 1852-60.
25. Sierra-Honigmann, M.R., et al., *Biological action of leptin as an angiogenic factor*. *Science*, 1998. 281(5383): p. 1683-6.
26. Bouloumie, A., et al., *Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis*. *Circ Res*, 1998. 83(10): p. 1059-66.

27. Suganami, E., et al., *Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells*. Diabetes, 2004. 53(9): p. 2443-8.
28. Cao, R., et al., *Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(11): p. 6390-5.
29. Park, H.Y., et al., *Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro*. Exp Mol Med, 2001. 33(2): p. 95-102.
30. Brem, H., et al., *Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing*. J Invest Dermatol, 2009. 129(9): p. 2275-87.
31. Adas, G., et al., *VEGF-A and FGF gene therapy accelerate healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study)*. Int J Surg, 2011. 9(6): p. 467-71.
32. Parks, W.C., *Matrix metalloproteinases in repair*. Wound Repair Regen, 1999. 7(6): p. 423-32.
33. Santoro, M.M. and G. Gaudino, *Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing*. Exp Cell Res, 2005. 304(1): p. 274-86.
34. Shirakata, Y., et al., *Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing*. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 11): p. 2363-70.
35. Desmouliere, A., et al., *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, 1993. 122(1): p. 103-11.
36. Ronnov-Jessen, L. and O.W. Petersen, *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, 1993. 68(6): p. 696-707.
37. Baum, C.L. and C.J. Arpey, *Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events*. Dermatol Surg, 2005. 31(6): p. 674-86; discussion 686.
38. Lawrence, W.T., *Physiology of the acute wound*. Clin Plast Surg, 1998. 25(3): p. 321-40.

39. Witte, M.B. and A. Barbul, *General principles of wound healing*. Surg Clin North Am, 1997. 77(3): p. 509-28.
40. Soo, C., et al., *Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair*. Plast Reconstr Surg, 2000. 105(2): p. 638-47.
41. Werb, Z., P. Tremble, and C.H. Damsky, *Regulation of extracellular matrix degradation by cell-extracellular matrix interactions*. Cell Differ Dev, 1990. 32(3): p. 299-306.
42. Circolo, A., et al., *Differential regulation of the expression of proteinases/antiproteinases in fibroblasts. Effects of interleukin-1 and platelet-derived growth factor*. J Biol Chem, 1991. 266(19): p. 12283-8.
43. Lamar, J.M., V. Iyer, and C.M. DiPersio, *Integrin alpha3beta1 potentiates TGFbeta-mediated induction of MMP-9 in immortalized keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2008. 128(3): p. 575-86.
44. Yuan, W. and J. Varga, *Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3*. J Biol Chem, 2001. 276(42): p. 38502-10.
45. Mast, B.A. and G.S. Schultz, *Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds*. Wound Repair Regen, 1996. 4(4): p. 411-20.
46. DiPietro, L.A., et al., *Thrombospondin 1 synthesis and function in wound repair*. Am J Pathol, 1996. 148(6): p. 1851-60.
47. Reed, M.J., et al., *Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization*. J Histochem Cytochem, 1993. 41(10): p. 1467-77.
48. Jannasch, O., et al., *[The difficult wound]*. Ther Umsch, 2007. 64(9): p. 485-94.
49. Mustoe, T.A., K. O'Shaughnessy, and O. Kloeters, *Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis*. Plast Reconstr Surg, 2006. 117(7 Suppl): p. 35S-41S.
50. Riedel, K., et al., *[Pathogenesis of chronic wounds]*. Chirurg, 2008. 79(6): p. 526-34.
51. Eming, S.A., et al., *Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds*. J Proteome Res, 2010. 9(9): p. 4758-66.

52. Tarnuzzer, R.W. and G.S. Schultz, *Biochemical analysis of acute and chronic wound environments*. Wound Repair Regen, 1996. 4(3): p. 321-5.
53. Wetzler, C., et al., *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, 2000. 115(2): p. 245-53.
54. Fan, K., et al., *State of the art in topical wound-healing products*. Plast Reconstr Surg, 2011. 127 Suppl 1: p. 44S-59S.
55. Murphy, P.S. and G.R. Evans, *Advances in wound healing: a review of current wound healing products*. Plast Surg Int, 2012. 2012: p. 190436.
56. Hansen, S.L., et al., *Using skin replacement products to treat burns and wounds*. Adv Skin Wound Care, 2001. 14(1): p. 37-44; quiz 45-6.
57. Pham, C., et al., *Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review*. Burns, 2007. 33(8): p. 946-57.
58. Da Costa, R.M., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with chronic venous leg ulcers*. Wound Repair Regen, 1999. 7(1): p. 17-25.
59. Cruciani, M., et al., *Are granulocyte colony-stimulating factors beneficial in treating diabetic foot infections?: A meta-analysis*. Diabetes Care, 2005. 28(2): p. 454-60.
60. Steed, D.L., *Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers*. Diabetic Ulcer Study Group. J Vasc Surg, 1995. 21(1): p. 71-8; discussion 79-81.
61. Margolis, D.J., et al., *Effectiveness of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers*. Wound Repair Regen, 2005. 13(6): p. 531-6.
62. Renauld, J.C., *Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(8): p. 667-76.
63. Duhon, T., et al., *Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells*. Nat Immunol, 2009. 10(8): p. 857-63.
64. Wolk, K., et al., *Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes*. J Leukoc Biol, 2008. 83(5): p. 1181-93.

65. Kunz, S., et al., *Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs*. *Exp Dermatol*, 2006. 15(12): p. 991-1004.
66. Wolk, K., et al., *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. *Immunity*, 2004. 21(2): p. 241-54.
67. Wolk, K., et al., *IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis*. *Eur J Immunol*, 2006. 36(5): p. 1309-23.
68. Blumberg, H., et al., *Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function*. *Cell*, 2001. 104(1): p. 9-19.
69. Romer, J., et al., *Epidermal overexpression of interleukin-19 and -20 mRNA in psoriatic skin disappears after short-term treatment with cyclosporine a or calcipotriol*. *J Invest Dermatol*, 2003. 121(6): p. 1306-11.
70. Poindexter, N.J., et al., *IL-24 is expressed during wound repair and inhibits TGFalpha-induced migration and proliferation of keratinocytes*. *Exp Dermatol*, 2010. 19(8): p. 714-22.
71. Sa, S.M., et al., *The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis*. *J Immunol*, 2007. 178(4): p. 2229-40.
72. Sabat, R., *IL-10 family of cytokines*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. 21(5): p. 315-24.
73. Zdanov, A., *Structural analysis of cytokines comprising the IL-10 family*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. 21(5): p. 325-30.
74. Wolk, K., et al., *Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members?* *J Immunol*, 2002. 168(11): p. 5397-402.
75. Trifari, S., et al., *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. *Nat Immunol*, 2009. 10(8): p. 864-71.
76. Chung, Y., et al., *Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes*. *Cell Res*, 2006. 16(11): p. 902-7.
77. Liang, S.C., et al., *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. *J Exp Med*, 2006. 203(10): p. 2271-9.

78. Gallagher, G., et al., *Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10)*. *Genes Immun*, 2000. 1(7): p. 442-50.
79. Sahoo, A., et al., *Stat6 and c-Jun mediate Th2 cell-specific IL-24 gene expression*. *J Immunol*, 2011. 186(7): p. 4098-109.
80. Langer, J.A., E.C. Cutrone, and S. Kotenko, *The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. 15(1): p. 33-48.
81. Dumoutier, L., et al., *Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types*. *J Immunol*, 2001. 167(7): p. 3545-9.
82. Parrish-Novak, J., et al., *Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions*. *J Biol Chem*, 2002. 277(49): p. 47517-23.
83. Pletnev, S., et al., *Characterization of the recombinant extracellular domains of human interleukin-20 receptors and their complexes with interleukin-19 and interleukin-20*. *Biochemistry*, 2003. 42(43): p. 12617-24.
84. Logsdon, N.J., et al., *Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes*. *J Interferon Cytokine Res*, 2002. 22(11): p. 1099-112.
85. Kruglov, A.A., et al., *Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008. 19(3-4): p. 231-44.
86. Schmid, J.A. and A. Birbach, *IkappaB kinase beta (IKKbeta/IKK2/IKBKB)--a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008. 19(2): p. 157-65.
87. Chan, J.R., et al., *IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis*. *J Exp Med*, 2006. 203(12): p. 2577-87.
88. Hsu, Y.H., et al., *Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(9): p. 2722-33.
89. Huang, F., et al., *Potentiation of IL-19 expression in airway epithelia by IL-17A and IL-4/IL-13: important implications in asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. 121(6): p. 1415-21, 1421 e1-3.
90. Wolk, K., et al., *Biology of interleukin-22*. *Semin Immunopathol*, 2010. 32(1): p. 17-31.

91. Wolk, K., et al., *The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis*. Eur J Immunol, 2009. 39(12): p. 3570-81.
92. Sabat, R., et al., *Immunopathogenesis of psoriasis*. Exp Dermatol, 2007. 16(10): p. 779-98.
93. Liu, L., et al., *Selective enhancement of multipotential hematopoietic progenitors in vitro and in vivo by IL-20*. Blood, 2003. 102(9): p. 3206-9.
94. He, M. and P. Liang, *IL-24 transgenic mice: in vivo evidence of overlapping functions for IL-20, IL-22, and IL-24 in the epidermis*. J Immunol, 2010. 184(4): p. 1793-8.
95. Dash, R., et al., *mda-7/IL-24: a unique member of the IL-10 gene family promoting cancer-targeted toxicity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. 21(5): p. 381-91.
96. Fisher, P.B., *Is mda-7/IL-24 a "magic bullet" for cancer?* Cancer Res, 2005. 65(22): p. 10128-38.
97. Chada, S., et al., *Bystander activity of Ad-mda7: human MDA-7 protein kills melanoma cells via an IL-20 receptor-dependent but STAT3-independent mechanism*. Mol Ther, 2004. 10(6): p. 1085-95.
98. Kragstrup, T.W., et al., *The expression of IL-20 and IL-24 and their shared receptors are increased in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis*. Cytokine, 2008. 41(1): p. 16-23.
99. Andoh, A., et al., *Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease*. J Immunol, 2009. 183(1): p. 687-95.
100. Soo, C., et al., *Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7*. J Cell Biochem, 1999. 74(1): p. 1-10.
101. Sasaki, J.R., Q. Zhang, and M.G. Schwacha, *Burn induces a Th-17 inflammatory response at the injury site*. Burns, 2011. 37(4): p. 646-51.
102. Okamura, Y., et al., *Double-labeled donor probe can enhance the signal of fluorescence resonance energy transfer (FRET) in detection of nucleic acid hybridization*. Nucleic Acids Res, 2000. 28(24): p. E107.
103. Sei-lida, Y., et al., *Real-time monitoring of in vitro transcriptional RNA synthesis using fluorescence resonance energy transfer*. Nucleic Acids Res, 2000. 28(12): p. E59.

104. Scheid, A., et al., *Genetically modified mouse models in studies on cutaneous wound healing*. *Exp Physiol*, 2000. 85(6): p. 687-704.
105. Salcido, R., A. Popescu, and C. Ahn, *Animal models in pressure ulcer research*. *J Spinal Cord Med*, 2007. 30(2): p. 107-16.
106. Otkjaer, K., et al., *The dynamics of gene expression of interleukin-19 and interleukin-20 and their receptors in psoriasis*. *Br J Dermatol*, 2005. 153(5): p. 911-8.
107. Pickert, G., et al., *STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing*. *J Exp Med*, 2009. 206(7): p. 1465-72.
108. Eyerich, S., et al., *Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling*. *J Clin Invest*, 2009. 119(12): p. 3573-85.
109. Sano, S., et al., *Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis*. *EMBO J*, 1999. 18(17): p. 4657-68.
110. Sano, S., K.S. Chan, and J. DiGiovanni, *Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases*. *J Dermatol Sci*, 2008. 50(1): p. 1-14.
111. Boccaccio, C., et al., *Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway*. *Nature*, 1998. 391(6664): p. 285-8.
112. McCawley, L.J., P. O'Brien, and L.G. Hudson, *Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)- mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9*. *J Cell Physiol*, 1998. 176(2): p. 255-65.
113. Rajnoch, C., et al., *Regeneration of the ear after wounding in different mouse strains is dependent on the severity of wound trauma*. *Dev Dyn*, 2003. 226(2): p. 388-97.
114. Costa, R.A., et al., *Effects of strain and age on ear wound healing and regeneration in mice*. *Braz J Med Biol Res*, 2009. 42(12): p. 1143-9.
115. Low, Q.E., et al., *Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice*. *Am J Pathol*, 2001. 159(2): p. 457-63.
116. Papakonstantinou, E., et al., *Hypoxia modulates the effects of transforming growth factor-beta isoforms on matrix-formation by primary human lung fibroblasts*. *Cytokine*, 2003. 24(1-2): p. 25-35.

117. Bryan, D., et al., *Cytokine gene expression in a murine wound healing model*. Cytokine, 2005. 31(6): p. 429-38.
118. Hu, Y., et al., *The role of interleukin-1 in wound biology. Part II: In vivo and human translational studies*. Anesth Analg, 2010. 111(6): p. 1534-42.
119. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiol Rev, 2003. 83(3): p. 835-70.
120. McQuibban, G.A., et al., *Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3*. Science, 2000. 289(5482): p. 1202-6.
121. McQuibban, G.A., et al., *Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo*. Blood, 2002. 100(4): p. 1160-7.
122. Gill, S.E. and W.C. Parks, *Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. 40(6-7): p. 1334-47.
123. Agren, M.S., *Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for re-epithelialization of cutaneous wounds*. Arch Dermatol Res, 1999. 291(11): p. 583-90.
124. Madlener, M., W.C. Parks, and S. Werner, *Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair*. Exp Cell Res, 1998. 242(1): p. 201-10.
125. Sorensen, O.E., et al., *Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors*. J Immunol, 2003. 170(11): p. 5583-9.
126. Jia, H.P., et al., *Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach*. Gene, 2001. 263(1-2): p. 211-8.
127. Garcia, J.R., et al., *Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of Xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction*. Cell Tissue Res, 2001. 306(2): p. 257-64.
128. Netzel-Arnett, S., et al., *Collagen dissolution by keratinocytes requires cell surface plasminogen activation and matrix metalloproteinase activity*. J Biol Chem, 2002. 277(47): p. 45154-61.
129. Venembre, P., et al., *Secretion of alpha 1-antitrypsin by alveolar epithelial cells*. FEBS Lett, 1994. 346(2-3): p. 171-4.

130. Sevilla, L.M., et al., *Mice deficient in involucrin, envoplakin, and periplakin have a defective epidermal barrier.* J Cell Biol, 2007. 179(7): p. 1599-612.
131. Perlmutter, D.H., et al., *The cellular defect in alpha 1-proteinase inhibitor (alpha 1-PI) deficiency is expressed in human monocytes and in Xenopus oocytes injected with human liver mRNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(20): p. 6918-21.
132. Geboes, K., et al., *Morphological identification of alpha-1-antitrypsin in the human small intestine.* Histopathology, 1982. 6(1): p. 55-60.
133. Janciauskiene, S.M., et al., *The discovery of alpha1-antitrypsin and its role in health and disease.* Respir Med, 2011. 105(8): p. 1129-39.
134. Griese, M., et al., *alpha1-Antitrypsin inhalation reduces airway inflammation in cystic fibrosis patients.* Eur Respir J, 2007. 29(2): p. 240-50.
135. Pott, G.B., et al., *Alpha-1-antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood.* J Leukoc Biol, 2009. 85(5): p. 886-95.
136. Gambichler, T., et al., *Complex extra-intestinal complications of ulcerative colitis in a patient with alpha1-antitrypsin deficiency.* Eur J Med Res, 2006. 11(3): p. 135-8.
137. Folwaczny, C., et al., *Alpha1-antitrypsin alleles and phenotypes in patients with inflammatory bowel disease.* Scand J Gastroenterol, 1998. 33(1): p. 78-81.
138. Valverde, R., et al., *Alpha-1-antitrypsin deficiency panniculitis.* Dermatol Clin, 2008. 26(4): p. 447-51, vi.
139. Grinnell, F. and M. Zhu, *Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin.* J Invest Dermatol, 1996. 106(2): p. 335-41.
140. Rao, C.N., et al., *Alpha 1-antitrypsin is degraded and non-functional in chronic wounds but intact and functional in acute wounds: the inhibitor protects fibronectin from degradation by chronic wound fluid enzymes.* J Invest Dermatol, 1995. 105(4): p. 572-8.
141. Dabbagh, K., et al., *Alpha-1-antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signalling pathways.* J Cell Physiol, 2001. 186(1): p. 73-81.

Danksagung

Ich danke Dr. Robert Sabat, für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in der Interdisziplinären Arbeitsgruppe Molekulare Immunpathologie durchführen zu können. Für die Bereitstellung des Themas und für die Betreuung der Arbeit durch stets konstruktive Diskussionen, Vorschläge und Unterstützung bin ich ihm sehr dankbar.

Prof. Dr. Hans-Dieter Volk danke ich sehr für die Übernahme der Betreuung und Begutachtung meiner Promotionsarbeit.

In diesem Sinne bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Wolfram Sterry, Prof. Dr. Khusru Asadullah, PD Dr. Rotraut Mößner, Prof. Dr. Bianca Wittig und PD Dr. Sigbert Jahn zum einen für die Bereitschaft meine Promotionsarbeit zu begutachten und, je nach Entscheidung der Promotionskommission, für die Begutachtung der Arbeit.

Dr. Kerstin Wolk danke ich für die Organisation der Generierung transgener Mausmodelle sowie für die Bereitstellung des Themas.

Dr. Stefanie Endesfelder bin ich sehr dankbar für das Anlernen tierexperimenteller Methoden und für die Etablierung der *in vivo* Wundheilungsstudien. Meinen herzlichen Dank gilt ihrer stetigen Unterstützung und der intensiven Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Anja Kühl danke ich für die problemlose Kooperation und Durchführung der Immunfluoreszenz-Studien für diese Arbeit.

Insgesamt danke ich den Kollegen meiner Arbeitsgruppe sowie Dr. Sandra Phillip und ihren Mitarbeitern des Psoriasis Studienzentrums für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit. Beate Pust danke ich sehr für das Anlernen immunhistologischer Techniken und für die Assistenz und Geduld bei der Durchführung vieler *in vivo* Wundheilungsexperimente. Ich bedanke mich für die fachliche Unterstützung und Organisation des qPCR-Labors bei Annette Buß.

Katarzyna Warszawska danke ich die Hilfe bei einigen Wundheilungsexperimenten. Dr. Ellen Witte bin ich für die Durchführung der Stimulationsversuche und für die Verwaltung der Versuchstierdatenbank dankbar. Katrin Witte danke ich ebenfalls für ihre fachliche Meinung und Hilfe. Brigitte Ketel gilt mein Dank für die fachliche Unterstützung und Geduld bei jeglicher Materialbestellung.

Sehr dankbar bin ich Sabrina Wendt für die Hilfe bei der Auswertung einiger Tierexperimente und für die Unterstützung beim Korrekturlesen.

Ich danke meinen Freunden für den stetigen Rückhalt.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Diana bedanken. Ihre Unterstützung, Geduld und Liebe hat mir die nötige Kraft gegeben die Promotionsarbeit zu beenden.

Meinen Eltern gilt ein ganz besonderer Dank. Ihr Vertrauen und jahrelange Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit diese Promotionsarbeit ermöglicht.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen

Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J.: *Biology of interleukin-10*. Cytokine Growth Factor Rev. 2010; 21 (5).331-44.

Wolk K*, Witte K*, Witte E, Warszawska K, Kirsch S, Kokolakis G, Phillip S, Proesch S, Sterry W, Volk HD, Sabat R. *IL-29 is a novel Th-17 cytokine and is critical for the cutaneous antiviral competence in psoriasis*.

Manuskript wurde eingereicht.

Kirsch S, Endesfelder S, Witte K, Warszawska K, Witte E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K, Sabat R.: *IL-24 is a key factor in the inflammatory phase of cutaneous wound healing*..

Manuskript in Vorbereitung.

Kirsch S, Sabat R.

Role of cytokines in cutaneous wound healing. Cytokine Growth Factor Rev
Eingeladenes Manuskript in Vorbereitung.

Vorträge

Kirsch S, Endesfelder S, Witte E, Witte K, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K, Sabat R.: *IL-10 cytokines in wound healing: IL-19 and IL-24 act simultaneously but with different effects*.

21st European Tissue Repair Society Congress (ETRS)

Amsterdam, Niederlande, 05.-07. Oktober 2011

Kirsch S, Endesfelder S, Witte E, Witte K, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K, Sabat R.: *Keratinocyte-derived IL-24 is essential during the inflammatory phase of cutaneous wound healing*.

20th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV)

Lissabon, Portugal, 20.-24. Oktober

Poster

Wolk K, Witte E, Haugen H, Xu W, Kunz S, Waggle K, Anderson M, vom Baur E, Witte K, Warszawska K, Kirsch S, Philipp S, Johnson-Leger C, Sterry W, Volk HD, Sabat R. The epidermal alterations in psoriasis are mediated by IL-22, but not by other T-cell mediators including IL-17 or IFN γ , and are amplified by TNF-alpha.
XXXVII. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF)
Lübeck, Deutschland, 18.-20. Februar 2010

Wolk K, Witte E, Warszawska K, Kirsch S, Sterry W, Volk HD, Sabat R.
Interleukin-19, a novel component of the immunological cascades in psoriasis.
XXXVIII. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF)
Tübingen, Deutschland, 17.-19. Februar 2011

Kirsch S, Endesfelder S, Witte E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K, Sabat R.
IL-24 plays a key role in cutaneous wound healing via signaling through IL-22R1/IL-20R2 receptor complex.
XXXVIII. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF)
Tübingen, Deutschland, 17.-19. Februar 2011

Kirsch S, Endesfelder S, Witte E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K, Sabat R.
IL-24 plays a key role in cutaneous wound healing via signaling through IL-22R1/IL-20R2 receptor complex.
10th World Congress on Inflammation, International Association of Inflammation Societies (IAIS)
Paris, Frankreich, 25.-29. Juni 2011

Kirsch S, Witte E, Witte K, Endesfelder S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K, Sabat R. IL-24 Expression during early wound healing phase is dependent on an inflammatory environment.
XXXIX. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF)
Marburg, Deutschland, 01.-03. März 2012-10-28

Kirsch S, Witte E, Witte K, Endesfelder S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K, Sabat R. IL-24 Expression during early wound healing phase is dependend on an inflammatory environment.

3rd European Congress of Immunology (ECI), European Federation of Immunological Sciences (EFIS), British Society for Immunology (BSI)

Glasgow, Schottland, 05.-08. September 2012

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Stefan Kirsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss der Zytokine der Interleukin-10-Familie auf die kutane Wundheilung“, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

04.12.2012

Datum

Unterschrift