

***In vivo*-Studien
an Mäusen zur Bedeutung
der TNF α - und IL-1-Signaltransduktionswege
bei der Rekonstitution der Haut
nach traumatischen Verletzungen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

MICHAEL SCHUNCK

Kiel

Dezember 2002

Referent/in:

Korreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	5
2 Material und Methoden	8
2.1 Versuchstiere	8
2.2 Untersuchungen von Vollhautwunden an haarlosen Wildtyp-Mäusen	9
2.2.1 Einfluß okklusiver und nicht okklusiver Wundabdeckungen auf verschiedene Heilungsparameter.....	9
2.2.1.1 Narkotisierung und Sektion der Versuchstiere.....	9
2.2.1.2 Präparation der Verbände und Wundversorgung.....	10
2.2.1.3 Dokumentation der Wundheilung, der Wundkontraktion und der Geweberegenerierung.....	11
2.2.1.4 Dokumentation der Zellmigration.....	15
2.2.2 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase in verschiedenen Stadien der Wundheilung.....	18
2.2.2.1 Separation der Epidermis von subcutanem Fettgewebe und der Unterhaut.....	19
2.2.2.2 Homogenisieren der Gewebeproben.....	19
2.2.2.3 Bestimmung des Proteingehaltes.....	21
2.2.2.4 Meßprinzip zur Aktivitätsbestimmung der Sphingomyelinasen.....	22
2.2.3 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase des Wundrandes im Verlauf der Wundheilung.....	25
2.2.4 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung haarloser Wildtyp-Mäuse.....	26
2.2.5 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung haarloser Wildtyp-Mäuse	30
2.2.5.1 Immunhistologische Analyse der epidermalen Differenzierung.....	31
2.2.5.2 Westernblot-Analyse der epidermalen Differenzierung.....	33
2.3 Untersuchungen von Vollhautwunden an transgenen Mäusen	42
2.3.1 Wundheilung transgener Mäuse mit IL-1-R1 Defizienz.....	42
2.3.2 Wundheilung transgener Mäuse mit TNF-R1 Defizienz.....	43

2.3.3 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung IL-1-R1 und TNF-R1 defizienter Mäuse	43
2.3.4 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung IL-1-R1 und TNF-R1 defizienter Mäuse	46
2.3.5 Wundheilung transgener Mäuse mit TNF-R1/IL-1-R1 Doppeldefizienz	47
2.3.6 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienter Mäuse	47
2.3.7 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienter Mäuse	47
2.3.8 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei IL-1-R1 und TNF-R1 Defizienz	48
2.3.9 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei TNF-R1/IL-1-R1 Doppeldefizienz	48
2.3.10 Wundheilung transgener Mäuse mit FAN Defizienz	48
2.3.11 Wundheilung transgener Mäuse mit A-SMase Defizienz	49
2.3.12 Epidermale Proliferation und Differenzierung im Verlauf der Wundheilung FAN und A-SMase defizienter Mäuse	49
2.3.13 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei FAN und A-SMase Defizienz	50
2.4 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	50
3 Ergebnisse	52
3.1 Untersuchungen von Vollhautwunden an haarlosen Wildtyp-Mäusen	52
3.1.1 Einfluß okklusiver und nicht okklusiver Wundabdeckungen auf verschiedene Heilungsparameter	52
3.1.2 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase in verschiedenen Stadien der Wundheilung	59
3.1.3 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase des Wundrandes im Verlauf der Wundheilung	61
3.1.4 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung haarloser Wildtyp-Mäuse	63
3.1.5 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung haarloser Wildtyp-Mäuse	64
3.2 Untersuchungen von Vollhautwunden an transgenen Mäusen	67
3.2.1 Wundheilung transgener Mäuse mit IL-1-R1 Defizienz	67

3.2.2 Wundheilung transgener Mäuse mit TNF-R1 Defizienz.....	70
3.2.3 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung IL-1-R1 und TNF-R1 defizienter Mäuse.....	74
3.2.4 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung IL-1-R1 und TNF-R1 defizienter Mäuse.....	75
3.2.5 Wundheilung transgener Mäuse mit TNF-R1/IL-1-R1 Doppeldefizienz.....	79
3.2.6 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienter Mäuse.....	84
3.2.7 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienter Mäuse.....	85
3.2.8 Wundheilung transgener Mäuse mit FAN Defizienz.....	86
3.2.9 Wundheilung transgener Mäuse mit A-SMase Defizienz.....	88
3.2.10 Epidermale Proliferation und Differenzierung im Verlauf der Wundheilung FAN und A-SMase defizienter Mäuse.....	92
3.2.11 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung transgener Mäuse.....	96
3.2.11.1 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei IL-1-R1 und TNF-R1 Defizienz.....	97
3.2.11.2 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei TNF-R1/IL-1-R1 Doppeldefizienz.....	100
3.2.11.3 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei FAN und A-SMase Defizienz.....	101
4 Diskussion	105
5 Zusammenfassung	127
6 Abstract	129
7 Literaturverzeichnis	131

Abkürzungsverzeichnis

APAAP	alkalische Phosphatase antialkalische Phosphatase (alkaline phosphatase antialkaline phosphatase)
A-SMase	saure Sphingomyelinase (acid sphingomyelinase)
ATP	Adenosin triphosphat
BALB/c	weißhaarige Wildtyp-Maus
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
BrdU	5- Bromo -2'- Deoxy uridin
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
C _{BI}	gemessene Radioaktivität des Blindwertes
C57Bl/6	dunkelhaarige Wildtyp-Maus
CE	cornified envelope
C _P	gemessene Radioaktivität der Probe
cpm	counts per minute
C _R	gemessene Radioaktivität des ¹⁴ C-Sphingomyelins ohne Enzymzusatz
CrI:SKH-1-HR	haarlose Wildtyp-Maus
1,2 DAG	1,2 Diacylglycerol
DD	Todesdomäne (death domain)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Proteineinwaage der Probe
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
f	Linealabschnitt im digitalisierten Bild, der real zehn Millimetern entspricht
F	Vergleichsmaß für die Berechnung der Bildflächen zu den Realmaßen
FAN	Faktor zur Aktivierung der N-SMase (factor associated with neutral sphingomyelinase activation)
Fas/APO-1	fibroblast associated/apoptosis-1
GAP-1	G ₁ -Phase

GAP-2	G ₂ -Phase
GBq	Gigabequerel
Hepes	N-[2- H ydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
H ₂ O _{bidest}	zweifach deionisiertes Wasser
H-Puffer	Homogenisierungspuffer
HRP	Meerrettich-Peroxidase (h orseradish p eroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IL-1 α	Interleukin-1α
IL-1 β	Interleukin-1β
IL-1RAcP	Interleukin-1-Rezeptor akzessorisches Protein (interleukin-1-receptor accessory protein)
IL-1-R1	Interleukin-1-Rezeptor 1
IL-1-R2	Interleukin-1-Rezeptor 2
<i>IL1r1^{tm1Imx}</i>	IL-1-R1, Nomenklatur Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA
k	äußere Begrenzung der ursprünglichen Wunde
K	aus der Wundkontraktion resultierende abgeheilte Wundfläche
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K _r	reale Fläche der Wundkontraktion am Untersuchungstag (in mm ²)
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	hygroskopisches Magnesiumchlorid
MMP	Matrixmetalloproteasen
n	bekannte Stoffmenge des ¹⁴ C-Sphingomyelins, gelöst in Toluol-Ethanol
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ H ₂ PO ₄ · H ₂ O	hygroskopisches Dinatriumdihydrogenphosphat
NaF	Natriumfluorid
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
NP	Niemann-Pick Erkrankung
NP-Typ A	Niemann-Pick Erkrankung-Typ A
NP-Typ B	Niemann-Pick Erkrankung-Typ B

NSD	N-SMase Domäne (N-SMase domain)
N-SMase	neutrale Sphingomyelinase (neutral sphingomyelinase)
o	äußere Umrandung der offenen Wunde
O	offene Wundfläche am Untersuchungstag im digitalisierten Bild
O ₀	berechnete offene Wundfläche zu Versuchsbeginn
O _r	berechnete offene Wundfläche am Untersuchungstag
PBS	Phosphatpuffer (phosphate-buffered-saline)
Phospho-STAT-3	phosphorylierter STAT-3
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
p-Nitrophenyl-Phosphat	Para-Nitrophenyl-Phosphat
r	äußere Umrandung der durch Epithelregenerierung verheilten Wundfläche
R	aus der Reepithelialisierung resultierende abgeheilte Wundfläche
RE _r	relativer Grad der Reepithelialisierung am Untersuchungstag
SMase	Sphingomyelinase
S-Phase	Synthese-Phase
Spr-Protein	kleines Prolin-reiches Protein (small-proline-rich-protein)
STAT-3	Signaltransduktions- und Transkriptions aktivierender Faktor-3 (signal transducer and activator of transcription-3)
StreptABComplex	Streptomycin-Avidin-Biotin-Complex
t	Inkubationszeit
TBS	Trispuffer (tris buffered saline)
TBST	Trispuffer-Tween 20 (tris buffered saline tween 20)
TEWL	transepidermaler Wasserverlust (transepidermal water loss)
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α (Tumor Necrosis Factor α)
TNF-p55-R	TNF-R1, Synonym
TNF-R1	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor 1
TNF-R1/IL-1-R1	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor 1/ Interleukin 1-Rezeptor 1

<i>Tnfrsf1a^{tm1Imx} Il1r1^{tm1Imx}</i>	TNF-R1/IL-1-R1, Nomenklatur Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA
TNF-R2	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor 2
TNF-R55	TNF-R1, Synonym
<i>Tnfrsf1a^{tm1Imx 2}</i>	TNF-R1, Nomenklatur Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-Zellen	Thymus-Zellen
WK _r	relativer Grad der Wundkontraktion am Untersuchungstag
W _r	relativer Grad der Wundheilung am Untersuchungstag

1 Einleitung

Die Haut ist ein hoch komplexes Organ und erfüllt eine Vielzahl lebenswichtiger Aufgaben. Sie grenzt den Organismus einerseits gegen die Umgebung ab und schützt ihn so vor Krankheitserregern und toxischen Substanzen. Andererseits empfängt die Haut über eine Reihe von Rezeptoren und freien Nervenendigungen Informationen aus der Umwelt, die für das Überleben des Organismus wichtig sind.

Die Funktion der Haut kann durch mechanische, physikalische und chemische Einflüsse gestört werden (THIEL, 1998). Bei oberflächlichen Verletzungen ist nur die äußere Epidermis betroffen, und die Heilung erfolgt in der Regel rasch und ohne Narbenbildung. Aus einer traumatisch bedingten Desintegration der Haut mit einer tiefgreifenden Schädigung des Bindegewebes und der Blutgefäße in der Dermis resultiert hingegen ein langwieriger Heilungsprozeß, an dessen Ende ein Defektverschluß der Wunde mit einer Narbenbildung steht (MARTIN, 1997; SINGER & CLARK, 1999; AKASAKA et al., 2000). Besonders dramatisch wirken sich auch bestimmte Krankheiten auf die Wundheilung aus. Diabetes mellitus, Ulcus cruris, Dekubita, Hauttumore, Infektionen oder chronisch venöse Insuffizienzen sind nur einige Beispiele für pathophysiologische Grunderkrankungen, die eine gestörte Wundheilung nach sich ziehen. Durch eine genetische Disposition oder durch starke mechanische Belastungen, wie z. B. im Bereich der Arm- und Kniebeugen, kann zudem im Verlauf der Wundheilung eine überschüssige Narbenbildung verursacht werden.

Durch einen Verband wird die Heilung einer Wunde wirkungsvoll unterstützt. Ursprünglich wurden Verbände auf eine Hautwunde aufgebracht, um die Verletzung vor Verunreinigungen zu schützen und Infektionen durch Krankheitserreger zu verhindern. Die Anforderungen an eine Wundaufgabe sind aus heutiger Sicht jedoch weitaus differenzierter. In erster Linie fördert ein Verband immer noch die körpereigenen Reinigungsmechanismen, indem er überschüssiges Wundexsudat absorbiert und gleichzeitig vor Verunreinigungen und Infektionen schützt. Ein ausgewogenes Feuchtigkeitsniveau in der Wunde ist vor allem für einen optimalen Ablauf der Wundheilung notwendig. Mit einer Wundaufgabe können außerdem gezielt Substanzen in die Wunde eingebracht werden, die die Heilung fördern. Andererseits sind auch Störungen im Heilungsprozeß durch in die Wunde eingedrungene Bestandteile bestimmter Wundaufgaben beschrieben worden (DE CONINCK, 1996; ÅGREN & EVERLAND, 1997). Wie eine Wundaufgabe beschaffen sein muß, um ein ausreichendes Maß an

Feuchtigkeit auf einer Wunde zu erzielen und welche Wirkung ein Verband auf zelluläre Prozesse der Wundheilung ausübt, ist ein Thema der vorliegenden Arbeit.

Oberstes Ziel der Forschung ist es, die zellulären und molekularen Mechanismen der Wundheilung aufzuklären. Durch Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis soll die Heilungsdauer verkürzt und dabei eine kosmetisch akzeptable Narbe erzielt werden. Die Physiologie der Wundheilung ist jedoch außerordentlich komplex und schließt neben anabolen Vorgängen, wie der Geweberegenerierung, auch katabole Prozesse, wie den Abbau beschädigten Gewebes, ein (CLARK, 1996; PALADINI et al., 1996; GREENHALGH, 1998).

Die hohe Komplexität der Wundheilung setzt voraus, daß die beteiligten Zellen rasch miteinander kommunizieren. Vielzellige Organismen bedienen sich dabei der Signaltransduktion über bestimmte zellmembranüberspannende Rezeptoren, die einen direkten Kontakt der Zellen untereinander unnötig macht (KRAUSS, 1997). Eine Signaltransduktion birgt den Vorteil, daß wenige Botenstoffe ausreichen, ein Signal auszulösen und zu potenzieren. Die Signalkaskade ermöglicht über verschiedene Proteine, niedermolekulare Substanzen u. a. darüber hinaus, die Regulation der Signalvermittlung (KRAUSS, 1997). Aktivierende und inhibierende Faktoren dienen dabei der zielgerichteten Steuerung einer Signaltransduktion, so daß eine Zelle je nach Signal beispielsweise zur Proliferation oder zur Apoptose angeregt werden kann.

Zu den Botenstoffen, die am Prozeß der Wundheilung beteiligt sind, zählen vor allem Zytokine und Wachstumsfaktoren (KISHIMOTO et al., 1994; PAUL & SEDER, 1994; HILL & TREISMAN, 1995; TANIGUCHI et al., 1995). Ihnen kommt eine besondere Bedeutung in der Wundheilung zu, da sie während des Heilungsprozesses von immunreaktiven Zellen und Keratinozyten der Haut gleichermaßen freigesetzt werden und verschiedene Signale vermitteln (HÜBNER et al., 1996). Es wird vermutet, daß eine fehlerhafte Signaltransduktion dieser Botenstoffe zu einer mangelnden Wundheilung oder zu einer übersteigerten Narbenbildung führen kann (STOCUM, 1997).

Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 werden mit Stoffwechselfvorgängen in Verbindung gebracht, die in den Zielzellen zur Proliferation, Differenzierung oder Apoptose führen (CLARK, 1996; MARTIN, 1997). In den Keratinozyten der Haut vermitteln diese Zytokine ihre Signale über die Oberflächenrezeptoren, TNF-R1 und IL-1-R1. Über zwei distinkte

Abschnitte des TNF-Rezeptor 1, der NSD (N-SMase domain) und der DD (death domain), werden zwei Sphingomyelinase-Isoenzyme aktiviert (ADAM et al., 1996). Die beiden Phosphodiesterasen unterscheiden sich zum einen in ihren pH-Optima und zum anderen von ihrer Lage im Cytosol. Die saure Sphingomyelinase (A-SMase) ist Bestandteil der endosomalen und lysosomalen Kompartimente der Keratinozyten (WIEGMANN et al., 1994). Die neutrale Sphingomyelinase (N-SMase) ist dagegen im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert und benötigt für die Aktivierung Mg^{2+} oder Mn^{2+} (FENSOME et al., 2000; NEUBERGER et al., 2000).

Die beiden Isoenzyme werden aber nicht nur durch $TNF\alpha$ stimuliert, sondern können auch auf dem Wege der IL-1/IL-1-R1-Signalkaskade aktiviert werden (DINARELLO, 1991; KOLESNICK & GOLDE, 1994). Anders als beim $TNF\alpha$ /TNF-R1-System benötigt die A-SMase bei der IL-1 Signaltransduktion für ihre Aktivierung eine Internalisierung des IL-1/IL-1-R1-Komplexes (HOFMEISTER et al., 1997). Die N-SMase ist unabhängig von der Internalisierung aktivierbar.

Die Bedeutung der $TNF\alpha$ - und IL-1-Signaltransduktion für die Wundheilung nach einer traumatischen Verletzung ist bislang noch nicht hinreichend geklärt. Untersuchungen an oberflächlichen Wunden TNF-R1-, IL-1-R1- und TNF-R1/IL-1-R1-defizienter Mäuse geben Hinweise darauf, daß beide Signaltransduktionswege in Differenzierungsprozesse der Haut eingebunden sind (JENSEN et al., 1998 und 1999). Die Funktion der neutralen und sauren Sphingomyelinase in beiden Signalkaskaden ist ebenfalls nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen an Mäusen mit einer Defizienz des Adapterproteins FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation), das für die Aktivierung der N-SMase über den TNF-R1 benötigt wird, weisen auf eine Beteiligung der N-SMase an der Regenerierung einer gestörten Hautbarriere hin (KREDER et al., 1999).

Durch eine tiefere Schädigung der Haut werden neben der Differenzierung auch solche Prozesse in Gang gesetzt, die die Hautneubildung induzieren. Das Zusammenspiel dieser Vorgänge ist entscheidend für eine rasche und störungsfreie Heilung. Die Aufklärung der Funktion der proinflammatorischen Signalkaskaden in der Wundheilung und die Rolle der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Heilungsprozeß liegen dem Thema der vorliegenden Arbeit zugrunde.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an genetisch unveränderten (Wildtyp) und an transgenen Mäusen vorgenommen. Einsatz fanden ausschließlich männliche Tiere in einem Alter von sechs bis zwölf Wochen.

Grundlegende Untersuchungen zum Verständnis der Wundheilung wurden an nicht transgenen, haarlosen Mäusen des Stammes Crl:SKH-1-HR¹ durchgeführt, die über die deutsche Niederlassung der amerikanischen Firma Charles River Wiga GmbH aus Sulzfeld in Bayern bezogen wurden. Weiterführende Fragestellungen wurden anhand homozygoter, genetisch veränderter (transgener) Mauslinien untersucht. Transgene Mäuse für den Zytokin-Rezeptor TNF-R1² (*Tnfrs1a*^{tm1Imx3}; TNF-R55; TNF-p55-R) und das TNF-R1 Adapterprotein FAN⁴ wurden freundlicherweise vom Institut für Immunologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verfügung gestellt. Außerdem ermöglichte das Institut für Zell- und Immunbiologie der Haut der Universität Münster die Bereitstellung A-SMase⁵ defizienter Mäuse. Weitere Untersuchungen erfolgten an transgenen Mäusen für den Zytokin-Rezeptor IL-1-R1⁶ (*Il1r1*^{tm1Imx}) und an für beide Zytokin-Rezeptoren (TNF-R1 und IL-1-R1) doppeltransgenen Mäusen, TNF-R1/IL-1-R1 (*Tnfrs1a*^{tm1Imx}*Il1r1*^{tm1Imx}). Diese Mäuse wurden von The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA bezogen. Alle transgenen Mausmodelle wurden auf dem Mausstamm C57Bl/6⁷ gezüchtet. Bei C57Bl/6 handelt es sich um einen behaarten Mauswildtyp. In den Versuchen mit transgenen Mäusen wurden deshalb genetisch nicht veränderte Mäuse dieses Stammes als Kontrolle verwendet. Die Kontrolltiere wurden vom Institut für Immunologie zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse wurden einzeln in transparenten Käfigen aus Polycarbonat (220 · 160 · 140 mm³) mit einer Drahtabdeckung aus rostfreiem Edelstahl⁸ gehalten. Der Boden der Käfige war mit

¹ Crl:SKH-1HR, haarlose Wildtyp-Maus

² TNF-R1, Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor1

³ Kursivgeschriebene Nomenklatur nach The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA

⁴ FAN, Faktor zur Aktivierung der N-SMase

⁵ A-SMase, saure Sphingomyelinase

⁶ IL-1-R1, Interleukin-1-Rezeptor1

⁷ C57Bl/6, dunkelhaarige Wildtyp-Maus

⁸ Bayer-Makrolon Typ 2, Ebeco GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland

handelsüblicher Kleintierstreu⁹ bedeckt. Als Versteck für die Tiere dienten Papprollen oder grober Zellstoff. Während der Versuchsphasen wurde die Holzeinstreu gegen fusselfreien Zellstoff ausgetauscht, um eine Verunreinigung der Wunden durch Holzspäne zu vermeiden. Die Mäuse wurden mit einer speziellen Maus- und Rattendiät^{10,11} gefüttert. Futter und Wasser wurden ad libitum angeboten. Die Tiere wurden bei Raumtemperatur mit künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus von zwölf Stunden gehalten.

Die Versuche waren durch die Tierschutzkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt worden.

2.2 Untersuchungen von Vollhautwunden an haarlosen Wildtyp-Mäusen

2.2.1 Einfluß okklusiver und nicht okklusiver Wundabdeckungen auf verschiedene Heilungsparameter

Während der Wundheilung laufen eine Reihe biologischer Prozesse ab, die schließlich zur Abheilung einer Verletzung führen. Nach MARTIN (1997) sowie SINGER et al. (1999) sind als Vorgänge während der Heilung einer äußeren Verwundung vor allem die Geweberegeneration, die Zellmigration und die Kontraktion des Wundrandepithels zu nennen. Seit einigen Jahren werden in der Humanmedizin verschieden durchlässige (semiokklusive) Folien in der Wundversorgung eingesetzt, deren Wirkmechanismen nur teilweise bekannt sind. Wie eine okklusive oder semiokklusive Folie die Abheilung einer Vollhautwunde beeinflusst, wurde anhand normaler, haarloser Mäuse untersucht. Als Kontrolle dienten Mäuse, die ohne Wundverband gehalten wurden. Pro Gruppe wurden jeweils fünf Tiere untersucht.

2.2.1.1 Narkotisierung und Sektion der Versuchstiere

Saugfähiger Zellstoff wurde in ein verschließbares Glasgefäß gegeben und mit ein bis zwei Millilitern Forene^{®12} getränkt. Da dieses Isofluran leicht flüchtig ist, bildet sich im geschlossenen Glasgefäß eine mit Forene[®] gesättigte Atmosphäre aus. Die Mäuse wurden

⁹ Tiereinstreu Granulat, Altromin GmbH und Co KG, Lage-Lippe, Deutschland

¹⁰ V1534, SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland

¹¹ Zusammensetzung: 25 % Rohprotein,
5,8 % Rohfett,
3,7 % Rohfaser,
6,7 % Rohasche sowie
Vitamin A, D₃, E und Cu₅

¹² Forene[®] Isofluran, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland

einzelnen in das Gefäß gesperrt, bis sie nach wenigen Minuten, erkennbar an verlangsamten Bewegungen, narkotisiert waren. Anschließend wurden die Tiere aus dem Behälter genommen. Damit die Tiere während der nachfolgenden Behandlungen bzw. Untersuchungen nicht frühzeitig aus der Narkose erwachten, wurden sie nach Bedarf weiterhin einer Forene[®]-Atmosphäre ausgesetzt. Dazu diente ein Pyrex-Röhrchen, das einen mit Isofluran beträufelten Zellstoff enthielt und dem betäubten Tier vor die Atemwege gehalten wurde.

Mit einem wasserfesten Stift und einer Schablone wurde auf eine Flanke der betäubten Mäuse eine kreisförmige Markierung mit einem Durchmesser von 20 Millimetern aufgebracht. Die Haut wurde entlang dieser Markierung bis zur darunterliegenden Muskelfaszies exzidiert.

2.2.1.2 Präparation der Verbände und Wundversorgung

Von puderfreien Latexhandschuhen wurden die Daumen abgeschnitten und als okklusiver Verband¹³ eingesetzt. Von den Latexdaumen wurden die Kuppen abgetrennt und außerdem vier kleine Öffnungen in den so nach zwei Seiten offenen Latexschlauch geschnitten. Der Latexschlauch wurde über den Mauskörper gezogen, so daß der Kopf und das Hinterteil des Tieres unbedeckt waren. Die Pfoten der Maus wurden durch die Öffnungen gesteckt. Dadurch lag der Latexverband dicht auf der verwundeten Flanke auf, und die Maus behielt weiterhin ihre Bewegungsfreiheit, ohne jedoch den Verband abstreifen zu können (siehe Abb. 1).

Die semiokklusive Folie¹⁴, die im Gegensatz zur okklusiven Folie wasserdampfdurchlässig war, wurde in quadratische Stücke von 25 · 25 mm Kantenlänge geschnitten. Diese Stücke wurden auf die Wunden aufgelegt. Ein Klebeband¹⁵ wurde auf die obere Kante der Folie geklebt, über die nicht verletzte Flanke und die Ventralseite des Tieres geführt und auf der gegenüberliegenden Folienkante wieder befestigt. Dünne Klebestreifen, die zusätzlich auf den seitlichen Folienrändern angebracht wurden, verhinderten ein Verrutschen des Verbandes entlang der Körperachse. Beim Anlegen des Klebebandes wurde darauf geachtet, daß das Wundareal allein von der semiokklusiven Folie bedeckt war. Das Klebeband selbst diente lediglich der Fixierung der semiokklusiven Folie auf der Wundoberfläche (siehe Abb.1).

¹³ Sensi Clean[™] Latexhandschuhe, puderfrei, Ansell Medical Ltd., Surbiton, England

¹⁴ Comfeel[®] Plus, Coloplast GmbH, Hamburg, Deutschland

¹⁵ Durapore[™], 3M Health Care, Borken, Deutschland

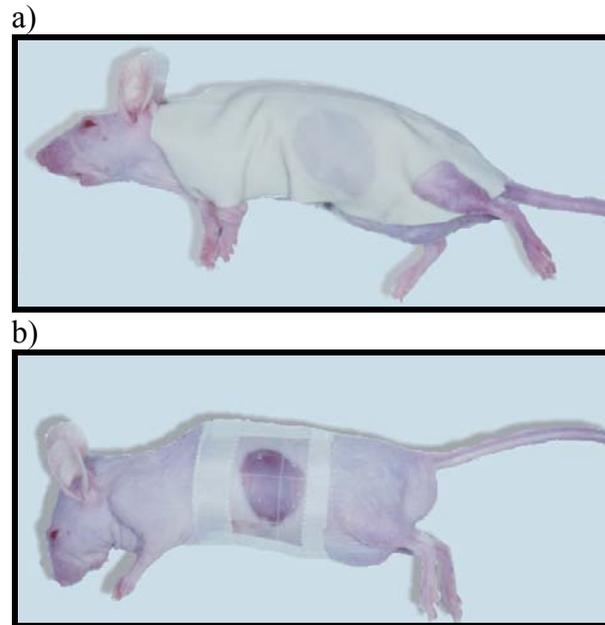


Abb.1: Bild a) zeigt eine nicht transgene, haarlose Maus, deren Wunde mit einer wasserundurchlässigen Latexfolie abgedeckt ist. In b) ist die Wundversorgung mit einer semiokklusiven Folie dargestellt.

2.2.1.3 Dokumentation der Wundheilung, der Wundkontraktion und der Geweberegenerierung

Die Mäuse wurden zweimal täglich auf den korrekten Halt der Verbände hin kontrolliert. Im Rhythmus von zwei bis drei Tagen wurde das Verbandmaterial erneuert und die Wundheilung dokumentiert. Der Versuch wurde so lange fortgeführt, bis alle Wunden sichtbar abgeheilt waren.

Von der verletzten Flanke wurde an den Tagen des Verbandwechsels jeweils eine Fotografie¹⁶ unter standardisierten Bedingungen erstellt. Als Vergleichsmaß für die Größe der fotografierten Wunde diente ein Lineal, das zusammen mit der Maus abgelichtet wurde. Die Diapositive wurden anschließend mit Hilfe eines Scanners¹⁷ digitalisiert. Der Grad der Wundheilung sowie der Anteil der Wundkontraktion und der Epithelneubildung am Heilungsprozeß konnten dann computergestützt ermittelt werden. Die Wundheilung wurde in Relation zur Wundfläche zu Versuchsbeginn betrachtet (siehe Abb. 2). Die relative Wundheilung wurde anhand der Wundkontraktion und der Reepithelialisierung prozentual

¹⁶ Kamera Nikon N70 mit Speedlight SB-23 Blitzlichtaufsatz, Blende 8;
Film Agfa RSX II 50/18°

¹⁷ SprintScan 35, Polaroid, Offenbach, Deutschland

bestimmt. Die planimetrischen Berechnungen erfolgten mit den Programmen TINA 2.09g^{®18} und Excel 2000 von Microsoft.

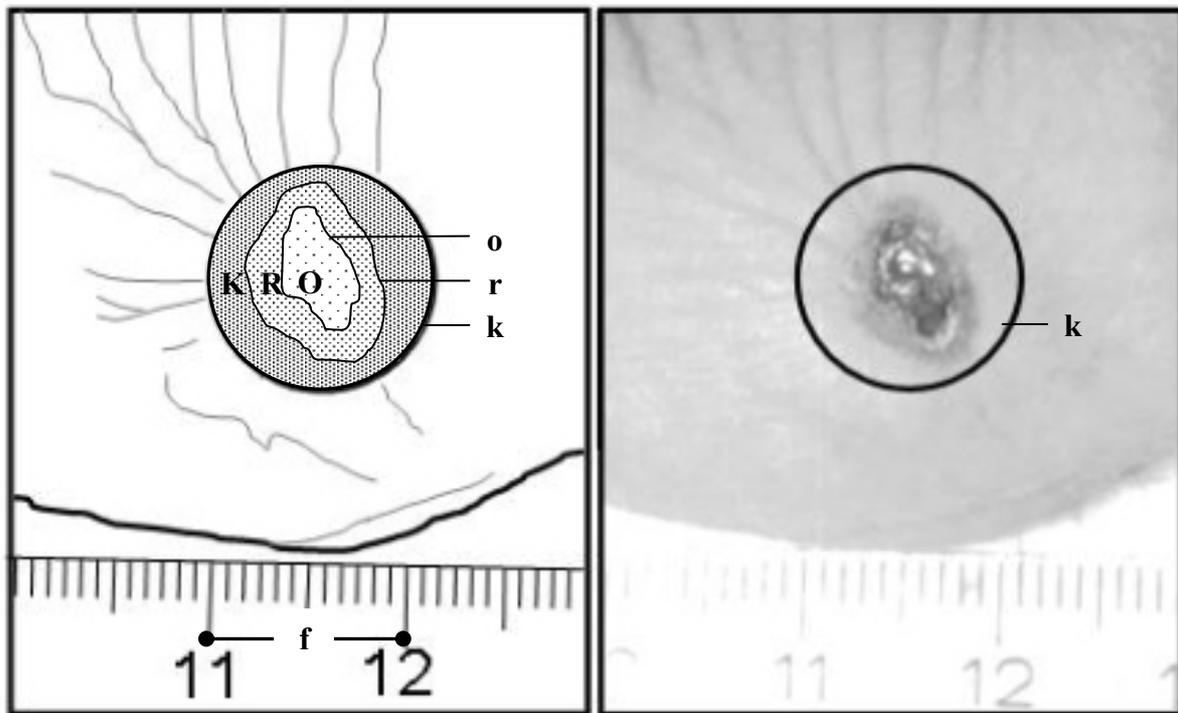


Abb. 2: Darstellung einer sieben Tage alten Verletzung. Im linken Schema sind die Berechnungsgrößen für die einzelnen Wundheilungsparameter illustriert. **f** Linealabschnitt von 10 mm Länge; **K** Fläche der Wundkontraktion, **R** Fläche der Reepithelialisierung und **O** offene Wundfläche am jeweiligen Untersuchungstag. Die Linien **o**, **r** und **k** bezeichnen die Begrenzungslinien der einzelnen Wundareale. **k** grenzt außerdem die Fläche der ursprünglich gesetzten Wunde ein. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Berechnung der Wundheilungsparameter:

a) Ermittlung des Vergleichsmaßes (F):

Da die Fotografien freihändig angefertigt worden waren, konnten die einzelnen Diapositive bzw. deren digitalisierte Computerabbildungen hinsichtlich ihrer Vergrößerung leicht voneinander abweichen. Bevor deshalb die verschiedenen Heilungsparameter in Relation zu der Ausgangssituation der Wunde betrachtet werden konnten, mußten sämtliche auf dem Computer berechneten Werte mit einem Faktor (F) korrigiert werden. Auf dem in jedem Bild zusätzlich abgelichteten Lineal wurde mit Hilfe von TINA 2.09g[®] die Strecke (f) von real zehn Millimetern nachgezeichnet (siehe Abb. 2). Das Programm ermittelte daraus die Länge auf dem Computerbild, die real einem Zentimeter entsprach.

¹⁸ TINA 2.09g[®], Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland

Die berechnete Länge wurde quadriert und zu einer Fläche von $10 \cdot 10 \text{ mm}^2$ Kantenlänge in Beziehung gesetzt. Aus der nachfolgenden Formel ergab sich das Vergleichsmaß (F) für die einzelnen Heilungsparameter je Untersuchungstag und Fotografie:

$$F = \frac{(10 \cdot 10)}{(f \cdot f)} \left[\frac{\text{mm}^2}{\text{mm}^2} \right]$$

- f: Strecke im digitalisierten Bild, die real zehn Millimetern entspricht
- F: Vergleichsmaß für die Umrechnung der Bildflächen in Realmaße

Neben F sind für die Berechnung der Heilungsparameter außerdem noch die Größen der Flächen zu ermitteln, die durch die Linien o, r und k in Abbildung 2 markiert sind:

- k: schließt alle drei Flächen (K, R und O) ein;
- r: schließt die Flächen (R und O) ein und
- o: begrenzt die offene Wundfläche (O).

b) Berechnung der realen Wundgröße (O_r):

Als Wundgröße (O_r) wurde der Bereich der offenen Wundfläche definiert, der am jeweiligen Untersuchungstag festzustellen war. Unter Zuhilfenahme von TINA 2.09g[®] wurde auf den digitalisierten Bildern mit dem Cursor eine Begrenzungslinie (o) um den offenen Wundbereich (O) nachgezogen, dessen Fläche (in mm^2) dann computergestützt berechnet wurde (siehe Abb. 2). Nach Multiplikation mit dem Faktor (F) ergab sich hieraus die tatsächliche Größe der offenen Wunde (O_r) am jeweiligen Untersuchungstag:

$$O_r [\text{mm}^2] = F \cdot O [\text{mm}^2]$$

- F: Vergleichsmaß für die Umrechnung der Bildflächen in Realmaße
- O: offene Wundfläche am Untersuchungstag im digitalisierten Bild (in mm^2)
- O_r : reale offene Wundfläche am Untersuchungstag (in mm^2)

Um auf den Grad der relativen Wundheilung (W_r) schließen zu können, wurde die Wundgröße am jeweiligen Untersuchungstag (O_r) in Relation zur ursprünglichen Wundgröße (O_0) gesetzt. Die Fläche der anfänglich gesetzten Verletzung ist in Abbildung 2 durch die

Linie k begrenzt. Aus den Meßwerten O_0 und O_r errechnete sich der relative Grad der Wundheilung am jeweiligen Untersuchungstag nach folgender Formel:

$$W_r [\%] = \frac{(O_0 - O_r) \cdot 100}{O_0} \left[\frac{\text{mm}^2 \cdot \%}{\text{mm}^2} \right]$$

- O_0 : reale offene Wundfläche zu Versuchsbeginn (in mm^2)
 O_r : reale offene Wundfläche am Untersuchungstag (in mm^2)
 W_r : relative Wundheilung am Untersuchungstag (in %)

c) Berechnung der relativen Wundkontraktion (WK_r):

Die Wundheilung ist zu einem Teil auf eine Kontraktion des Wundrandes zum anderen auf eine Reepithelialisierung zurückzuführen. Die Bezugsgröße für die relative Wundkontraktion (WK_r) war wiederum die ursprüngliche Wundfläche (O_0) (vergleiche Abb. 2). Um die Fläche der Wundkontraktion im Bild zu ermitteln, mußten von der durch Umfahren der Linie k errechneten Gesamtfläche der gesetzten Wunde (K, R und O) die Flächen R und O abgezogen werden. Durch Umfahren der Linie r wurde die Summe der Flächen von R und O bestimmt.

Mit Hilfe des Vergleichsmaßes (F) mußten die mit dem Computer ermittelten Flächen zunächst auf die realen Größen umgerechnet werden:

$$(R_r + O_r)[\text{mm}^2] = F \cdot (R + O)[\text{mm}^2]$$

$$K_r[\text{mm}^2] = O_0 - (R_r + O_r)[\text{mm}^2]$$

- F: Vergleichsmaß für die Umrechnung der Bildflächen in Realmaße
 K_r : reale Fläche der Wundkontraktion am Untersuchungstag (in mm^2)
O: offene Wundfläche am Untersuchungstag im digitalisierten Bild (in mm^2)
 O_0 : reale offene Wundfläche zu Versuchsbeginn (in mm^2)
 O_r : reale offene Wundfläche am Untersuchungstag (in mm^2)
R: Fläche der Reepithelialisierung am Untersuchungstag im digitalisierten Bild (in mm^2)
 R_r : reale Fläche der Reepithelialisierung am Untersuchungstag (in mm^2)

Die relative Wundkontraktion an den Untersuchungstagen wurde folgendermaßen bestimmt:

$$WK_r [\%] = \frac{K_r \cdot 100}{O_0} \left[\frac{\text{mm}^2 \cdot \%}{\text{mm}^2} \right]$$

- K_r : reale Fläche der Wundkontraktion am Untersuchungstag (in mm^2)
 O_0 : reale offene Wundfläche zu Versuchsbeginn (in mm^2)
 WK_r : relative Wundkontraktion am Untersuchungstag (in %)

d) Berechnung der relativen Reepithelialisierung (RE_r):

An der Heilung ist außer der Wundkontraktion auch eine Hautregenerierung beteiligt. Zur Ermittlung der relativen Reepithelialisierung (RE_r) diente wiederum die ursprüngliche Wundfläche (O_0) als Bezugsgröße. Die reale abgeheilte Wundfläche, die am jeweiligen Untersuchungstag aus einer Gewebeneubildung resultierte, ließ sich aus den bereits berechneten Flächen, O_0 , O_r und K_r , ermitteln. Sie wurde folgendermaßen bestimmt:

$$R_r [\text{mm}^2] = O_0 - (K_r + O_r) [\text{mm}^2]$$

- K_r : reale Fläche der Wundkontraktion am Untersuchungstag (in mm^2)
 O_0 : reale offene Wundfläche zu Versuchsbeginn (in mm^2)
 O_r : reale offene Wundfläche am Untersuchungstag (in mm^2)
 R_r : reale Fläche der Reepithelialisierung am Untersuchungstag (in mm^2)

Aus der realen Fläche der Reepithelialisierung (R_r) am jeweiligen Untersuchungstag wurde schließlich die entsprechende relative Reepithelialisierung (RE_r) ermittelt:

$$RE_r [\%] = \frac{R_r \cdot 100}{O_0} \left[\frac{\text{mm}^2 \cdot \%}{\text{mm}^2} \right]$$

- O_0 : reale offene Wundfläche zu Versuchsbeginn (in mm^2)
 R_r : reale Fläche der Reepithelialisierung am Untersuchungstag (in mm^2)
 RE_r : relative Reepithelialisierung am Untersuchungstag (in %)

2.2.1.4 Dokumentation der Zellmigration

Eine wichtige Funktion an der Heilung von Hautverletzungen wird der Zellmigration zugesprochen, bei der epidermale Zellen von den marginalen Bereichen in die Wunde

einwandern (SINGER et al., 1999). Welchen Einfluß verschiedene Verbandmaterialien auf das Wanderungsverhalten der Epidermiszellen ausüben, wurde an den Wundrändern zu einem frühen, mittleren und späten Zeitpunkt (drei, sechs und zwölf Tage nach Verletzung) der Wundheilung untersucht.

An den Untersuchungstagen wurden die Mäuse, die entweder mit einem Latex- oder Comfeelverband behandelt worden waren, ebenso wie die Kontrolltiere getötet (vgl. 2.2.2) und die Wundränder in einer Breite von drei bis vier Millimetern entnommen. Bis zur weiteren Analyse wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Als Nachweis migrierender Keratinozyten wurde die Expression von STAT-3¹⁹ in den Wundrändern untersucht. Der „signaltransduktions- und transkriptionsaktivierende Faktor“, STAT-3, reguliert in aktivierter Form als phosphoryliertes Dimer unter anderem die Bewegung von Leukozyten, Keratinozyten und weiteren epidermalen Zelltypen (SANO et al., 1999; HIRANO et al., 2000; KIRA et al., 2002). Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Phospho-STAT-3 konnte dieser Faktor als Markerprotein in der Westernblot-Technik (vgl. 2.2.5.2) für migrierende Keratinozyten eingesetzt werden.

Abweichend von der unter 2.2.2.1 ff. aufgeführten Gewebeaufbereitung wurde die Haut über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einmolarer Kochsalzlösung²⁰ inkubiert. Im Anschluß an diese Behandlung ließ sich die Epidermis mit Hilfe einer Hakenpinzette und einem Skalpell leicht von der Dermis abtrennen. Die separierte Epidermis wurde bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff verwahrt. Für die Homogenisierung wurden $200\text{ }\mu\text{l}$ H-Puffer (siehe 2.2.5.2) in ein Homogenisierungsgefäß vorgelegt. Nach der Gewebeaufbereitung ließen sich am Glasstempel anhaftende Gewebebestandteile mit weiteren $100\text{ }\mu\text{l}$ des H-Puffers herunterspülen und in $1,5\text{ ml}$ Eppendorfreaktionsgefäße überführen.

STAT-3 liegt in seiner aktivierten, phosphorylierten Form hauptsächlich in den Nucleii der Zellen vor, wo dieser Faktor an Transkriptionsvorgängen beteiligt ist. Deshalb mußte im Anschluß an die Gewebhomogenisierung speziell die Zellkernmembran aufgebrochen werden, um Phospho-STAT-3 freizusetzen. In den Deckel eines 40 ml -Falconröhrchens wurde dazu eine kreisförmige Öffnung entsprechend der Größe eines

¹⁹ STAT-3, „Signal Transducer and Activator of Transcription“-3

²⁰ NaCl 1.06404, Merck, Darmstadt, Deutschland

Eppendorfreaktionsgefäßes geschnitten. Das Röhrchen wurde mit Eiswasser gefüllt und durch den präparierten Deckel das Reaktionsgefäß eingesetzt. Die Kernmembranen in den Gewebehomogenaten konnten so mit einer bis zum Boden des Reaktionsgefäßes eingeführten Ultraschallsonde²¹ bei permanenter Wärmeabführung für 150 Sekunden und mittlerer Geräteleistung aufgebrochen werden, ohne daß das Phospho-STAT-3 dauerhaft geschädigt wurde. Anfallende Zelltrümmer wurden nach der Ultraschallung durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 4 °C und 11400 Um-drehungen pro Minute entfernt. Der Proteingehalt der zellfreien Überstände wurde mit der BCA-Methode ermittelt (siehe 2.2.2.3).

In der Gelelektrophorese wurden Volumina aus den Epidermisextrakten mit 35 µg Gesamtproteingehalt eingesetzt, die mit H-Puffer ad 30 Mikroliter aufgestockt wurden. Das Trenngel hatte einen zehnprozentigen Anteil an Acrylamid/Bisacrylamid (nähere Erläuterungen siehe 2.2.5.2). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das unter 2.2.5.2 erläuterte Westernblot-Verfahren angewendet. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation der Nitrozellulose-membran in TBST-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.2.5.2) mit einem Magermilchpulver-Anteil von fünf Prozent für sechzig Minuten bei Raumtemperatur und leichter Schwenkbewegung auf einem Horizontalschüttler reduziert. Direkt danach wurde die Membran in TBS-Puffer (siehe 2.2.5.2) überführt, der neben fünfprozentigem Milchpulver den Erstantikörper, Anti-Phospho-STAT-3²² in einem Mischungsverhältnis von 1:500 (v/v) enthielt. Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht bei 4 °C und ständiger Rotationsbewegung inkubiert. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die Membran dreimalig fünf Minuten in TBST-Puffer bei Raumtemperatur unter Schwenkbewegung gewaschen. Die zweite Antikörperlösung bestand aus einem Peroxidase-gekoppelten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper²³, der 1:1000 in TBST-Puffer (v/v) verdünnt worden war. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur und leichter Schwenkbewegung wurde die Membran erneut dreifach gespült. Der ebenfalls Peroxidase-gekoppelte Streptomycin-Avidin-Biotin-Complex²⁴ sollte den Nachweis von Phospho-STAT-3 verstärken. Die Membran wurde daher einer „Complex“-TBST-Pufferlösung (1:100, v/v) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur und temperatur und Schwenkbewegung ausgesetzt. Nachdem das nicht gebundene Material durch Spülen der Nitrozellulosemembran in TBST- und TBS-Puffer

²¹ Ultraschallsonde UW 70 mit Spannungsgerät Sonopus GM 70, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland

²² Anti-Phospho-STAT3 (Ser 727) 07-308, Upstate, Hamburg, Deutschland

²³ Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper DIA 111-035-045, Dianova, Hamburg, Deutschland

entfernt worden war, wurde das Phospho-STAT-3 Protein mit Hilfe des „ECLTM-Western blotting detection system“ und der üblichen Vorgehensweise nachgewiesen (nähere Erläuterungen siehe 2.2.5.2).

2.2.2 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase in verschiedenen Stadien der Wundheilung

Die einzelnen Stadien der Wundheilung können anhand sukzessiv entstehender Gewebetypen des Wundareals voneinander unterschieden werden (SINGER & CLARK, 1999). Mit dem Fibrin (Entzündungsphase), dem Granulationsgewebe (Phase der Gewebeneubildung) sowie dem neugebildeten Epithel und dem Wundrand (Reepithelialisierungsphase) wurden drei Phasen der Wundheilung auf eine Sphingomyelinase-Aktivität untersucht. Sphingomyelinasen spielen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von TNF α und IL-1 (JENSEN et al., 1999). Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe einer modifizierten Methode des „Mizellen-Assays“ nach QUINTERN & SANDHOFF (1991) bestimmt. Die Mäuse wurden, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, verletzt und die Wunden mit einer semiokklusiven Folie vor Verunreinigungen geschützt (siehe 2.2.1.2). Vor der Gewebeentnahme wurden die Mäuse mit Forene[®] betäubt und durch cervikale Dislokation getötet. Pro Stichprobe wurden zwölf bis zwanzig Tiere untersucht. Als Kontrolle diente die Epidermis von unverletzten Tieren.

Drei bis vier Tage nach Verwundung der Tiere bildete sich auf dem Wundfeld ein gelblicher Fibrinbelag aus. Dieser wurde vorsichtig mit einem Skalpell abgeschabt, sein Frischgewicht bestimmt und dann in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Granulation, erkennbar an der netzartigen Struktur des Wundgrundes, setzte am vierten Tag nach der Verwundung ein. Das Granulationsgewebe wurde mit Hilfe einer Hakenpinzette und eines Skalpells aus der Wunde herausgetrennt, ebenfalls gewogen und in Reaktionsgefäßen gelagert. Nach zwölf bis vierzehn Tagen heilten die Wunden ab. Zu diesem Zeitpunkt wurde das neugebildete Epithel auf dieselbe Weise gewonnen. Gleichzeitig wurde der Wundrand in einer Breite von drei bis vier Millimetern ausgeschnitten. Die neue Epidermis ließ sich dabei klar durch eine dunklere Färbung vom Wundrand abgrenzen. Alle Proben wurden sofort nach Entnahme bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei - 80 °C gelagert.

²⁴ StreptABCComplex HRP, DAKO Diagnostica, Hamburg, Deutschland

2.2.2.1 Separation der Epidermis von subcutanem Fettgewebe und der Unterhaut

Die Hautproben wurden zunächst auf Raumtemperatur erwärmt. Die aufgetauten Proben wurden dann mit der epidermalen Seite auf dem Deckel einer Petrischale ausgebreitet. Mit einer Hakenpinzette wurde die Haut am Rand fixiert, damit unter Zuhilfenahme eines Skalpells das Unterhautfettgewebe abgeschabt werden konnte. Anschließend wurde die Haut in eine Petrischale überführt, die mit drei bis vier Millilitern PBS-Puffer (s. u.) befüllt war. Die epidermale Seite wurde dabei zum Schalenboden orientiert. Die Proben wurden so für vierzig Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Entnahme der Haut aus dem Puffer wurde diese auf Zellstoff leicht trocken getupft. Danach wurde die Hautprobe erneut auf einen Petrischalendeckel ausgebreitet. Diesmal wurde die Epidermis für die Bearbeitung von dem Deckel abgewandt zurechtgelegt. Mit dem Skalpell und der Hakenpinzette wurde die Epidermis von der Dermis separiert. Die Epidermis wurde nochmals auf fusselfreiem Zellstoff getrocknet, um den restlichen Puffer zu entfernen. Mit einer Analysenwaage²⁵ wurde das Frischgewicht der Epidermis ermittelt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die Epidermis in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei - 80 °C gelagert.

Zusammensetzung des PBS-Puffers (Phosphate-buffered-saline, pH 7,4) in H₂O_{bidest}:

EDTA:	10 mmol · l ⁻¹	Merck 8418
NaCl:	140 mmol · l ⁻¹	Merck 1.06404
Na ₂ H ₂ PO ₄ · H ₂ O:	6,0 mmol · l ⁻¹	Merck 6580
KCl:	3,0 mmol · l ⁻¹	Merck 1.04936
KH ₂ PO ₄ :	1,4 mmol · l ⁻¹	Merck 1.04873

Der Puffer wird in H₂O_{bidest} angesetzt und ist bei 4 °C längere Zeit lagerungsfähig.

2.2.2.2 Homogenisieren der Gewebeproben

Die Proben wurden mit Hilfe von Glashomogenisatoren und -stempeln²⁶ mechanisch zerkleinert. Bei einer Gewebeeinwaage von weniger als 15 mg Frischgewicht wurden 200 µl Extraktionspuffer (Seite 20 und 21) im Homogenisierungsgefäß vorgelegt. Bei höheren Einwaagen wurde das Puffervolumen verdoppelt. Die Homogenisierung erfolgte unter Kühlung

²⁵ KERN® 870-13, Kern & Sohn, Albstadt, Deutschland

²⁶ Homogenisatorgefäß 2ml 854 195/7, Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland

in einem mit Eiswasser gefüllten Behälter. Die Puffer waren zuvor in Eis heruntergekühlt worden. Die Proben selbst wurden erst kurz vor der Homogenisierung aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in die Glashomogenisatoren überführt. Die Extraktion erfolgte durch Rotation des Glasstempels²⁷ mit 600 Umdrehungen pro Minute, wobei der Stempel vorsichtig in den Homogenisatoren auf und ab bewegt wurde. Die Aufarbeitung wurde solange durchgeführt, bis keine Gewebefragmente mehr erkennbar waren. Anschließend wurden die Homogenate in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und in Eis gestellt. In einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge wurden die Homogenate zehn Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, um die unlöslichen Gewebekomponenten zu entfernen. Die Überstände wurden abpipettiert und die sedimentierten Gewebepellets verworfen. Bis zur weiteren Verarbeitung konnten die Überstände in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei - 80 °C gelagert werden.

Zusammensetzung des Extraktionspuffers der A-SMase (pH 6,8) in H₂O_{bidest}:

Triton-X-100:	0,2 %	Merck 1.08603
---------------	-------	---------------

Der Puffer wird in H₂O_{bidest} angesetzt und ist bei 4 °C längere Zeit lagerungsfähig.

²⁷ Potter S Homogenisator-Antrieb, Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland

Zusammensetzung des Extraktionspuffers der N-SMase (pH 7,0)²⁸ in H₂O_{bidest}:

Antipain:	1 mmol · l ⁻¹	Fluka 10791
ATP:	0,75 mmol · l ⁻¹	Sigma A-6419
β-Glycerol- Phosphat:	10 mmol · l ⁻¹	Sigma G-6251
EDTA:	2 mmol · l ⁻¹	Merck 8418
Hepes:	20 mmol · l ⁻¹	Merck 1.0110
Leupeptin:	1 mmol · l ⁻¹	Sigma L-0649
MgCl ₂ · 6 H ₂ O:	10 mmol · l ⁻¹	Merck 1.05833
NaF:	10 mmol · l ⁻¹	Merck 1.06449
Na ₃ VO ₄ :	0,1 mmol · l ⁻¹	ICN Biomedical Inc. 159664
Nonidet-P40:	0,2 %	Sigma N-3268
Pepstatin A:	1 mmol · l ⁻¹	Fluka 77170
PMSF:	1 mmol · l ⁻¹	Sigma P-7626
p-Nitrophenyl- Phosphat:	30 mmol · l ⁻¹	Sigma N-3254

Der Puffer wird in H₂O_{bidest} angesetzt und ist maximal zwei Stunden haltbar.

2.2.2.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Gehalt an wasserlöslichem Protein wurde als vergleichende Bezugsgröße der Probenextrakte gewählt. Die Proteinmenge wurde mit Hilfe der BCA-Methode²⁹ anhand einer Standardreihe aus Rinderserumalbumin (BSA, Bovine Serum Albumin)³⁰ quantifiziert (BROWN et al., 1989). Das Meßprinzip beruht auf der Reduktion von Kupferionen durch Bicinchonin-säure unter alkalischen Bedingungen. Komplexbildungen mit den Peptidbindungen der Proteine bewirken dabei eine blauviolette Farbreaktion, deren Intensität bei 562 nm Wellenlänge photometrisch ermittelt werden kann. Die Farbreaktion wurde mit einer Inkubationszeit von vierzig Minuten bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion ist empfindlich auf Reduktionsmittel, weshalb solche Substanzen erst nach der Proteinbestimmung zu den Probenextrakten zugefügt werden dürfen. Zu den Extrakten für die

²⁸ Die Angaben entsprechen den Endkonzentrationen im Reaktionsansatz.

²⁹ BCA-Kit, Pierce, Illinois, USA

³⁰ BSA A-7030, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Die Standardreihe, 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 mg BSA · ml⁻¹, wurde in H₂O_{bidest} angesetzt und ist bei 4 °C lagerungsfähig.

funktionelle Gruppe, die dem Molekül einen hydrophilen Charakter verleiht. Es ist dadurch gut in Wasser und weniger gut in organischen Lösungsmitteln löslich. Durch eine radioaktive Markierung der Methylreste, ($^{14}\text{CH}_3$ -), im Cholin läßt sich die Umsatzrate der Sphingomyelinase pro Zeiteinheit mit Hilfe eines β -Counters³² bestimmen, nachdem die nicht umgesetzten Edukte von den Produkten aus dem Reaktionsansatz getrennt wurden.

Für die Aktivitätsbestimmung der Sphingomyelinase wurde eine Menge von 20 μg Protein pro Gewebeextrakt eingesetzt, dessen Volumen sich aus der Proteinbestimmung ergab (siehe 2.2.2.3 und 2.2.2.4). Die Probenvolumina wurden in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 20 μl aufgestockt und bis zum Reaktionsbeginn auf Eis gekühlt. Als Blindwert dienten 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$. Jeder Ansatz wurde zweifach bestimmt. Als Substrat wurde [N-Methyl- ^{14}C]-Sphingomyelin³³ verwendet. In jedem Reaktionsansatz wurden 2,25 μl Sphingomyelin eingesetzt, so daß das Substrat im Überschuß angeboten wurde.

Das radioaktiv markierte Sphingomyelin wird von Amersham in Toluol-Ethanol gelöst angeboten. Da Alkene und Alkohole die Enzymtätigkeit beeinträchtigen können, wurde zunächst das Toluol-Ethanol-Gemisch aus dem benötigten Volumen, in dem das ^{14}C -Sphingomyelin gelöst ist, durch einen schwachen Stickstoffstrom vollständig ausgetrieben. Das eingeeengte ^{14}C -Sphingomyelin wurde dann in einem entsprechend der Probenanzahl benötigten Menge Reaktionspuffer durch kurzes Schütteln auf einem Probenschüttler³⁴ resuspendiert. Pro Reaktionsansatz wurden 50 μl Puffer benötigt. Nach der Resuspension wurde der Reaktionspuffer für zehn bis fünfzehn Minuten in einem Wasserbad ultrabeschallt. Durch diesen Vorgang bilden sich Mizellen aus, die das Substrat einschließen und so das ^{14}C -Sphingomyelin den Enzymen besser zugänglich machen.

Nachdem jeweils 50 μl des Puffers zu den Probenextrakten pipettiert worden waren, wurden die Reaktionsansätze kurz geschüttelt und einige Sekunden bei 1900 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Gemische wurden für eine Stunde bei 37 °C in einem Wasserbad mit schwacher Schwenkbewegung der Reaktionsgefäße inkubiert. Die Reaktionszeit von einer Stunde wurde in Vorversuchen ermittelt, die zeigten, daß sich die Enzymaktivität in

³² Beckmann 600LL, Beckmann, München, Deutschland

³³ [N-Methyl- ^{14}C]-Sphingomyelin, 925 KBq \cdot ml⁻¹; 2,04 GBq \cdot mmol⁻¹, Amersham, Braunschweig, Deutschland

³⁴ Reax 1R, Heidolph, Kehlheim, Deutschland

diesem Zeitraum linear verhielt. Durch Zugabe von 250 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und 750 μl Chloroform:Methanol-Gemisch (2:1, v/v) ließ sich die Reaktion danach stoppen.

Die Proben wurden kurz auf einem Probenschüttler geschüttelt und vier Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. In den Reaktionsgefäßen bildeten sich zwei Phasen aus. In der oberen, wäßrigen Phase befand sich das umgesetzte ^{14}C -Phosphorylcholin, während in der unteren, organischen Phase das nicht verbrauchte ^{14}C -Sphingomyelin verblieb. Von der wäßrigen Phase wurden vorsichtig 200 μl in vier Milliliter-Scintillationsröhrchen³⁵ überführt und mit vier Millilitern Scintillationscocktail³⁶ aufgefüllt. Nachdem die Röhrchen verschlossen worden waren, wurden die Proben zur Durchmischung geschüttelt.

Im β -Counter wurde die Menge des freigesetzten ^{14}C -Produkts als „counts per minute“ (cpm) ermittelt. Als Berechnungsgrundlage diente die Radioaktivität einer bekannten Stoffmenge (1,04 nmol) des ^{14}C -Sphingomyelins ohne Enzymzusatz, die bei jeder Versuchsreihe gemessen wurde. Die spezifische Enzymaktivität der sauren und neutralen Sphingomyelinase wurde anhand der Meß- und Korrekturwerte, der eingesetzten Proteinmenge sowie der Inkubationszeit berechnet und in $\text{nmol} \cdot \text{Stunde}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein angegeben.

³⁵ Scintillationsgefäß 7063, Skatron GmbH, Norderstedt, Deutschland

³⁶ Aquasafe 300 Plus, Zinsser-Analytik, Frankfurt am Main, Deutschland

Formeln zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität (U)³⁷ der Sphingomyelinasen:

$$U [\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein}] = \frac{(C_P - C_{BL}) \cdot 1,6 \cdot n}{C_R \cdot t \cdot E} \left[\frac{\text{cpm} \cdot \text{nmol}}{\text{cpm} \cdot \text{h} \cdot \text{mg Protein}} \right]$$

C_{BL} : gemessene Radioaktivität des Blindwertes (in cpm)

C_P : gemessene Radioaktivität der Probe (in cpm)

C_R : gemessene Radioaktivität des ¹⁴C-Sphingomyelins ohne Enzymzusatz (in cpm)

E : Proteineinwaage der Probe (in mg)

n : Bekannte Stoffmenge des ¹⁴C-Sphingomyelins, gelöst in Toluol-Ethanol (in nmol)

t : Inkubationszeit (in Stunden h)

1,6: Korrekturfaktor³⁸

2.2.3 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase des Wundrandes im Verlauf der Wundheilung

Es ist bekannt, daß die Epidermis, von den Wundrändern ausgehend, zungenförmig in das Wundbett einwächst und so zum Verschließen der Wunde führt (MARTIN, 1997). Die Epidermis besteht überwiegend aus Keratinozyten, die durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Matrixmetalloproteasen (MMP) zur Migration angeregt werden. Die hohe Aktivität des Wundrandepithels während des Heilungsprozesses wird in histologischen Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbungen indirekt durch eine starke Verdickung der Epidermis deutlich (Abb. 4).

³⁷ Abweichend zum internationalen Standard ist die spezifische Aktivität (U) nicht in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein angegeben.

³⁸ Aus der wäßrigen Phase von 320 μl (20 μl Probenvolumen + 50 μl Assay-Puffer + 250 μl H₂O_{bidest} des Reaktionsstoppvorganges), die das Reaktionsprodukt enthalten, werden nur 200 μl für die Aktivitätsbestimmung der SMasen herangezogen. Die gesamte Umsatzrate der SMasen im Reaktionsansatz ergibt sich daher durch Multiplikation mit dem Faktor 1,6.

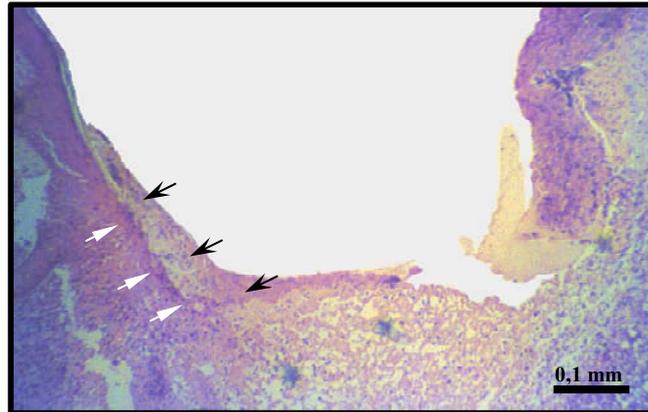


Abb. 4: Querschnitt eines histologischen Maushautpräparates. Die Wundränder (weiße Pfeile) wachsen seitwärts unterhalb des Fibringerinnsels (schwarze Pfeile) in die offene Wunde ein. Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung nach EHRLICH (1886).

Ob und zu welchem Zeitpunkt der Wundheilung die neutrale und saure Sphingomyelinase in diesem Gewebereich aktiv sind, wurde anhand haarloser Mäuse untersucht. Die Tiere wurden wie unter 2.2.1ff behandelt und mit der semiokklusiven Folie, Comfeel, verbunden. Die Wundränder wurden zu einem frühen, einem mittleren und einem späten Zeitpunkt der Wundheilung (drei, sechs und zwölf Tage nach Verletzung) nach cervikaler Dislokation der Mäuse (vgl. 2.2.2) in einer Breite von drei bis vier Millimetern entnommen. Als Kontrolle diente die Epidermis von unbehandelten Mäusen. Es wurden pro Zeitpunkt je zehn bis zwölf Tiere untersucht.

2.2.4 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung haarloser Wildtyp-Mäuse

Während der Wundheilung setzt eine vermehrte Geweberegenerierung ein. Durch mitotische Teilungen werden in dem unverletzten Epithel, das an die Wundfläche angrenzt, und den in die Dermis eingesenkten intakten Haarfollikeln neue Keratinozyten gebildet. An haarlosen Mäusen wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Zellproliferation der unverletzten Epidermis und der Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Wundrand besteht.

Zur Ermittlung der epidermalen Proliferationsrate wird die Interphase, die Phase, in der sich eine Zelle zwischen zwei Kernteilungen (Mitosen) befindet, genutzt. Diese stellt einen wiederkehrenden Intermitosezyklus dar, der wiederum in drei Phasen untergliedert ist. In der G₁-Phase (GAP-1) wird die Zelle für die Zellteilung vorbereitet. In der G₂-Phase (GAP-2) ist das Genom der Zelle bereits verdoppelt, und die Mitose wird eingeleitet. GAP-1 und GAP-2

sind von der Synthese-Phase (S-Phase) unterbrochen, in der die DNS-Replikation erfolgt. In der S-Phase wird die DNS (Desoxyribonukleinsäure) semikonservativ repliziert, wobei an jeweils einen ursprünglichen Einzelstrang der DNS-Doppelhelix ein neuer Strang mit komplementären Basenpaarungen synthetisiert wird. In dieser Phase läßt sich die DNS modifizieren, so daß die proliferierenden Zellen immunhistochemisch angefärbt werden können.

Zur Untersuchung der Proliferation im Wundrand wurde den Mäusen, eine Stunde bevor sie getötet wurden, 2,5 mg 5-Bromo-2'-Deoxyuridin³⁹ (BrdU), gelöst in 500 µl einer isotonischen Kochsalzlösung⁴⁰, intraperitoneal injiziert. 5-Bromo-2'-Deoxyuridin ist ein Thymidin-Analogon, das anstelle des Nukleotids in den Komplementärstrang der mitotisch aktiven Zellen eingebaut wird. BrdU wirkt als antigene Determinante, an die der spezifische, monoklonale Antikörper, Anti- α -Bromodeoxyuridin⁴¹, bindet. Die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe lassen quantitative Aussagen über die Teilungsaktivität des untersuchten Gewebes zu.

Nachdem die Mäuse getötet worden waren, wurden aus den Wundrändern Stücke von einem Zentimeter Länge an der Peripherie zur offenen Wundfläche exzidiert. Die Proben waren anschließend in fünfprozentigem Formaldehyd⁴² über Nacht fixiert und entwässert worden, bevor sie in Paraffin eingebettet wurden. Mit einem Mikrotom⁴³ wurden 3 - 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf mit Poly-L-Lysin⁴⁴ beschichteten Objektträgern aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet wurden.

Für die Beschichtung wurden die Objektträger zunächst zwei Stunden in 95 prozentigem Alkohol entfettet. Dann wurden sie fünf Minuten in eine Poly-L-Lysin-Lösung (1:10 in H₂O_{bidest.} v/v) getaucht und eine Stunde bei 60 °C getrocknet. Die beschichteten Objektträger wurden bei 4 °C gelagert.

Die Objektträger mit den Wundrandsektionen wurden für 20 Minuten bei 60 °C inkubiert, um das an den Schnitten haftende Paraffin zu verflüssigen. Anschließend wurden die Objekte

³⁹ BrdU B-5002, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

⁴⁰ Physiologische Kochsalzlösung SN-881504, 0,9 %, Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

⁴¹ Monoklonaler Anti- α -Bromodeoxyuridin-Antikörper RPN 202, Amersham, Braunschweig, Deutschland

⁴² Formaldehyd 47629, Fluka, Steinheim, Deutschland

⁴³ Jung AG, Heidelberg, Deutschland

zweimal fünf Minuten in Xylol⁴⁵ gespült und so das Paraffin entfernt. Durch Spülen in einer absteigenden Alkoholreihe⁴⁶ und zweimaliges Waschen in H₂O_{bidest} wurden sie anschließend rehydriert. Schließlich wurden die Objekträger mit den Hautpräparaten kurz in isotonischer Kochsalzlösung⁴⁷ und fünf Minuten in Tris-Puffer (s. u.) gespült.

Zusammensetzung des Tris-Puffers (pH 7,4) in isotonischer Kochsalzlösung:

NaCl:	85 mM · l ⁻¹	Merck 1.06404
Tris:	50 mM · l ⁻¹	Merck 1.08382

Die Schnitte wurden mit Hilfe der APAAP-Methode (Alkaline phosphatase antialkaline phosphatase) gefärbt (STERNBERGER, 1979).

Bei dieser Methode handelt es sich um eine unmarkierte Antikörpertechnik, bei der ein löslicher Antigen-Antikörper-Komplex gebildet wird. Dieser besteht aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase, die aus Kälberdarm gewonnen wurde. Sie bilden als Antigene mit einem spezifisch gegen sie gerichteten, monoklonalen Maus-Antikörper diesen Immunkomplex aus. Der Immunkomplex bindet über einen sekundären, sogenannten Brückenantikörper, an den Primärantikörper, Anti- α -Bromodeoxyuridin. Der APAAP-Komplex selbst kann durch ein Chromogen angefärbt und damit sichtbar gemacht werden.

Nachdem die Wundrandpräparate fünf Minuten in Tris-Puffer gespült worden waren, wurde der überschüssige Puffer vorsichtig entfernt, wobei die Proben jedoch nicht gänzlich austrocknen durften. Die mit 5-Bromo-2'-Deoxyuridin modifizierte DNS mußte zunächst für den Erstantikörper zugänglich gemacht werden. Dafür wurden die Paraffinschnitte zwanzig Minuten in eine dreimolare Salzsäure⁴⁸ gestellt, was zur Denaturierung der DNS führte. Die Schnitte wurden dann fünf Minuten in Tris-Puffer gespült. Mit zehnpromutigem Kaninchenserum⁴⁹ (1:10 in Tris-Puffer, v/v) wurden die Paraffinschnitte für dreißig Minuten abgedeckt, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren.

⁴⁴ Poly-L-Lysin P8920, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

⁴⁵ Xylol 1.08681, Merck, Darmstadt, Deutschland

⁴⁶ Ethanol absolut - E. absolut - E. 95 % - E. 70 % 1.00983, Merck, Darmstadt, Deutschland

⁴⁷ Physiologische Kochsalzlösung SN-881504, Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

⁴⁸ Salzsäure 1.13386, Merck, Darmstadt, Deutschland

Hintergrundfärbungen werden durch unspezifische Antigenbindungen des Primärantikörpers ausgelöst.

Das Kaninchenserum wurde durch vorsichtiges Abklopfen des Objektträgers auf einem Fließpapier beseitigt und der Primärantikörper unverdünnt auf die Objekte aufgeträufelt. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde wurde das Anti- α -Bromodeoxyuridin wieder entfernt, die Objektträger kurz in isotonischer Kochsalzlösung und anschließend für 15 Minuten in Tris-Puffer gespült. Der Brückenantikörper wurde ebenfalls unverdünnt mit einer Einwirkungszeit von einer Stunde auf die Paraffinschnitte aufgebracht. Er stammte aus der Immunisierung von Kaninchen gegen Maus-Immunglobulin G (rabbit-anti-mouse IgG) und war, wie die folgenden Substanzen, Bestandteil aus dem „Universal DAKO APAAP Kit Mouse“⁵⁰. Die Schnitte wurden danach gespült und der unverdünnte APAAP-Komplex aufgetragen. Nach einer Stunde wurde der überschüssige Komplex durch einen erneuten Spülvorgang abgewaschen. Die Farbreaktion wurde schließlich durch das Fast-Red-Chromogen aus dem APAAP Kit induziert. Nach einer Inkubationsdauer von 20 Minuten wurden die Wundrandsektionen nochmals für fünf Minuten gespült. Vor der Gegenfärbung mit Hämalaun⁵¹ wurden die Objektträger in H_2O_{bidest} gestellt, um den Tris-Puffer zu entfernen.

Die Gegenfärbung dient dazu, einen stärkeren Kontrast in histologischen Präparaten zu erzielen, damit die eigentliche Färbung besser zu erkennen ist.

Die Schnitte wurden für cirka 15 Sekunden in Hämalaun geschwenkt und anschließend unter lauwarmem, fließendem Leitungswasser für zehn Minuten „gebläut“. Im Anschluß daran wurden die gefärbten Objekte mit Glycergel⁵² eingedeckt und so fixiert.

Zellkerne mitotisch aktiver Zellen wurden rot angefärbt; andere Zellbestandteile und mitotisch inaktive Kerne zeigten in Folge der Gegenfärbung ein blaues Erscheinungsbild (siehe Abb. 5). Die Proliferationsrate in den Wundrändern wurde unter Zuhilfenahme eines

⁴⁹ Kaninchenserum X 0902, DAKO Diagnostica, Hamburg, Deutschland

⁵⁰ Dakopatts System 40, DAKO Diagnostica, Hamburg, Deutschland

⁵¹ Hämalaun nach Mayer 9249, Merck, Darmstadt, Deutschland

⁵² Glycergel C 563, DAKO Diagnostica, Hamburg, Deutschland

Durchlichtmikroskopes⁵³ bei einer vierhundertfachen Vergrößerung ermittelt. Pro Objekt wurden zehn Gesichtsfelder ausgezählt, wobei nur epidermale Keratinozyten gewertet wurden. Keratinozyten in den Infundibuli wurden nicht in die Wertung einbezogen, da in den Haarfollikeln stets eine normal bedingt hohe Zellteilungsrate vorliegt.

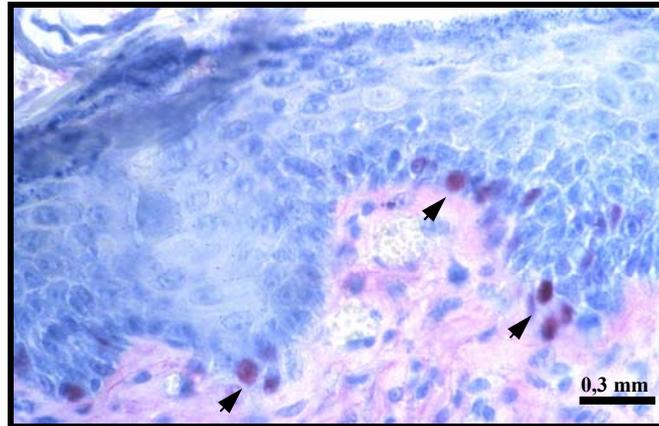


Abb. 5: Hautquerschnitt aus dem Wundbereich einer nicht transgenen Maus drei Tage nach Verwundung. Durch die BrdU-Färbung erscheinen mitotisch aktive Keratinozyten der Basallamina rot (schwarze Pfeile). Die Epidermis ist blau gefärbt. Das subcutane Fettgewebe, in dem einzelne dermale Keratinozyten (blau) sichtbar sind, weist eine Rosafärbung auf. Nähere Erläuterung siehe Text.

2.2.5 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung haarloser Wildtyp-Mäuse

Im Verlauf der Wundheilung beginnt bereits die epidermale Differenzierung der Keratinozyten, während die Epithelneubildung noch nicht abgeschlossen ist. Am Ende der Wundheilung bilden die Keratinozyten als kernlose Korneozyten mit einem lipidhaltigen Interzellularräum das Stratum corneum, die Permeabilitätsbarriere der Haut. Ob ein möglicher Zusammenhang zwischen den Sphingomyelinase-Aktivitäten und dem Prozeß der Zelldifferenzierung besteht, wurde an normalen haarlosen Mäusen untersucht.

Im Laufe der Differenzierung regenerieren die Keratinozyten eine spezielle, unlösliche Struktur unterhalb ihrer Plasmamembran, das sogenannte „cornified envelope“ (CE). Dieses Gerüst besteht aus einer Reihe von Proteinen wie Cystatin A, Elafin, Filaggrin, Involucrin, Loricrin, Spr-Protein (small-proline-rich-protein) und Trichohyalin (LEE et al., 1999). Die Aufgabe dieses Proteinskeletts ist es, den späteren Korneozyten durch ihre Quervernetzung eine mechanische Festigkeit zu verleihen und als Verankerungspunkte für Cholesterol, freie Fettsäuren sowie für die Strukturceramide und Sphingolipide zu dienen (STEINERT &

⁵³ Olympus BH2, Optical Corporation GmbH, Hamburg, Deutschland

MAREKOV, 1997). Das CE wird durch die sich differenzierenden Keratinozyten sukzessive aufgebaut.

In einer frühen Phase der Differenzierung ist Involucrin einer der Hauptbausteine des CE (KANITAKIS et al., 1987; WATT, 1993; ROBINSON et al., 1996; STEINERT & MAREKOV, 1997). Involucrin wird bereits in Keratinozyten des oberen Stratum spinosum gebildet und über CE-Grundgerüstproteine mit der inneren Zellmembran verbunden (RICE & GREEN, 1979; ECKERT et al., 1993). In einem späteren Stadium der terminalen Differenzierung, im Übergang vom Stratum granulosum zum Stratum corneum, wird dann aus intrazellulären Granula der Keratinozyten Loricrin in das Cytosol sezerniert und im CE eingebaut (MEHREL et al., 1990; HOHL et al., 1991).

2.2.5.1 Immunhistologische Analyse der epidermalen Differenzierung

Mit spezifischen Antikörpern gegen Involucrin und Loricrin ist es möglich, den Grad der Differenzierung des Wundrandepithels während der Wundheilung zu bestimmen. Für eine qualitative Analyse wurden aus den Wundrändern der untersuchten Mäuse parallel zur offenen Wunde Abschnitte von einem Zentimeter Länge exzidiert. Die Gewebeteile wurden, wie bereits für die Proliferationsbestimmung beschrieben, behandelt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen.

Bei der immunhistologischen Untersuchung wurde die Avidin-Biotin-Methode angewendet (GIORNO, 1984). Dabei ist der Brückenantikörper, der spezifisch an den Primärantikörper bindet, mit dem Vitamin Biotin konjugiert. Das dritte Reagenz dieser Methode stellt das Eiweißglykoprotein Avidin dar, welches wiederum mit vier Molekülen Biotin interagiert. Die vierfache Kopplung verstärkt die positive Farbreaktion, die durch eine am Avidin gebundene Peroxidase ausgelöst wird. Die Peroxidase bindet zuletzt ein Chromogen, woraus die Färbung resultiert.

Nachdem die Schnitte entparaffiniert und rehydriert worden waren, wurden sie fünf Minuten in einer dreiprozentigen Wasserstoffperoxid-Lösung⁵⁴ in TBS-Puffer (siehe Seite 33) inkubiert, um die intrazellulär vorhandene Peroxidase zu inhibieren und so eine Verfälschung der Färbung zu unterbinden.

Durch zweimaliges Waschen der Objekte in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurde anschließend die überschüssige Wasserstoffperoxid-Lösung entfernt. Nachdem die Präparate cirka 30 Minuten bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ in einem zehn millimolaren Citratpuffer (siehe Seite 33) erhitzt worden waren, wurden sie 15 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden sie kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ geschwenkt und fünf Minuten in TBS-Puffer gespült.

Die Hintergrundfärbung wurde durch eine zwanzigminütige Inkubation der Schnitte mit normalem Schweineserum⁵⁵ (1:5, v/v in TBS-Puffer) reduziert. Das überzählige Serum wurde vorsichtig abgeklopft und der primäre Antikörper⁵⁶ (rabbit-anti-mouse IgG) in optionaler Verdünnung (Involucrin 1:500, v/v oder Loricrin 1:1000, v/v in TBS-Puffer) auf die Paraffinschnitte aufgeträufelt. Nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde der nicht gebundene Primärantikörper mit isotonischer Kochsalzlösung und einer fünfminütigen Spülung in TBS-Puffer entfernt.

Die Wundrandsektionen wurden dann für weitere 30 Minuten mit einem biotinylierten Brückenantikörper⁵⁷ (swine-anti-rabbit IgG, 1:500, v/v in TBS-Puffer) beschichtet. Nach einer weiteren Reinigung in Kochsalzlösung und TBS-Puffer wurde der StreptABComplex⁵⁸ (Streptomycin-Avidin-Biotin-Complex, 1:500, v/v in TBS-Puffer) auf die Präparate getropft, und nach dreißig Minuten wurde der überschüssige Rest mit dem üblichen Waschvorgang wieder entfernt.

Die Farbreaktion erfolgte schließlich durch die Peroxidase-Substrat-Lösung DAB (3,3'-Diaminobenzidin chromogen Lösung)⁵⁹. Aus dem DAB-Kit wurden für die Färbelösung $500\text{ }\mu\text{l}$ zehnfach konzentrierter Substratpuffer (BioGenex, HK 127-5K) ad fünf Milliliter $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit $160\text{ }\mu\text{l}$ DAB-Chromogen (BioGenex, HK 124-7K) vermischt. Nach Zugabe von $80\text{ }\mu\text{l}$ Wasserstoffperoxid (BioGenex, HK 126-7K) und wiederholtem Mischen wurde die Lösung für 15 Minuten auf die Präparate aufgebracht.

⁵⁴ Wasserstoffperoxid-Lösung 1.07210, Merck, Darmstadt, Deutschland

⁵⁵ Normales Schweineserum X 901, DAKO Diagnostica, Hamburg, Deutschland

⁵⁶ Involucrin PRB-142 C, Covance, München, Deutschland

Loricrin PRB-145 P, Covance, München, Deutschland

⁵⁷ Biotinylierter Zweitantikörper E 353, DAKO Diagnostica, Hamburg, Deutschland

⁵⁸ StreptABComplex HRP, DAKO Diagnostica, Hamburg, Deutschland

⁵⁹ DAB-Färbungs-Kit, HK153-5K, BioGenex, San Ramon, Kanada

Nachdem die Schnitte zweimalig kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gespült worden waren, wurden sie entsprechend der Proliferationsfärbung gegengefärbt und mit Glycergel eingedeckelt.

Eine positive Reaktion war anhand einer Braunfärbung einzelner Zellagen zu erkennen. Je weiter die Differenzierung in den Wundrandpräparaten zunahm, desto mehr Zellagen waren angefärbt.

Zusammensetzung des TBS-Puffers (Tris-buffered-saline, pH 7,6) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$:

NaCl:	150 mM · l ⁻¹	Merck 1.06404
Tris:	50 mM · l ⁻¹	Merck 1.08382

Zusammensetzung des Citrat-Puffers (pH 6,0) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$:

		Stammlösungen*	
Natriumcitrat:	41 ml	0,1 M · l ⁻¹	Merck 6448
Zitronensäure:	9 ml	0,1 M · l ⁻¹	Merck 244
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$:	<u>450 ml</u>		
Endvolumen:	500 ml		

* Die Stammlösungen wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ angesetzt und waren bei 4 °C lagerungsfähig.

2.2.5.2 Westernblot-Analyse der epidermalen Differenzierung

Neben der qualitativen, visuellen Beurteilung anhand histologischer Wundrandpräparate wurde darüber hinaus der Differenzierungsgrad der Keratinozyten mit Hilfe der Westernblot-Technik quantifiziert. Normale, haarlose Mäuse wurden wie unter 2.2.1.1 verletzt. Nach drei, sechs bzw. zwölf Tagen wurden die Tiere getötet und der Wundrand in einer Breite von drei bis vier Millimetern ausgeschnitten. Von den Vollhautproben wurde zunächst das subcutane Fettgewebe entfernt, bevor die Epidermis von der Unterhaut getrennt wurde (siehe 2.2.2.1). Nachdem die separierte Epidermis in flüssigem Stickstoff schockgefroren worden war, wurde sie in H-Puffer (Seite 34) nach dem üblichen Verfahren (siehe 2.2.2.2) homogenisiert.

Zusammensetzung des H-Puffers (Homogenisationspuffer, pH 7,4) in H₂O_{bidest}:

Hepes :	40 mM · l ⁻¹	Merck 1.0110
KCl:	150 mM · l ⁻¹	Merck 1.04936
NaF:	5 mM · l ⁻¹	Merck 1.06449

Für die Westernblot-Analyse wurden vier bis acht Mikrogramm wasserlösliche Proteine aus den Epidermisextrakten eingesetzt. Der Proteingehalt der Homogenate wurde über die BCA-Methode (siehe 2.2.2.3) ermittelt. Die Probenvolumina wurden mit H-Puffer ad 20 µl aufgestockt. Als Attribut der Differenzierung wurden wiederum die Proteine Involucrin und Loricrin des „cornified envelope“ gewählt.

Durch die Technik der Gelelektrophorese ist es möglich, Proteine aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Die Geschwindigkeit, mit der sich die nativen Proteine im Gel bewegen, ist dabei, abgesehen von der angelegten Spannung, von ihrem Molekulargewicht, ihrer Konformation und ihrer Nettoladung abhängig. LÄMMLI (1970) hat mit der SDS-PAGE (sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamid-gelelektrophoresis) ein spezielles Elektrophoreseverfahren entwickelt, bei dem die Trennung der Proteine allein auf ihre Masse zurückzuführen ist.

Das SDS zerlegt dabei oligomere Proteine in ihre Untereinheiten und erzeugt eine starke negative Nettoladung an den entfalteten Peptidketten. Zugesezte Thiole oder β-Mercaptoethanol spalten vorhandene Disulfidbrücken und unterstützen so diesen Vorgang. Die aufbereiteten Proteine wandern in einem elektrischen Feld zur Anode, wobei sich ihre Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes verhält. Je kleiner die Masse eines Proteins ist, desto schneller bewegt sich dieses im Gel. Durch den Einsatz eines Gemisches aus Proteinen bekannter Massen ist es schließlich möglich, das gesuchte Protein im Gel zu charakterisieren.

Außerdem sind die Anteile an Acrylamid/Bisacrylamid im Gel entscheidend, da sie die Porengröße des Gels bestimmen, was wiederum die Wanderungseigenschaften der Proteine beeinflusst. Im Sammelgel wurde eine achtfach geringere Menge Acrylamid/Bisacrylamid als im Trenngel eingesetzt (Seite 36). Das Sammelgel dient dazu, daß die gelösten Proteine in den Proben gleichzeitig in das eigentliche Trenngel einströmen. Auf diese Weise wird

gewährleistet, daß die Proteine mit demselben Molekulargewicht das gleiche Wanderungsverhalten in der Elektrophorese zeigen.

Loricrin hat ein Molekulargewicht von 57 kD (ROOP et al., 1984; YUSPA et al., 1989; HU et al., 2001). LI et al. (2000) stellten für Involucrin eine Masse von 56 bis 155 kD (Kilodalton) fest. Involucrin liegt nach ihren Untersuchungen hauptsächlich in der 56 kD-Variante vor. Je nach Herkunft des untersuchten Gewebes sind jedoch auch Formen mit einem höheren Molekulargewicht möglich. Aufgrund dieser Molekulargewichte wurde für die Fraktionierung beider Proteine ein Trenngel mit mittlerem Vernetzungsgrad gewählt. Die Charakterisierung erfolgte anhand eines Mischstandards⁶⁰ aus Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht.

Die Glasplatten der Elektrophoresekammer⁶¹ wurden zunächst mit Aceton⁶² und fusselfreiem Zellstoff von anhaftenden fettigen Rückständen befreit. Die Schichtdicke des späteren Gels wurde durch sogenannte Spacer, die zwischen die Platten gelegt wurden und so einen definierten Zwischenraum erzeugten, auf einen Millimeter festgelegt. Die Glasplatten wurden seitlich und nach unten hin durch eine umlaufende Gummidichtung verschlossen.

Die Polymerisation des Sammel- und Trenngels wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) induziert, weshalb dieser Stoff erst kurz vor dem Gießen der Gele zu den übrigen Substanzen zugefügt wird.

Der Spaltraum zwischen den Glasplatten wurde zu circa zwei Dritteln mit Trenngel gefüllt. Aufgrund des Glycerinanteiles im Trenngel war es möglich, das Sammelgel vor der Aushärtung des Trenngels ohne zeitliche Verzögerung zu gießen. Das Glycerin verhinderte dabei eine Durchmischung beider Gele vor deren Polymerisation. Eine gleichmäßigere Schichtung konnte dadurch erzielt werden, daß das Trenngel bis zur Aushärtung mit H₂O_{bidest} überschichtet wurde. Das Wasser wurde danach abgossen. Die Polymerisation beider Gele benötigte bei Raumtemperatur etwa eine Stunde. Vor dem Erhärten des Sammelgels wurde in dieses ein Probenkamm eingeführt, durch den zehn gleichmäßige Taschen im Gel entstanden.

⁶⁰ Proteinmischstandard 161-0362, Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

⁶¹ MGV 202, C.B.S. Scientific Corporation, Kalifornien, USA

⁶² Aceton 1.00014, Merck, Darmstadt, Deutschland

Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels:

	Sammelgel	Trenngel	Stammlösungen*	
Acrylamid/ Bisacrylamid:	625 µl (5 %)	5000 µl (10 %)	40 % (37.5:1)	BioRad 161-0148
Glycerin:	-	9650 µl	20 %	ICN Biomedicals 800688
H ₂ O _{bidest} :	3070 µl	-		
SDS:	50 µl	230 µl	10 %	Sigma L-3771
TEMED:	5 µl	20 µl	100 %	Sigma T-9281
Tris, pH 8,8:	-	5000 µl	0,5 mol · l ⁻¹	Merck 1.08382
Tris, pH 6,8:	1200 µl	-	1,5 mol · l ⁻¹	Merck 1.08382
APS:	50 µl	100 µl	10 %	Sigma A-3678
Endvolumen:	<u>5000 µl</u>	<u>20000 µl</u>		

* Die Stammlösungen wurden in H₂O_{bidest} angesetzt.

Nach dem Erhärten der Gele wurde die Dichtung entfernt und die Glasplatten in der Elektrophoresekammer eingespannt. Das untere und obere Pufferreservoir wurde mit Laufpuffer (s. u.) gefüllt, so daß die Elektroden ausreichend bedeckt waren. Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Gel gezogen, wobei die Probenaschen automatisch mit Puffer geflutet wurden. Verbliebene Gelreste wurden mit Hilfe einer Einwegspritze und Pufferlösung aus den Taschen ausgespült. Mit der Spritzenkanüle konnte die Stellung der Taschen gegebenenfalls korrigiert werden.

Zusammensetzung des Laufpuffers (pH 8,8) in H₂O_{bidest}:

Glycin:	192 mM · l ⁻¹	Life technologies 15527-013
SDS:	0,1 %	Sigma L-3771
Tris:	25 mM · l ⁻¹	Merck 1.08382

Vor dem Beladen des Gels wurde das Volumen der Proteinlösungen und des Mischstandards mit zehn Mikrolitern Auftragspuffer (Seite 37) aufgefüllt, woraus ein Gesamtvolumen von 30 Mikrolitern resultierte. Der Auftragspuffer enthielt unter anderem das reduzierende Agens β-Mercaptoethanol und Lauryldodecylsulfat zur Denaturierung der Proteinmoleküle.

Um das Ausfallen von SDS aus den Probenlösungen zu verhindern, wurden die Proben für zwei Minuten in ein 80 °C heißes Wasserbad gestellt. Zugewetztes Bromphenolblau diente bei der Elektrophorese dazu, die Lauffront im Gel lokalisieren zu können und so den Trennvorgang rechtzeitig zu beenden. Dieser Farbstoff störte den eigentlichen Elektrophoresevorgang nicht und bewegte sich direkt in der Lauffront des Gels. Sofern nicht alle Taschen des Gels mit Proben belegt waren, wurden in die ungenutzten Taschen jeweils 30 Mikroliter eines Gemisches aus H-Puffer und Auftragspuffer (2:1, v/v) pipettiert, um eine gleichmäßige Lauffront über die gesamte Gelbreite zu erzeugen. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Stromstärke von 20 mA durchgeführt und benötigte etwa eine Stunde.

Zusammensetzung des Auftragspuffers (pH 6,8) in H₂O_{bidest}:

β-Mercaptoethanol:	9 %	Sigma M-6250
Bromphenolblau:	0,01 %	Sigma B-8026
Glycerin:	15 %	ICN Biomedicals 800688
SDS:	1 %	Sigma L-3771
Tris:	50 mM · l ⁻¹	Merck 1.08382
Urea:	4 M · l ⁻¹	GIBCO BRL 65F0654

Am Ende lagen die Proteine getrennt nach ihrem Molekulargewicht vor. Da das Gel sich inert gegenüber Antikörpern verhält, wurden die separierten Proteine mit der Westernblot-Methode (TOWBIN et al., 1979) zunächst aus dem Gel herausgelöst und auf eine Nitrozellulosemembran⁶³ übertragen.

Für den Blotvorgang wurde die Membran in Rechtecke von 7,5 · 10 cm² geschnitten. Ferner wurden für die Naßblottechnik vier Lagen saugfähiges Papier⁶⁴ der gleichen Größe benötigt. Die Membran und das Papier sowie die beiden Schwämme der Blotkammer⁶⁵ wurden in Transblotpuffer (Seite 38) getränkt, damit später ein guter Kontakt zwischen Gel und Membran bzw. Whatmanpapier gewährleistet war.

⁶³ Nitrozellulosemembran Protran 401180, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland

⁶⁴ Whatmanpapier GB002, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland

⁶⁵ Mini-TransBlot Celle 37S, Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Eingeschlossene Luftblasen verhindern eine gleichmäßige Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Membran, da an den Stellen der Blasen punktuell kein Strom fließen kann.

Das Blotsandwich wurde in einem flachen Behältnis, das mit dem Transblotpuffer gefüllt war, zusammengesetzt. Auf einen der Schwämme wurden zwei Lagen Papier aufgelegt und verbliebene Luftblasen ausgestrichen. Die Glasplatten mit dem Gel wurden aus der Elektrophoresekammer entnommen. Eine Glasplatte wurde vorsichtig von dem Gel abgehoben. Der Saum der Geltaschen wurde mit einem Skalpell oder einem der Spacer von dem restlichen Gel abgetrennt und verworfen. Das Gel wurde dann aufgenommen, auf das Papier aufgelegt und ebenfalls glattgestrichen. Auf das Gel wurden die Membran und zwei Papierlagen aufgebracht. Nachdem nochmals vorhandene Lufteinschlüsse entfernt worden waren, wurde abschließend durch den zweiten Schwamm das Sandwich komplettiert. Die Sandwich-vorrichtung wurde geschlossen und so ein gleichmäßiger Kontakt zwischen Gel und Membran hergestellt.

Das Sandwich wurde so in der Blotkammer orientiert, daß das Gel der Kathode zugewandt war. Durch die angelegte Spannung von 100 Volt wanderten die anionischen Proteine in einem elektrischen Feld Richtung Anode auf die Zellulosemembran. Die Blotkammer wurde mit dem gekühlten Transblotpuffer gefüllt und mit einem Eisaggregat versehen. Die durch die Elektrizität entstandene Erwärmung wurde so reduziert. Darüber hinaus wurde der Puffer durch einen Magnetrührer⁶⁶ bewegt, um die anfallende Wärme noch rascher abzuführen. Nach einer Dauer von 45 Minuten waren alle Proteine auf die Nitrozellulosemembran geblottet. Als Nachweis für einen erfolgreichen Westernblot diente die herstellerbedingte Blaufärbung der Proteine des Mischstandards, deren Bandenmuster sich deutlich auf der Membran abzeichnete.

Zusammensetzung des Transblotpuffers (pH 8,3) in H₂O_{bidest}:

Glycin:	192 mM · l ⁻¹	Life technologies 15527-013
Methanol:	20 %	Merck 1.06009
Tris:	25 mM · l ⁻¹	Merck 1.08382

Bei der Charakterisierung der geblotteten Proteine wird ähnlich der Immunhistologie auf spezifische Antikörper gegen das gesuchte Protein zurückgegriffen.

Für die quantitative Bestimmung von Involucrin und Loricrin wurde die Nitrozellulosemembran zunächst in TBST-Puffer mit einem Zusatz von zwei Prozent Magermilchpulver⁶⁷ (w/v) für 30 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken auf einem Horizontalschüttler⁶⁸ inkubiert. Das Magermilchpulver diente der Blockierung möglicher unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend wurde die überschüssige Milchpulverlösung durch dreimaliges, fünfminütiges Waschen der Membran in TBST-Puffer (siehe Seite 40) entfernt.

Die Membran wurde in ein vierzig Milliliter Falconröhrchen überführt, wobei die dem Gel ursprünglich zugewandte Seite nach innen orientiert wurde. Die Membran wurde an der Wandung des Falconröhrchens sauber aufgelegt, damit die anschließend zugefügte primäre Antikörperlösung die Membran homogen überfließen konnte. Im Falle des Involucrin⁶⁹ wurde der Erstantikörper im Verhältnis 1:3.000 (v/v), bei dem Loricrin⁷⁰-Nachweis 1:800 (v/v) mit TBST-Puffer (Seite 40) verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C unter bidirektionaler Schwenkbewegung auf einem Roller Mixer⁷¹. Nicht gebundener Antikörper wurde durch erneutes dreimaliges Waschen in TBST-Puffer entfernt.

Als Sekundärantikörper wurde der biotinylierte Brückenantikörper⁷² (swine-anti-rabbit IgG, 1:500, v/v in TBST-Puffer) der Avidin-Biotin-Methode eingesetzt, der bereits in der Immunhistochemie (vergleiche 2.2.5.1) zur Anwendung kam. In Vorversuchen zeigte sich, daß dieses indirekte Peroxidase-System zu weniger unspezifischen Bindungen führt als bei einem bereits Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper. Die Reaktionszeit betrug hierbei eine Stunde bei Raumtemperatur unter schwacher Bewegung auf dem Rotationsschüttler. Überschüssiger Brückenantikörper wurde schließlich durch dreimaliges Waschen von je fünf Minuten in TBST-Puffer entfernt.

Die Nitrozellulosemembran wurde danach für sechzig Minuten unter leichter Bewegung mit dem StreptABCComplex (Streptomycin-Avidin-Biotin-Complex, HRP, DAKO Diagnostica) inkubiert. Die StreptABCComplex-Stammlösung von je 4,5 µl Avidin- und Biotinlösung in

⁶⁶ Rec-G, IKA-Werke GmbH & Co, Stauffen, Deutschland

⁶⁷ Magermilchpulver Neuform, Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell, Deutschland

⁶⁸ KS 260 basic, IKA-Werke GmbH & Co, Stauffen, Deutschland

⁶⁹ Involucrin PRB-142 C, Covance, München, Deutschland

⁷⁰ Loricrin PRB-145 P, Covance, München, Deutschland

⁷¹ Stuart Scientific SRT 1, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland

⁷² Biotinylierter Sekundärantikörper E 353, DAKO Diagnostica, Hamburg, Deutschland

500 µl Tris-Puffer (v/v, Seite 28) wurde zu diesem Zweck mit TBST-Puffer 1:100 (v/v) verdünnt. Ungebundener Peroxidase-Komplex wurde zuletzt mit Hilfe von zweimaligem Spülen in TBST- und einmaligem Waschen in TBS-Puffer (s. u.) von je zehnminütiger Dauer entfernt.

Zusammensetzung des TBST-Puffers (Tris-buffered-saline-Tween, pH 7,0) in

H₂O_{bidest}:

NaCl:	150 mM · l ⁻¹	Merck 1.06404
Tris:	50 mM · l ⁻¹	Merck 1.08382
Tween-20:	0,1 %	Merck 8.22184

Zusammensetzung des TBS-Puffers (Tris-buffered-saline, pH 7,6) in H₂O_{bidest}:

NaCl:	150 mM · l ⁻¹	Merck 1.06404
Tris:	50 mM · l ⁻¹	Merck 1.08382

Überschüssiger Puffer wurde nach dem letzten Reinigungsschritt vorsichtig von der Membran abgegossen. Die Nitrozellulosemembran wurde mit der blotabgewandten Seite auf handelsübliche Frischhaltefolie⁷³ gelegt.

Zur Detektion positiver Protein-Antikörper-Kopplungen wurde das Verfahren der verstärkten Chemilumineszenz unter Verwendung des „ECL™-Western blotting detection system“⁷⁴ eingesetzt. Lumineszenz ist als Lichtemission definiert, die aus der Streuung von Energie einer Substanz im angeregten Zustand resultiert. Bei der Chemilumineszenz im besonderen wird der angeregte Zustand durch eine chemische Reaktion verursacht. Bestandteil des ECL-Kits ist Luminol, ein zyklisches Diacylhydrazid, das unter alkalischen Bedingungen durch Wasserstoff-peroxid und die gebundene Peroxidase im Falle der Avidin-Biotin-Methode oxidiert wird (Abb. 6). Durch die Oxidation wird Luminol in einen angeregten Zustand versetzt. Die dabei aufgenommene Energie wird so lange in Form von Licht freigesetzt, bis das Luminol schließlich wieder in reduzierter Form vorliegt. Mittels Phenol wird die Lichtemission während des Zerfalls von Luminol um das Tausendfache verstärkt

⁷³ Frischhaltefolie vitaWrap, Vita Emballage, Rødovre, Dänemark

⁷⁴ RPN 2209 ECL™ (Enhanced-Chemiluminescence), Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

(WHITEHEAD et al., 1979). Das Emissionsmaximum wird laut Hersteller bei einer Wellenlänge von 428 nm nach 5 bis 20 Minuten erreicht, wobei angeregtes Luminol eine Halbwertszeit von einer Stunde besitzt.

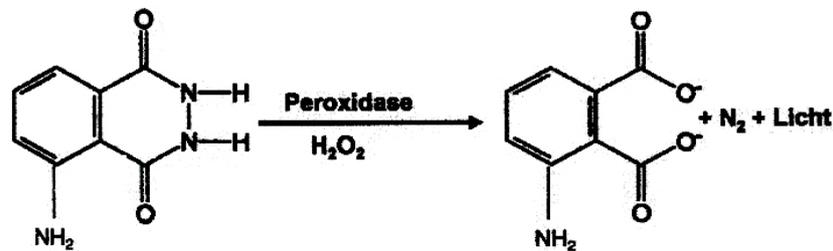


Abb. 6: Luminol wird durch die Peroxidase-Aktivität unter Verbrauch eines Wasserstoffperoxids modifiziert, worauf es Energie in Form von Licht freisetzt.

Aufgrund der zeitlich terminierten Emission wurden die beiden Reaktionslösungen des ECL-Kits unmittelbar vor der Inkubation der Blotmembran im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt. Pro Membran wurden insgesamt vier Milliliter benötigt. Die Lösung wurde gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach ein bis zwei Minuten Einwirkungszeit wurde die Frischhaltefolie über die Nitrozellulosemembran gebreitet, und durch Glattstreichen wurde die überschüssige Reaktionslösung seitlich ausgestrichen. Die so belassene Nitrozellulosemembran wurde in eine Filmkassette⁷⁵ gelegt. Röntgenfilme⁷⁶ wurden auf der Membran von fünf Sekunden bis drei Minuten belichtet. Anschließend wurden die Filme vollautomatisch entwickelt⁷⁷. Ein positives Resultat des Proteinnachweises äußerte sich durch eine Schwärzung des Röntgenfilms. Das gesuchte Protein, Involucrin bzw. Loricrin, konnte anhand des Bandenmusters aus dem Mischstandard charakterisiert werden. Die quantitative Auswertung erfolgte densitometrisch über das Programm TINA 2.09g^{©78}.

Bei der vergleichenden quantitativen Analyse von Proteinen über die SDS-PAGE/Western-blot-Technik bedarf es besonderer Sorgfalt, da Differenzen im Gesamtproteingehalt der Proben untereinander zu Fehlinterpretationen hinsichtlich des untersuchten Proteins führen können. LIAO et al. (2000) stellten fest, daß sich der Anteil an Actin proportional zum Gesamtproteingehalt verhält. Sie leiteten daraus ab, daß Actin als interne Kontrolle der

⁷⁵ RPN 1642, Amersham, Braunschweig, Deutschland

⁷⁶ Biomax MR, Eastman Kodak Corporation, New York, USA

⁷⁷ Filmentwickler-Automat Crurix 60, Agfa VGmbH, Köln, Deutschland

untersuchten Proben in der Elektrophorese herangezogen werden kann. Da die Chemilumineszenz des ersten Proteinnachweises nach circa einer Stunde abgeklungen war, konnte mit Hilfe eines monoklonalen β -Actin-Antikörpers⁷⁹ und der gleichen Avidin-Biotin-Färbemethode die Homogenität der Proben überprüft werden. Der Actin-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 mit TBST-Puffer (v/v) eingesetzt. Loricrin bzw. Involucrin beeinflusste die Kontrollfärbung der Membran aufgrund des anderen Molekulargewichtes nicht (Actin hat eine Größe von 42 kD). Neben dem Actin-Nachweis war es außerdem möglich, auf derselben Membran ein weiteres Protein zu untersuchen, sofern dies sich in der Masse ausreichend von den anderen unterscheidet. In ein und derselben Probe konnte auf diese Weise die simultane Expression zweier Proteine geprüft werden.

2.3 Untersuchungen von Vollhautwunden an transgenen Mäusen

TNF α und die beiden Interleukin-Subtypen, IL-1 α und IL-1 β , werden als proinflammatorische Zytokine bei einer Schädigung der Homöostase der Haut als erste Mediatoren von immunreaktiven und epidermalen Zellen sezerniert (DINARELLO, 1991; DEYERLE et al., 1992; TSAI et al., 1994; HOFMEISTER et al., 1997). Die Zytokine aktivieren in ihren Zielzellen bestimmte Signalwege, die zur Proliferation bzw. Differenzierung führen oder sogar die Apoptose, den programmierten Zelltod, auslösen können (DINARELLO, 1991; JENSEN et al., 1999).

2.3.1 Wundheilung transgener Mäuse mit IL-R1 Defizienz

Wie sich die gestörte Signaltransduktion von IL-1 α / β in IL-1-R1 defizienten Tieren während der Heilung nach Totalexzision der Haut auswirkt, wurde an fünf transgenen Mäusen im Vergleich zu einer entsprechenden Anzahl von Wildtyp-Mäusen untersucht. Die Tiere wurden wie unter 2.2.1.1 narkotisiert, und anschließend wurde das Fell mit Hilfe eines Haartrimmers⁸⁰ und Einmalrasierern⁸¹ am ganzen Körperstamm entfernt. Pro Tier wurde jeweils auf einer rasierten Flanke ein kreisförmiges Hautareal von zehn bzw. zwanzig Millimetern Durchmesser exzidiert. Die Wunden wurden mit Comfeel Plus abgedeckt und der

⁷⁸ TINA 2.09g[®], Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland

⁷⁹ β -Actin-Antikörper A-5441, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

⁸⁰ Aesculap, Ludwig Empfenzeder, München, Deutschland

⁸¹ Kai medical 48.500.00.000, Kai Europe GmbH, Köln, Deutschland

Verband mit Durapore™ fixiert (siehe 2.2.1.2). Der Heilungsprozeß wurde wie unter 2.2.1.3 beschrieben dokumentiert.

2.3.2 Wundheilung transgener Mäuse mit TNF-R1 Defizienz

An transgenen Mäusen mit TNF-R1 Defizienz wurde die Bedeutung der Signaltransduktion von TNF α während der Wundheilung tiefer Hautwunden untersucht. Da IL-1 und TNF α ähnliche Signalwirkungen erzielen können, lag das Hauptaugenmerk dieser Untersuchung auf den biologischen Aktivitäten, die schon in der IL-1 defizienten Maus eruiert worden waren. Transgene Mäuse mit einer TNF-R1 Defizienz, vier mit einer Wundgröße von zehn sowie fünf mit zwanzig Millimetern Wunddurchmesser, und je fünf Wildtyp-Mäuse wurden wie unter 2.3.1 behandelt. Als Heilungsparameter wurden neben der Wundheilung wiederum die Epithelneubildung und die Wundkontraktion bestimmt (siehe auch 2.2.1.3).

2.3.3 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung IL-1-R1 und TNF-R1 defizienter Mäuse

An transgenen Mäusen mit einer Defizienz für den IL-1-Rezeptor 1 bzw. für den TNF-Rezeptor 1 wurde getestet, wie durch eine unterbundene Signaltransduktion von IL-1 α / β oder TNF α bei einer tiefen Verletzung die epidermale Proliferation und somit die Hautregeneration beeinflusst wird.

Für die Untersuchung wurden je vier IL-1-R1 und TNF-R1 defiziente Tiere sowie Mäuse des Stammes C57Bl/6 als nicht transgene Kontrolle wie unter 2.3.1 in einem kreisförmigen Areal von 20 Millimetern Durchmesser verletzt. Drei, sechs bzw. zwölf Tage nach Verletzung wurden die narkotisierten Tiere durch cervikale Dislokation getötet und der Wundrand in einer Breite von drei bis vier Millimetern entnommen. Abweichend von der Bestimmung der Proliferationsrate an haarlosen Mäusen (vgl. 2.2.4) wurde in dieser Untersuchung die Zellteilung nicht mit der BrdU-Methode ermittelt. Da die defizienten Tiere aufgrund ihres genetischen Defektes bereits in Verbindung mit der Hautwunde eine erhöhte Anfälligkeit zeigen konnten, wurde anstatt einer weiteren physischen Belastung durch eine BrdU-Injektion auf einen vergleichbaren anderen postmortalen Proliferationsnachweis zurückgegriffen (GERLACH et al., 1997). Das Wundrandepithel wurde wie üblich entnommen, in Formalin dehydriert (siehe 2.2.4), und die Gewebeschnitte wurden auf beschichtete Objektträger

aufgezogen. Das Paraffin wurde ebenfalls nach der gängigen Vorgehensweise entfernt und die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

Als Nachweis für eine mitotisch aktive Zelle wurde das murine Äquivalent des humanen nukleären zellproliferationsassoziierten Ki-67-Antigens verwendet (GERDES et al., 1997; GERLACH et al., 1997; KOSCO-VILBOIS et al., 1997). Die Funktion des Ki-67 Proteins während der Proliferation der Zellkern-DNS ist nicht bekannt; es ist jedoch innerhalb der Interphase eines Mitosezyklus außer in der S- auch in der vorgeschalteten G₁-Phase aktiv (vergleiche 2.2.4). Bedingt durch die verlängerte Expression von Ki-67 wird daher eine höhere Zahl mitotisch aktiver Zellen pro Zeiteinheit nachgewiesen als mit der BrdU-Methode.

Die histologische Färbung der Wundrandsektionen wurde nach einem modifizierten Protokoll (MORETTI et al., 1990) durchgeführt. Nachdem die Paraffinschnitte in H₂O_{bidest} rehydriert worden waren, wurde für 20 Minuten die endogene Peroxidase im Gewebe durch eine einprozentige Wasserstoffperoxid-Lösung⁸² in Tris-Puffer (siehe Seite 46) blockiert. Anschließend wurde die Lösung durch dreimaliges Spülen von fünf Minuten Dauer in Tris-Puffer entfernt.

Die Proben wurden dann in einem Citratpuffer (siehe Seite 46) bei 80 °C für dreißig Minuten im Wasserbad erhitzt. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren (nach etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur), wurden sie erneut dreifach in Tris-Puffer gewaschen.

Der primäre Kaninchen-Anti Maus-Antikörper, Ki-67⁸³, wurde in Tris-Puffer 1:50 (v/v) verdünnt und fünf Prozent fetales Kälberserum⁸⁴ (FCS, fetal calf serum) zugesetzt, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren. Die Wundrandpräparate wurden 30 Minuten mit diesem Erstantikörpergemisch inkubiert.

Nach einem weiteren Waschvorgang wurde der zweite Peroxidase gekoppelte Ziege-Anti Kaninchen-Antikörper⁸⁵ 1:30 (v/v) in Tris-Puffer mit fünfprozentigem FCS und Mausnormalserum⁸⁶ (im Verhältnis 1:8 des Ansatzes, v/v) auf die Paraffinschnitte aufgeträufelt. Das

⁸² Wasserstoffperoxid-Lösung 1.07210, Merck, Darmstadt, Deutschland

⁸³ Primärantikörper Ki-67 DIA 550-67, Dianova, Hamburg, Deutschland

⁸⁴ Fetales Kälberserum A15-649, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

⁸⁵ Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper DIA 111-035-045, Dianova, Hamburg, Deutschland

⁸⁶ Mausnormalserum X 0910, DAKO Diagnostica, Hamburg, Deutschland

Serum diente ebenfalls zur Hintergrundreduzierung. Der Antikörper wurde mit Tris-Puffer entfernt, bevor ein weiterer Peroxidase gekoppelter Kaninchen-Anti Ziege-Antikörper⁸⁷ auf die Schnitte aufgebracht wurde. Dieser Antikörper wurde ebenso 1:50 mit Tris-Puffer und fünfprozentigem FCS (v/v) verdünnt. Die überschüssige Lösung wurde mit dreimalig fünfminütigem Waschen in Tris-Puffer entfernt.

Proliferierende Zellen wurden mit der Peroxidase-Substrat-Lösung DAB (3,3'-Diaminobenzidin chromogen Lösung)⁸⁸ nachgewiesen. Aus dem DAB-Kit wurden für die Färbelösung 500 µl zehnfachkonzentrierter Substratpuffer (BioGenex, HK 127-5K) ad fünf Milliliter H₂O_{bidest} mit 160 µl DAB-Chromogen (BioGenex, HK 124-7K) vermischt. Nach Zugabe von 80 µl Wasserstoffperoxid (BioGenex, HK 126-7K) und wiederholtem Mischen wurde die Lösung für fünfzehn Minuten auf die Präparate aufgebracht.

Die Schnitte wurden dreimal kurz in Tris-Puffer gespült, entsprechend der BrdU-Proliferationsfärbung gegengefärbt und mit Glycergel eingedeckelt (siehe 2.2.4).

Eine positive Reaktion war anhand einer Braunfärbung der mitotisch aktiven Nuklei zu erkennen. Inaktive Zellen wiesen dagegen einen blauen Zellkern entsprechend den anderen Zellbestandteilen als Resultat der Gegenfärbung auf (siehe Abb.7).

⁸⁷ Peroxidase-gekoppelter Drittantikörper DIA 305-035-045, Dianova, Hamburg, Deutschland

⁸⁸ DAB-Färbungs-Kit, HK 153-5K, BioGenex, San Ramon, Kanada

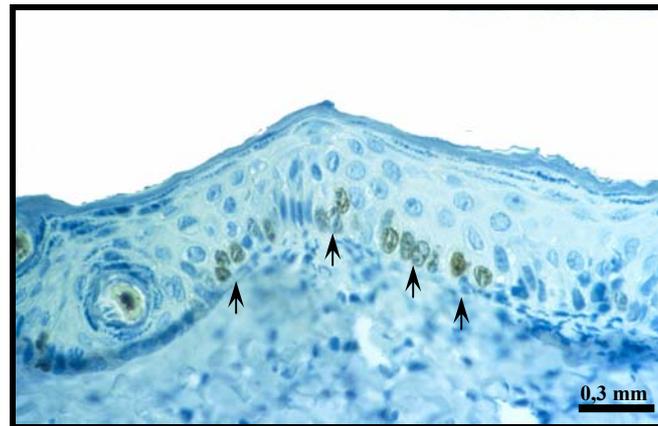


Abb. 7: Hautquerschnitt aus dem Wundbereich einer TNF-R1 transgenen Maus drei Tage nach Verwundung. Durch die DAB-Färbung erscheinen mitotisch aktive Keratinozyten der Basallamina braun (schwarze Pfeile). Inaktive Zellen der Epidermis und der Dermis sowie das subcutane Fettgewebe sind blau gegengefärbt. Nähere Erläuterung siehe Text.

Zusammensetzung des Tris-Puffers (pH 7,4) in isotonischer Kochsalzlösung:

NaCl:	85 mM · l ⁻¹	Merck 1.06404
Tris:	50 mM · l ⁻¹	Merck 1.08382

Zusammensetzung des Citrat-Puffers (pH 6,0) in H₂O_{bidest}:

		Stammlösungen*	
Natriumcitrat:	41 ml	0,1 M · l ⁻¹	Merck 6448
Zitronensäure:	9 ml	0,1 M · l ⁻¹	Merck 244
H ₂ O _{bidest} :	<u>450 ml</u>		
Endvolumen:	500 ml		

* Die Stammlösungen wurden in H₂O_{bidest} angesetzt und waren bei 4 °C lagerungsfähig.

2.3.4 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung IL-1-R1 und TNF-R1 defizienter Mäuse

Transgene Mäuse mit einer Rezeptor-Defizienz für den IL-1-R1 oder TNF-R1 wurden hinsichtlich ihres Differenzierungsvermögens während der Heilung von Vollhautwunden untersucht. Zum Vergleich wurden nicht transgene Wildtyp-Mäuse herangezogen. Es wurde für die Untersuchung ein früher, mittlerer und später Zeitpunkt (drei, sechs und zwölf Tage nach Verletzung) gewählt. Die Reifung der Keratinozyten wurde immunhistologisch anhand

der Involucrin- und Loricrinexpression belegt. Die Vorgehensweise entspricht dem unter 2.2.5.1 aufgeführten Protokoll für die qualitative Analyse der CE-Proteine.

2.3.5 Wundheilung transgener Mäuse mit TNF-R1/IL-1-R1 Doppeldefizienz

An jeweils fünf TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen wurde die additive Wirkung einer gleichzeitig unterbundenen Signaltransduktion der Zytokine, IL-1 α /- β und TNF α , über ihre Rezeptoren 1 bei einer tiefen Hautwunde untersucht. Den transgenen Tieren sowie entsprechenden Kontrollmäusen wurden, wie unter 2.3.1 beschrieben, Wunden von zehn und zwanzig Millimeter Durchmesser zugefügt. Die Parameter Heilungsrate, Wundkontraktion und Reepithelialisierung wurden nach den bereits beschriebenen Verfahren ermittelt (siehe 2.2.1.3).

2.3.6 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienter Mäuse

Durch die fehlenden Rezeptoren wird eine Signaltransduktion der beiden proinflammatorischen Zytokine, TNF α und IL-1 α /- β , unterdrückt. Trotzdem ist eine, wenn auch eingeschränkte, Differenzierung der Haut nach einer oberflächlichen Verletzung möglich (JENSEN et al., 1998). Der Reifung der Keratinozyten in der Haut muß jedoch die Bildung neuer Zellen vorausgehen. Inwieweit die Proliferation in diesen doppeldefizienten Mäusen bei einer Totalexzision der Haut beeinflußt ist, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verwundung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen analysiert. Die Teilungsintensität der Keratinozyten im Wundrand wurde am zweiten und sechsten Tag nach der Exzision im Vergleich zu unbehandelter Haut untersucht. Der Nachweis erfolgte immunhistochemisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen das DNS assoziierte Ki-67 Antigen (nähere Erläuterungen siehe 2.3.3).

2.3.7 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienter Mäuse

Nachdem die Proliferation während der Wundheilung der TNF-R1/IL-1-R1 transgenen Mäuse betrachtet worden war, wurde die Differenzierung bei einer tiefen Verletzung untersucht. Ziel dieser Untersuchung war, in Anlehnung an die qualitative Bestimmung von Involucrin und Loricrin der einfach rezeptordefizienten Mausmodelle (siehe 2.3.4), die möglicherweise eingeschränkte Differenzierung bei einer Doppeldefizienz zu eruieren. Die Bestimmung

erfolgte an histologischen Wundrandpräparaten im Vergleich zu nicht transgenen Maushautproben nach der unter 2.2.5.1 beschriebenen Methode.

2.3.8 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei IL-1-R1 und TNF-R1 Defizienz

An Mäusen mit einer IL-1-R1 bzw. TNF-R1 Defizienz wurde die Aktivität der A- und N-Sphingomyelinase während der Wundheilung nach tiefer Verletzung untersucht. Pro Zeitpunkt (drei, sechs bzw. zwölf Tage nach Versuchsbeginn) wurden durchschnittlich vier Tiere verwendet. Es sollte geprüft werden, ob durch den jeweilig fehlenden Rezeptor die Enzymaktivitäten verändert sind. In welchem Abschnitt des Heilungsprozesses Veränderungen zu erkennen waren, wurde im Vergleich zu normalen Kontrollmäusen evaluiert. Mit Hilfe der einfachen Rezeptordefizienz-Modelle konnte dabei auch untersucht werden, inwieweit die Aktivierung der Sphingomyelinasen während der Proliferations- und Differenzierungsphase von der TNF α - oder IL-1-Signaltransduktion beeinflusst wird.

2.3.9 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei TNF-R1/IL-1-R1 Doppeldefizienz

An vier Mäusen mit einer TNF-R1/IL-1-R1 Doppeldefizienz wurde die Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase (SMase), unabhängig von der direkten proinflammatorischen Signalvermittlung, während der Heilung von Vollhautwunden untersucht. Die N-SMase wurde vergleichend in sechs und die A-SMase außerdem in vierzehn Tage altem Wundrandepithel normaler und doppeltransgener Mäuse betrachtet.

2.3.10 Wundheilung transgener Mäuse mit FAN Defizienz

Anhand FAN defizienter Mäuse war es möglich, die Wundheilung nach Totalexzision der Haut zu studieren, bei der nicht die komplette Signaltransduktion des TNF-Rezeptor 1 inhibiert war. Während die Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase durch das fehlende Adapterprotein FAN eingeschränkt wird, ist die Signalübermittlung zur sauren Sphingomyelinase unverändert KREDER et al. (1999).

Welche Bedeutung das Adapterprotein FAN in einer normalen Heilung hat, wurde an acht FAN defizienten Mäusen vergleichend zu nicht transgenen Mäusen über einen Zeitraum von

zwei Wochen anhand von Vollhautwunden mit einer Größe von zwanzig Millimetern Durchmesser untersucht.

2.3.11 Wundheilung transgener Mäuse mit A-SMase Defizienz

Die saure Sphingomyelinase stellt neben der neutralen Form dieses Isoenzym ein zentrales Element der Signaltransduktion von TNF α und IL-1 in den Keratinozyten dar. Mit Hilfe A-SMase defizienter Mäuse wurde untersucht, welche Bedeutung dem sauren Enzym während der Wundheilung zukommt. Jeweils vier transgene und nicht transgene Mäuse wurden auf einer Flanke in einem kreisförmigen Bereich von zehn bzw. zwanzig Millimetern Durchmesser durch Totalexzision der Haut verletzt. Die Tiere wurden nach dem üblichen Verfahren behandelt und die entsprechenden Wundparameter evaluiert (siehe 2.3.1 und 2.2.1.3).

2.3.12 Epidermale Proliferation und Differenzierung im Verlauf der Wundheilung FAN und A-SMase defizienter Mäuse

Sowohl die neutrale als auch die saure Sphingomyelinase stehen unmittelbar in Verbindung mit der Gewebeerneuerung. Ob jedoch in Vollhautwunden der eine Enzym-Subtypus dabei stärker in die Zellneubildung und der andere mehr in die Zelldifferenzierung eingebunden ist, ist bislang noch nicht hinlänglich untersucht (vgl. 2.3.10). Durch die unterbundene Signalübertragung zur N-SMase bei FAN Defizienz ließ sich in einem in vivo-Modell testen, inwieweit die verringerte Aktivierbarkeit der neutralen Sphingomyelinase Auswirkungen auf die Proliferation und Differenzierung hat. Durch das A-SMase defiziente Mausmodell konnten dieselben Parameter untersucht werden, bei der die Signaltransduktion über die saure Sphingomyelinase vollständig unterbunden ist.

In Anlehnung an die Arbeit von KREDER et al. (1999) wurde die Proliferation bei den FAN defizienten Tieren mit der BrdU-Methode (siehe 2.2.4) an histologischen Präparaten ermittelt. Jeweils fünf defiziente Tiere und nicht transgene Kontrollen wurden nach drei, sechs und zwölf Tagen untersucht. Die Proliferation bei einer A-SMase Defizienz wurde an je fünf transgenen Mäusen und nicht transgenen Kontrolltieren nach dem gleichen Verfahren bestimmt.

Der Grad der Differenzierung wurde zu den gleichen Zeitpunkten der Wundheilung bei FAN und A-SMase defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen anhand der Involucrin- und Loricrinexpression ermittelt. Die Vorgehensweise ist unter 2.2.2.6 aufgeführt.

2.3.13 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei FAN und A-SMase Defizienz

Die Sphingomyelinasen spielen während der Wundheilung eine zentrale Rolle in den von TNF α und IL-1 ausgehenden Signaltransduktionen. Ob die Aktivität der SMasen während der Wundheilung bei einer FAN Defizienz verändert ist und wie sich eine A-SMase Deletion auf die Aktivität der vorhandenen neutralen Sphingomyelinase auswirkt, wurde an transgenen Mäusen untersucht.

Die Aktivität beider SMase-Isoenzyme wurde an vier FAN defizienten und fünf genetisch nicht veränderten Mäusen während der Wundheilung drei, sechs bzw. zwölf Tage nach der Verwundung bestimmt. Die Aktivität der neutralen Sphingomyelinase wurde außerdem an acht A-SMase defizienten Tieren und einer entsprechenden Anzahl nicht transgener Kontrollmäuse zu den gleichen Zeitpunkten evaluiert.

2.4 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die Wundparameter der Verbandsstudie haarloser Wildtyp-Mäuse wurden mit einer ANOVA und einem Einzelvergleich nach Scheffé auf signifikante Unterschiede getestet. Der Vergleich der Wundheilung transgener Mäuse zu normalen Wildtyp-Mäusen erfolgte über den Students T-Test. Im Falle der Untersuchung TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienter Mäuse konnten keine statistischen Tests durchgeführt werden, da die Stichprobe durch die hohe Mortalität der transgenen Mäuse während des Versuches mit weniger als fünf Tieren zu gering war. Der Verlauf der Wundheilung, der Wundkontraktion und der Reepithelialisierung wurde jeweils als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung dargestellt. Für die Darstellung der Zellmigration als weiterer relevanter Faktor der Wundheilung wurde der Median mit den Interquartilabständen gewählt. Dem Vergleich der Differenzierungsproteine, Involucrin und Loricrin, mit der Westernblot-Technik wurden der Mittelwert und die Standardabweichung zugrunde gelegt. Alle Westernblot-Untersuchungen wurden nicht weiter statistisch bearbeitet.

Bei dem Vergleich der neutralen und sauren Sphingomyelinase-Aktivität in verschiedenen Wundheilungsstadien und im Wundrand haarloser Wildtyp-Mäuse wurde mit dem Students T-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Die zugehörigen Abbildungen zeigen wiederum die Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Ergebnisse zur Aktivität der Sphingomyelinase während der Wundheilung transgener Mausmodelle wurden größtenteils nach demselben Test statistisch geprüft und dargestellt. Bei den TNF-R1 defizienten Mäusen wurde die neutrale Sphingomyelinase-Aktivität und bei den TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen wurden beide SMase-Isoenzym-Aktivitäten mit dem Kruskal-Wallis-Test auf statistische Relevanz geprüft. In den zugehörigen Abbildungen wurden hierbei die Mediane mit den Quartilabständen abgebildet.

Die Signifikanzprüfung der Proliferationsversuche erfolgte bis auf die TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten und FAN einfachdefizienten Mausmodelle über den Students T-Test mit der jeweiligen Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen. Im Falle der speziell genannten transgenen Mäuse wurde nach Kruskal-Wallis getestet. Die entsprechenden Abbildungen zeigen die Mediane und Interquartilabstände.

Die Korrelationsanalyse der Proliferations- bzw. der Differenzierungsrate zu den SMase-Aktivitäten während der Wundheilung haarloser Wildtyp-Mäuse wurde nach Pearson durchgeführt. Bei der Ermittlung signifikanter Unterschiede in der quantitativen Analyse wurde der *a posteriori* Einzelvergleich nach Scheffé angewendet.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Software Package for the Social Sciences, „SPSS 8.0“ für Windows. Die Abbildungen wurden in Microsoft Excel 2000 und PowerPoint erstellt. Histologische Bilder und weitere Photographien wurden mit dem Micrografix Picture Publisher bearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen von Vollhautwunden an haarlosen Wildtyp-Mäusen

3.1.1 Einfluß okklusiver und nicht okklusiver Wundabdeckungen auf verschiedene Heilungsparameter

Wundauflagen werden bei offenen Wunden primär als Schutz vor Verunreinigungen eingesetzt, wodurch mögliche Infektionen unterbunden werden sollen. Außerdem nehmen Verbände Wundexudat, Blutbestandteile und abgestoßenes Zellmaterial auf. Wundverbände können aber auch direkt die Heilung beeinflussen. In den letzten Jahren wurden zur Behandlung von Wunden verstärkt semiokklusive Folien eingesetzt. In der Dermatologie findet diese Art des Verbandes beispielsweise Einsatz bei der Behandlung von Unterschenkelulcera. Welche Bedeutung verschieden wasserdampfdurchlässige Folien auf den Heilungsprozeß ausüben, wurde anhand einer okklusiven und einer semiokklusiven Wundauflage (Comfeel® Plus) nach einer Vollhautexzision an Wildtyp-Mäusen untersucht. Zum Vergleich wurde die Wundheilung von Mäusen ohne Wundverband herangezogen.

Abbildung 8 zeigt den Verlauf der Wundheilung nach tiefer Verletzung (Wunddurchmesser 20 mm) der Mausflanke über einen Zeitraum von zwei Wochen. In der Kontrollgruppe ohne Verband war die Wunde zwei Tage nach Verletzung bereits zu fünfzig Prozent verschlossen. Nach neun Tagen war über neunzig Prozent des ursprünglichen Wundareals abgeheilt. Eine vollständige Heilung wurde nach 11 Tagen erreicht.

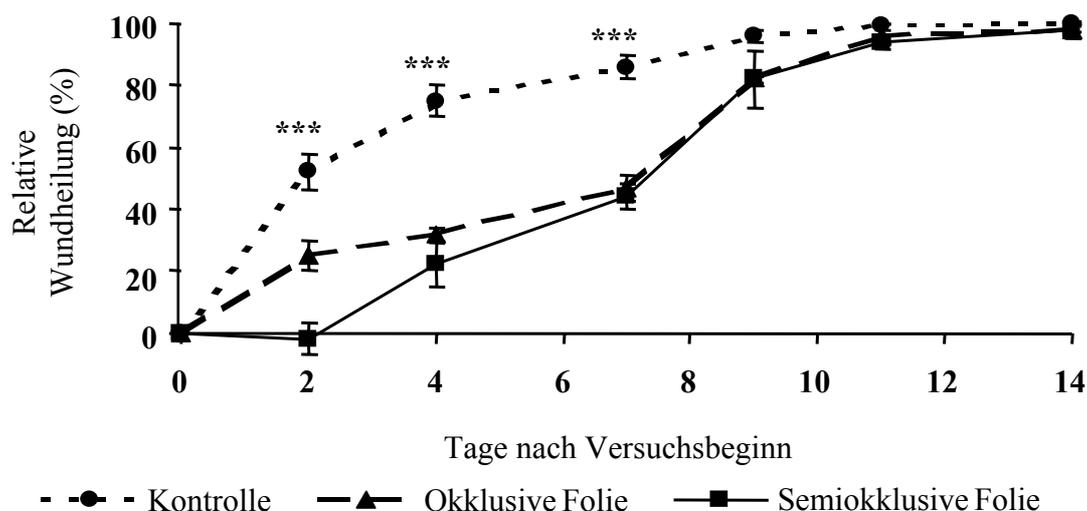


Abb. 8: Wundheilungsverlauf von kreisförmigen Vollhautexzisionen (Durchmesser 20 mm) bei nicht transgenen Mäusen unter dem Einfluß verschiedener Verbandmaterialien. Die Kontrolltiere wurden ohne Wundauflage gehalten. Mittelwert \pm Standardabweichung; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

In den Versuchsgruppen, die mit einem Wundverband behandelt wurden, lassen sich deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe erkennen (Abb. 8 und Tab. 1). Während sich mit der okklusiven Folie nach zwei Tagen die Wundgröße um 25 % reduzierte, weitete sich die Wunde unter dem semiokklusiven Verband sogar. Der zunächst hoch signifikant verringerte Heilungsgrad unter der semiokklusiven Folie zeigte nach einer Woche ein annähernd gleiches Niveau wie beim Einsatz der okklusiven Wundabdeckung. Während sich der Heilungsprozeß ohne Verband verlangsamt, beschleunigte er sich in den Versuchsgruppen mit einer Wundabdeckung ab dem siebten Tag. Durch den Einsatz der verschiedenen Wundverbände verlängerte sich der Heilungsprozeß gleichermaßen um zwei Tage.

Tab. 1: Paarweiser Vergleich der Wundbehandlungen nach Scheffé an den jeweiligen Untersuchungstagen. n.s. nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

	0	2	4	7	9	11	14
Kontrolle vs. Okklusiver Verband	n.s.	**	**	***	n.s.	n.s.	n.s.
Kontrolle vs. Semiokklusiver Verband	n.s.	***	***	***	*	n.s.	n.s.
Okklusiver Verband vs. Semiokklusiver Verband	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Unter Berücksichtigung der Wundkontraktion und der Gewebeneubildung ließen sich weitere Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen ausmachen. In den ersten zwei Tagen nach der Verletzung konnte bei keiner Gruppe neue Haut nachgewiesen werden (Abb.

Die starke Abnahme der Wundgröße in der Kontrollgruppe und die weniger deutlich reduzierte Wundfläche der Mäuse mit einer undurchlässigen Wundauflage waren vermehrt auf eine Wundkontraktion zurückzuführen (Abb. 10). Aus Abbildung 10 wird außerdem ersichtlich, daß die vollständige Heilung größtenteils aus einer Kontraktion der Wunden resultierte, was sich in einem ähnlichen Kurvenverlauf im Vergleich zur Darstellung der relativen Wundheilung (vergleiche Abb. 8) widerspiegelt.

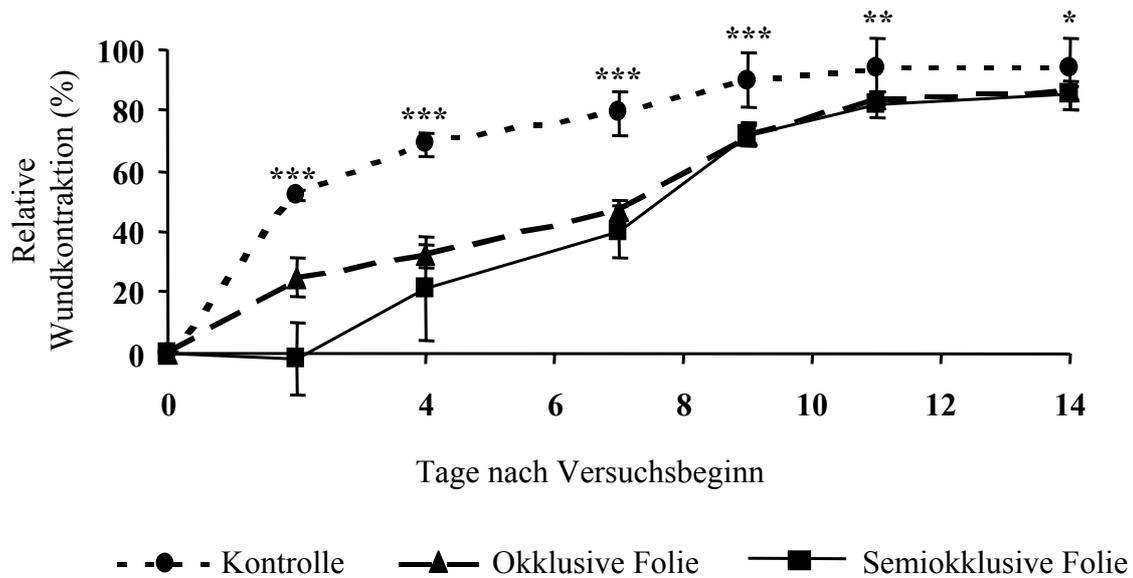


Abb. 10: Relativer Grad der Wundkontraktion von Vollhautwunden (\varnothing 20 mm) in nicht transgenen Mäusen unter dem Einfluß verschiedener Verbandmaterialien. Die Kontrolltiere wurden ohne Wundauflage gehalten. Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Der Heilungsprozeß endete bei den Mäusen insgesamt am schnellsten, die ohne Verband gehalten wurden. Die endgültige Abheilung wurde in der Kontrollgruppe zu 94 % durch Kontraktion der Wundränder und zu sechs Prozent durch Gewebeneubildung erzielt. Durch den Einsatz verschiedener Wundauflagen konnte die Kontraktion der Wunde signifikant verringert werden (Tab. 3). Während die okklusive Wundversorgung dazu führte, daß die Verletzung der Mäuse zu 87 % durch Kontraktion und zu 13 % durch Reepithelialisierung abheilte, wurde die Wundkontraktion mit der durchlässigen Folie um weitere drei Prozent vermindert und der Anteil der Hautneubildung auf 16 % gesteigert.

Tab. 3: Einzelvergleich der Wundkontraktion nach Scheffé an den jeweiligen Untersuchungstagen. n.s. nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

	0	2	4	7	9	11	14
Kontrolle vs. Okklusiver Verband	n.s.	**	**	***	**	*	*
Kontrolle vs. Semiokklusiver Verband	n.s.	***	***	***	***	**	**
Okklusiver Verband vs. Semiokklusiver Verband	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Die untersuchten Parameter Wundheilung, Wundkontraktion sowie Reepithelialisierung ließen einen hoch signifikanten Zusammenhang ($p < 0,01$) erkennen. In allen Versuchsgruppen konnte eine starke Korrelation zwischen der Wundheilung und den anderen beiden Meßgrößen nachgewiesen werden (Tab. 4).

Tab. 4: Korrelationsanalyse zwischen den Heilungsparametern Kontraktion sowie Epithelneubildung und der Wundheilung. Es sind die nach Pearson berechneten Korrelationskoeffizienten angegeben.

	Kontrolle	Okklusiver Verband	Semiokklusiver Verband
Wundkontraktion vs. Wundheilung	0,994	0,998	0,996
Reepithelialisierung vs. Wundheilung	0,773	0,958	0,876

Unabhängig von der Art der Wundbehandlung standen die Kontraktion und die Hautneubildung jeweils in linearer Beziehung zur Wundheilung. Abbildung 11 verdeutlicht dies beispielhaft für die Versuchsgruppe, die mit der semiokklusiven Folie behandelt wurde (Daten der anderen Versuchsgruppen sind nicht gezeigt). Aus den Geraden konnten jeweils Re-gressionsgleichungen abgeleitet werden, so daß bei einem bekannten Heilungsgrad die entsprechende Wundkontraktion und Reepithelialisierung rechnerisch ermittelt werden konnte. In Tabelle 5 sind die Regressionsgeraden aller Versuchsgruppen aufgelistet.

Tab. 5: Regressionsgleichungen, berechnet aus den Meßwertepaaren der Heilungsparameter, Kontraktion sowie Epithelneubildung und der Wundheilung in den einzelnen Versuchsgruppen.

	Kontrolle	Okklusiver Verband	Semiokklusiver Verband
Wundkontraktion vs. Wundheilung	$y = 0,9379 \cdot x$	$y = 0,8877 \cdot x$	$y = 0,8617 \cdot x$
Reepithelialisierung vs. Wundheilung	$y = 0,6335 \cdot x$	$y = 0,1131 \cdot x$	$y = 0,1335 \cdot x$

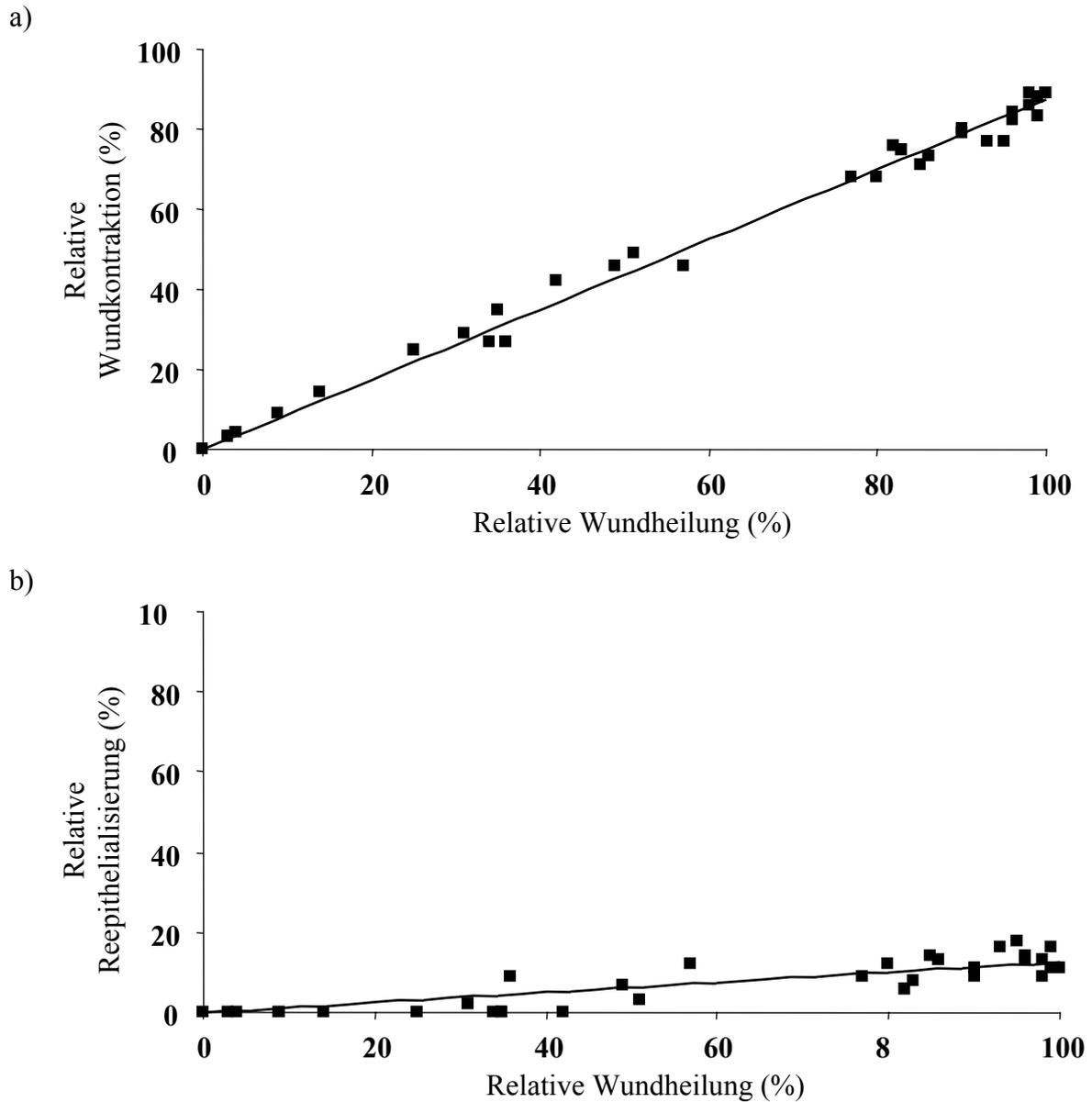


Abb. 11: Regressionsanalysen der Wundkontraktion (a) und der Epithelneubildung (b) beim Einsatz einer semiokklusiven Wundauflage mit der Wundheilung.

Mit Hilfe eines Verbandes ließ sich im Mausmodell die Wundkontraktion reduzieren (Abb. 12). Die Behandlung mit einer okklusiven Folie führte zu einer starken Irritation der gesunden Hautareale, erkennbar an der Rötung, die auf einer Erweiterung der dermalen Blutgefäße beruhte. Mit der semiokklusiven Wundabdeckung wurde die Wundkontraktion ohne erkennbare Hautrötung reduziert.

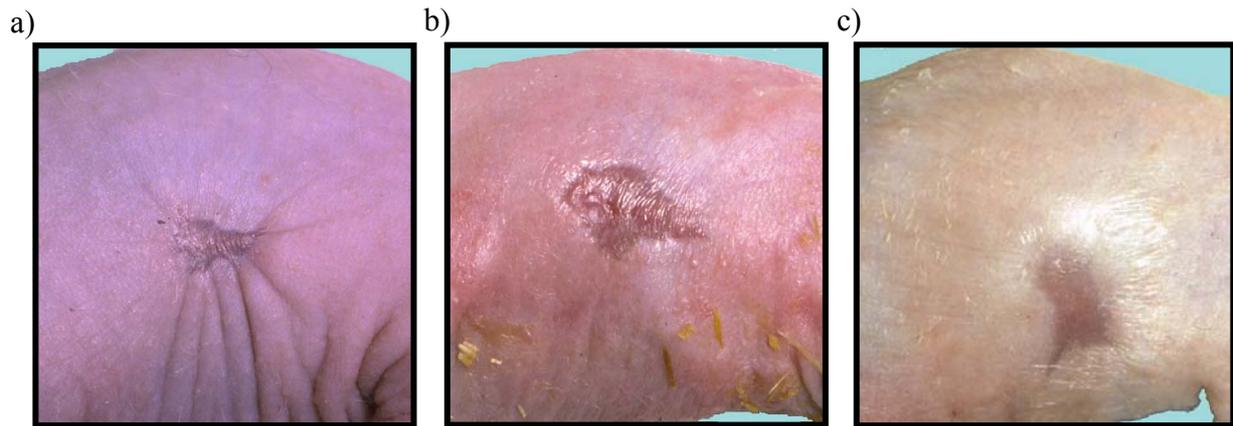


Abb. 12: Darstellung der Mausflanken nach der Abheilung. Bild a) ohne Wundbehandlung; b) nach Behandlung mit einer okklusiven und c) mit einer semiokklusiven Folie.

Ein weiterer wichtiger Vorgang bei der Heilung von Hautwunden wird der Zellmigration zugesprochen, die anhand der Phospho-STAT-3 Expression untersucht wurde. Einzelne Keratinozyten wandern aus gesunden Hautarealen in das Wundfeld ein. Die Zellen beteiligen sich dann durch Zellvermehrung aus dem Wundzentrum heraus an der Abheilung der Verletzung. Abbildung 13 zeigt, daß die Zellmigration durch die Wundaufgaben verändert wurde. Während in der Kontrollgruppe ohne Verband die Keratinozyten vor allem zu einem frühen Stadium des Heilungsprozesses migrierten, verlagerte sich das Wanderungsverhalten beim Einsatz eines Verbandes auf den mittleren bis späten Zeitraum des Abheilens. Der Anteil an migrierenden Zellen fiel dabei am höchsten unter der semiokklusiven Folie aus. Alle Werte wurden relativ zu „Tag 3 ohne Verband“ berechnet (siehe Abb. 13).

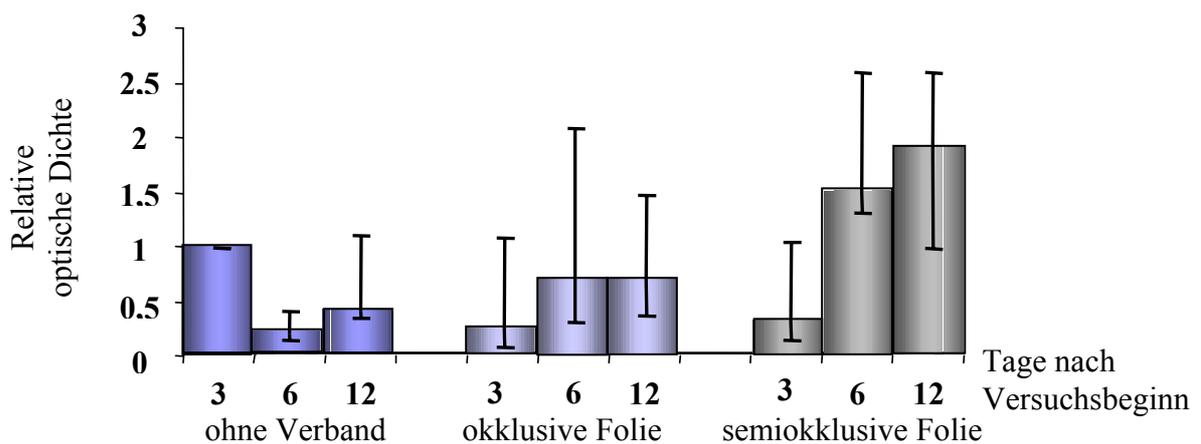


Abb. 13: Phospho-STAT-3 Expression in wandernden Keratinozyten unter dem Einfluß verschieden okklusiver Verbände während der Wundheilung. Wegen des geringen Stichprobenumfangs sind die Werte als Median \pm Interquartile angegeben.

3.1.2 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase in verschiedenen Stadien der Wundheilung

Bei einer äußeren Verletzung beginnen die Keratinozyten durch Proliferations- und Differenzierungsprozesse mit der Erneuerung der Haut. Eine besondere Bedeutung für die Signalübermittlung in der Wundheilung kommen den proinflammatorischen Zytokinen TNF α und IL-1 zu, da sie bereits sehr früh nach der Verletzung sezerniert werden und andere Zellen stimulieren, weitere Botenstoffe freizusetzen. Ein zentrales Element der Signaltransduktion in den Keratinozyten, das durch diese proinflammatorischen Zytokine ausgelöst wird, stellen die Sphingomyelinasen (SMasen) dar.

An Wildtyp-Mäusen wurde nach einer Verletzung der Fibrinbelag, das Granulationsgewebe sowie neugebildetes Epithel und die Wundränder untersucht, um zu klären, in welcher Phase der Wundheilung die Sphingomyelinasen besonders aktiv sind.

Die neutrale Sphingomyelinase wies während der Entzündungsphase, die anhand des Fibrins untersucht wurde, mit $0,21 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ nur eine geringe Enzymaktivität auf (Abb. 14). Im Granulationsgewebe, das drei bis vier Tage nach der Verwundung durch seine netzartige Struktur in der Wunde erkennbar war, konnte eine Enzymaktivität kaum nachgewiesen werden ($0,05 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$). In der Phase der Reepithelialisierung wurde zwischen dem neugebildeten Epithel und dem Wundrand unterschieden. Der Wundrand besteht aus unverletzter Haut, der direkt an die offene Wunde angrenzt. Im Gegensatz zu dem neugebildeten Epithel weist dieser dadurch ein anderes Differenzierungsstadium auf. Es zeigte sich, daß die regenerierte Haut in der N-SMase Aktivität das gleiche Niveau wie im Fibrin und Granulationsgewebe erreichte. Im Gegensatz dazu wurde im Wundrand, der nach der Abheilung der Verletzung entnommen wurde, eine höchst signifikant höhere Aktivität der neutralen Sphingomyelinase nachgewiesen.

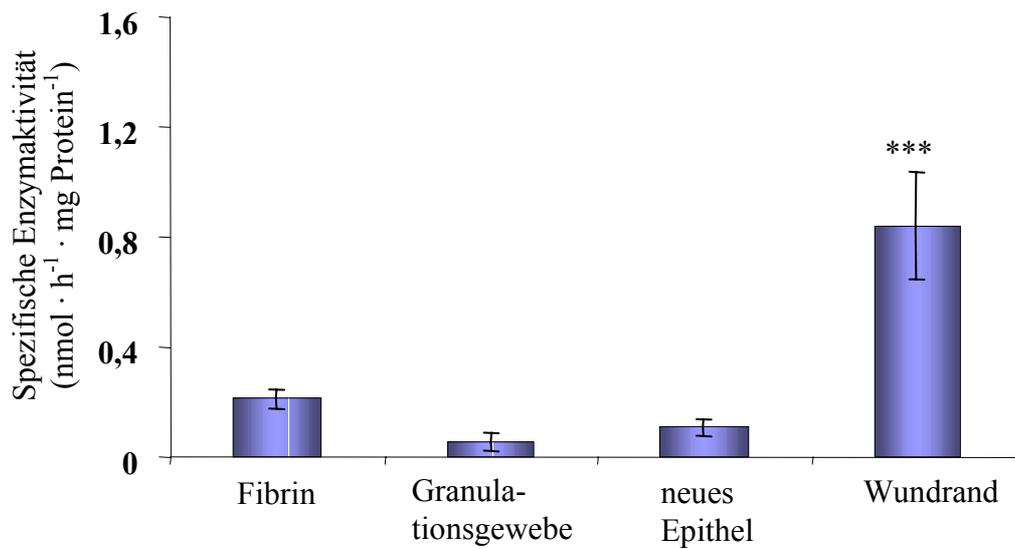


Abb. 14: Spezifische Aktivität der neutralen Sphingomyelinase in verschiedenen Strukturen während der Wundheilung. Mittelwert \pm Standardabweichung; *** $p < 0,001$.

Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase fiel in den verschiedenen Geweben ähnlich aus. Während weder im Fibrin noch im Granulationsgewebe nennenswerte Enzymaktivitäten nachweisbar waren, zeigte das neugebildete Epithel mit $1,5 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ eine leichte A-SMase Aktivität (Abb. 15). Es ist bekannt, daß der saure SMase-Typ eine zehnfach höhere Aktivität aufweist als die neutrale Form dieses Isoenzym (SCHÜTZE et al., 1992; JENSEN et al., 1999). Die bereits für die neutrale Sphingomyelinase höchste Aktivitätsrate wurde auch für die A-SMase im Wundrand nachgewiesen. Dort konnte eine durchschnittliche Aktivität von $13,9 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ ermittelt werden, was zu einem höchst signifikanten Unterschied gegenüber den anderen Gewebestrukturen der Wunde führte.

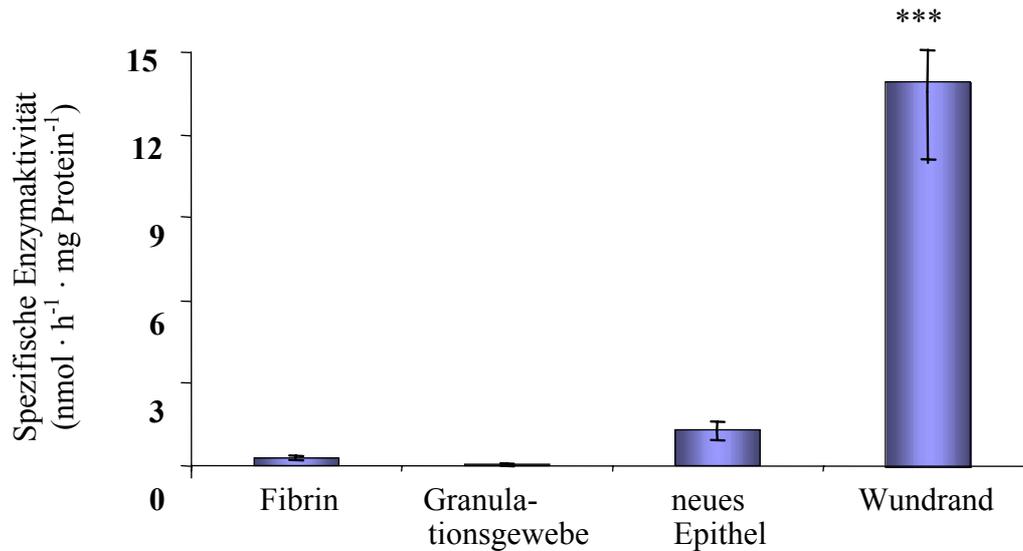


Abb. 15: Spezifische Aktivität der sauren Sphingomyelinase in verschiedenen Geweben während der Wundheilung. Mittelwert \pm Standardabweichungen; *** $p < 0,001$.

3.1.3 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase des Wundrandes im Verlauf der Wundheilung

Nachdem der Wundrand als der Bereich einer Vollhautwunde mit der höchsten SMase-Aktivität ermittelt worden war, wurde untersucht, ob die Sphingomyelinasen während des Heilungsprozesses im Wundrand unterschiedlich stark aktiv sind. Zu diesem Zweck wurde die Epidermis zu einem frühen, einem mittleren und einem späten Zeitpunkt der Heilung untersucht. Das an die Wunde angrenzende gesunde Gewebe wurde aus drei, sechs und zwölf Tage alten Verletzungen entnommen.

Zu Beginn der Wundheilung wies die N-SMase nur eine geringe Aktivität auf (Abb. 16). Mit fortschreitender Heilung nahm die Aktivität stetig zu. Zwölf Tage nach Verwundung erreichte die neutrale Sphingomyelinase mit $1,2 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ eine dreifach höhere Aktivität im Vergleich zu den drei Tage alten Wundrändern.

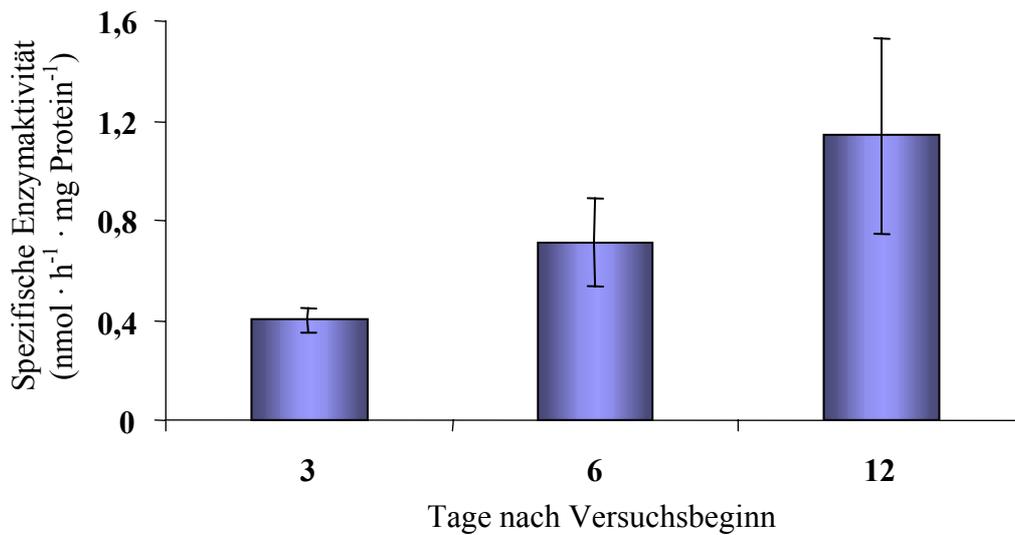


Abb. 16: Spezifische Aktivität der neutralen Sphingomyelinase im Wundrand im Verlauf der Wundheilung. Mittelwert \pm Standardabweichung.

Die zu den gleichen Zeitpunkten untersuchte Aktivität der sauren Sphingomyelinase zeigte wiederum eine Übereinstimmung mit dem Aktivitätsverlauf des neutralen Enzymtyps (Abb. 17).

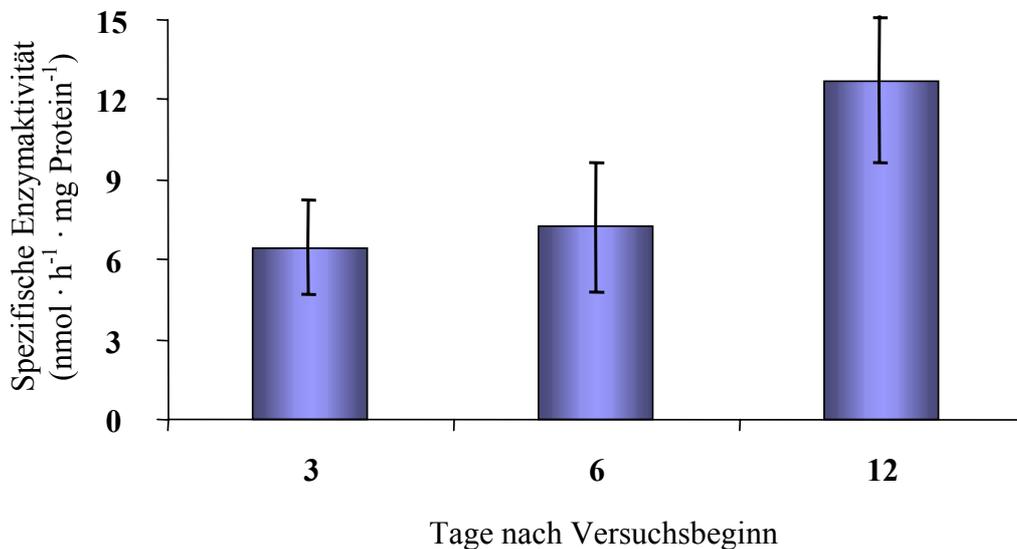


Abb. 17: Spezifische Aktivität der sauren Sphingomyelinase im Wundrand im Verlauf der Wundheilung. Mittelwert \pm Standardabweichung.

In drei bzw. sechs Tage altem Wundrandepithel wurde eine spezifische Aktivität von 6 bis 7 nmol · h⁻¹ · mg Protein⁻¹ nachgewiesen. Zwölf Tage nach der Verletzung stieg die Aktivität der A-SMase auf über 12 nmol · h⁻¹ · mg Protein⁻¹.

3.1.4 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung haarloser Wildtyp-Mäuse

Die Zellproliferation stellt einen wichtigen Vorgang in der Wundheilung dar. Aus der die Wunde umgebenden, intakten Epidermis und dem Epithel der Haarfollikel werden durch Zellteilungen neue Keratinozyten generiert, die schließlich zum Abheilen der Verletzung führen (MARTIN, 1997; SINGER & CLARK, 1999). In welchem Verhältnis die Aktivitäten der neutralen und sauren Sphingomyelinase zur Proliferation stehen, wurde an nicht transgenen, haarlosen Mäusen untersucht.

In den histologischen Präparaten drei Tage alter Wundränder lag die Proliferation bei zwölf Zellen pro ausgezähltem Gesichtsfeld im Vergleich zu etwa einer Zelle pro Gesichtsfeld in unverletzter Haut (Abb. 18). Daraus resultierte eine höchst signifikant höhere Zellteilungsrate im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zeitpunkten der Wundheilung. Mit fortschreitender Heilung der verletzten Flankenhaut sank die Anzahl mitotisch aktiver Zellen in der Basallamina der Epidermis. In einem mittleren Heilungsstadium waren durchschnittlich noch 3,3 Zellen teilungsaktiv. Damit zeigten die Wundrandepithelien eine sich zum Ende des Heilungsprozesses verringernde Proliferation, die sich mehr und mehr dem Mitoseaktivitätsniveau in gesunder Haut annäherte.

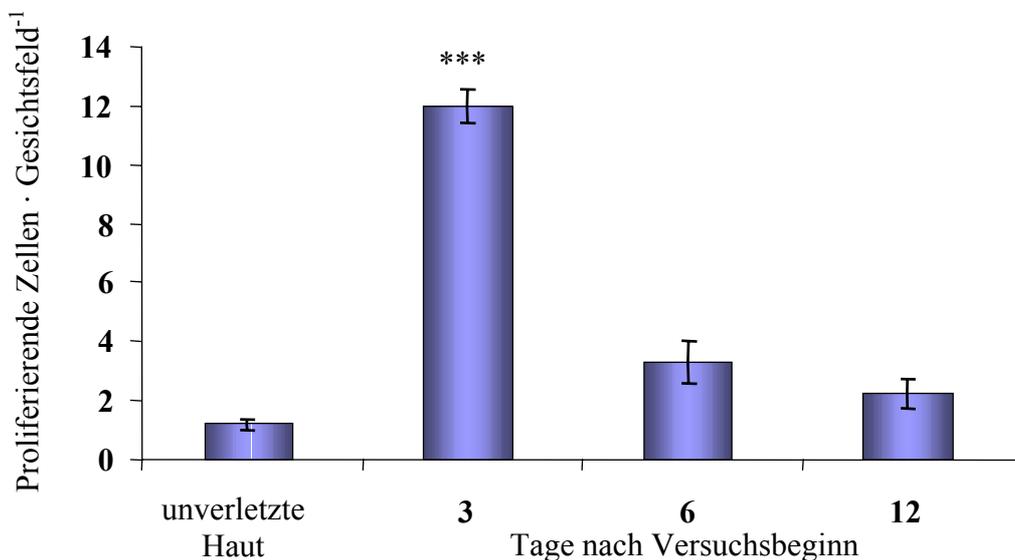


Abb. 18: Epidermale Proliferation im Bereich des Wundrandes im zeitlichen Verlauf der Wundheilung. Mittelwert \pm Standardabweichung; *** $p < 0,001$.

Die Proliferation der Keratinozyten des Wundrandes war somit in der Anfangsphase der Heilung am höchsten, während die höchste Aktivität beider Sphingomyelinase-Isoenzyme am Ende des Abheilens nachzuweisen war (vergleiche 3.1.3). Negative Korrelationskoeffizienten

deuten auf einen gegenläufigen Verlauf der Proliferation und der SMase-Aktivitäten hin (Tab. 6).

Tab. 6: Korrelationsberechnung der SMase-Aktivitäten und der Proliferation im Wundrand während der Heilung nach Pearson.

	Proliferation
Neutrale Sphingomyelinase-Aktivität	-0,853
Saure Sphingomyelinase-Aktivität	-0,690

3.1.5 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung haarloser Wildtyp-Mäuse

Die Differenzierung der neugebildeten Keratinozyten stellt den Abschluß des Heilungsprozesses dar. Die Homöostase der Haut wird wieder hergestellt, indem die Keratinozyten als kernlose Korneozyten mit in den interzellularen Raum eingelagerten Lipiden das Stratum corneum, die Permeabilitätsbarriere der Haut, bilden. Ein möglicher Zusammenhang der Sphingomyelinase-Aktivitäten und der Keratinozytendifferenzierung wurde anhand von Vollhautexzisionen haarloser Mäuse im Verlauf der Wundheilung untersucht.

Als Nachweis für den jeweiligen Differenzierungsstatus der Epidermis wurde die Expression zweier Proteine des „cornified envelope, (CE)“, Loricrin und Involucrin, immunhistologisch und mit Hilfe der Westernblot-Analyse ermittelt. An Mikrotomdünnschnitten konnte gezeigt werden, daß in nicht geschädigter Haut nur die äußerste Zelllage der Epidermis Involucrin und Loricrin expremiert (Abb. 19). In einer frühen Heilungsphase nach einer Verletzung wies der angrenzende Wundrand den gleichen Gehalt an Loricrin auf wie ungeschädigte Haut. Das zu einem früheren Zeitpunkt in das CE eingebaute Involucrin konnte dagegen in drei Tage alten Wundrändern in den beiden äußersten Zellschichten der Epidermis nachgewiesen werden. Im Laufe der Wundheilung verdickte sich die Epidermis und die Expression der beiden CE-Proteine weitete sich auf mehrere Zellagen aus. Die erhöhte Ausprägung der Differenzierungsproteine verringerte sich zum Ende des Heilungsprozesses nur geringfügig.

Mit Hilfe der Westernblot-Technik konnte die Expression der Differenzierungsproteine quantifiziert werden. Abbildung 20 verdeutlicht, daß in der Epidermis etwa drei- bis viermal soviel Involucrin wie Loricrin gebildet wurde. Während sich im Verlauf der Wundheilung die Menge an Loricrin nur unwesentlich änderte, erhöhte sich der Anteil an Involucrin zeitweise um das fünffache in Relation zu unverletzter Haut (Tag 6, $p < 0,01$).

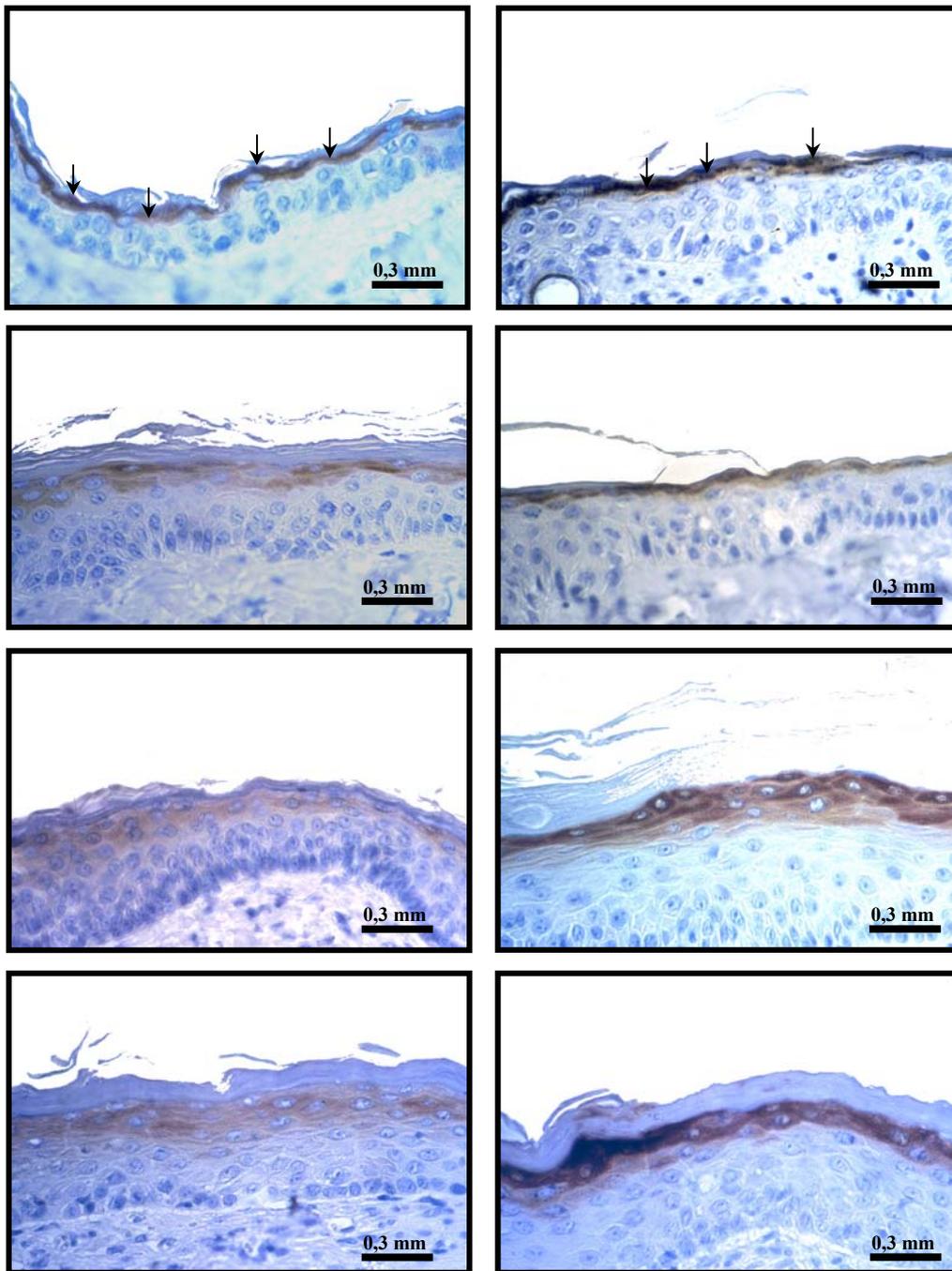
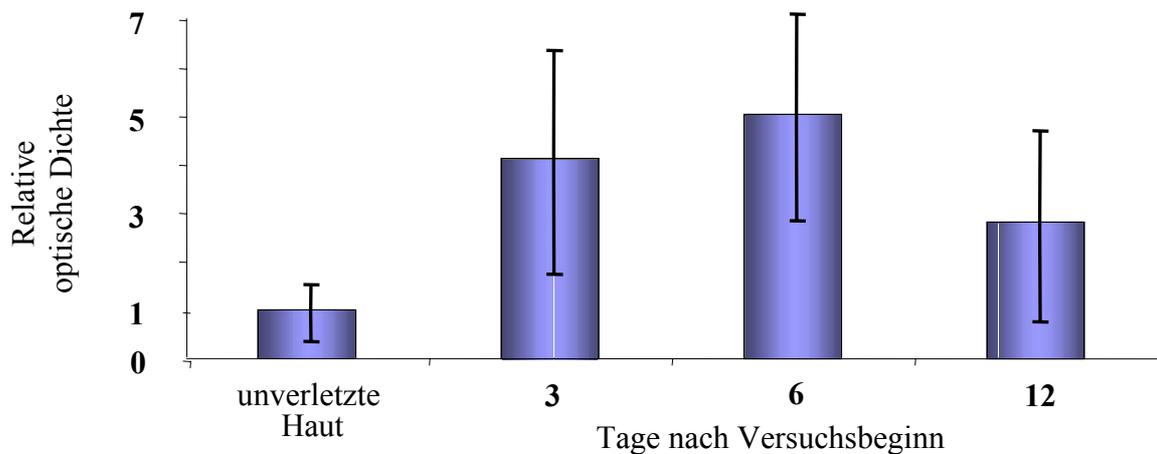


Abb. 19: Expression von CE-Proteinen in der Maushaut während der Wundheilung. Von oben nach unten ist jeweils die Expression von Involucrin (links) und Loricrin (rechts) in un behandelter Haut sowie in drei, sechs und zwölf Tage altem Wundrandepithel dargestellt. Die Proteine sind braun gefärbt und in den oberen Abbildungen durch Pfeile gekennzeichnet.

a)



b)

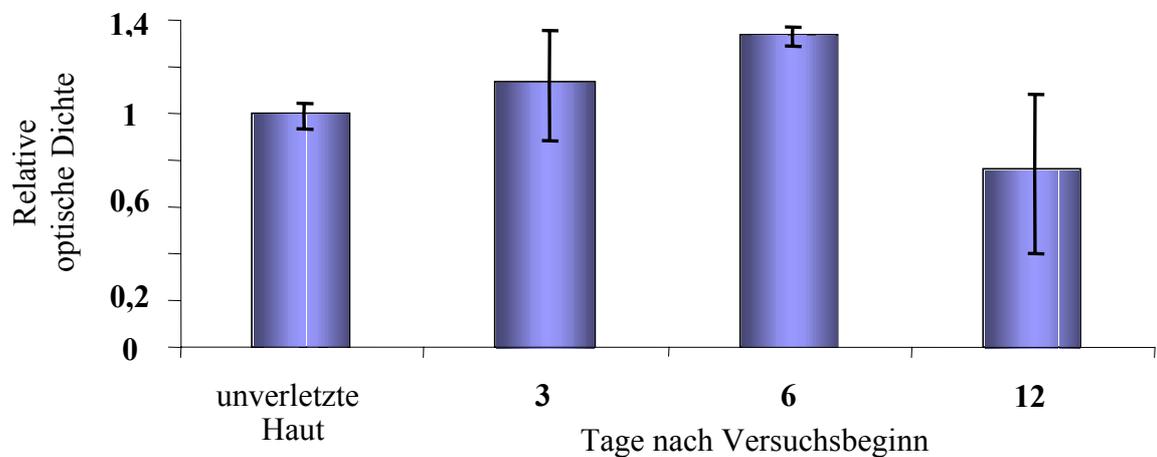


Abb. 20: Expression der „cornified envelope“-Proteine Involucrin (a) und Loricrin (b) während der Wundheilung haarloser Wildtyp-Mäuse in Relation zu unverletzter Haut. Mittelwert \pm Standardabweichung.

Obwohl ein starker Zusammenhang zwischen den Aktivitäten der Sphingomyelinasen und der Differenzierung der Keratinozyten ermittelt wurde, konnte nach Pearson keine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Meßgrößen ermittelt werden (Tab. 7). Die neutrale SMase-Aktivität wies darüber hinaus zu der Involucrin-Expression nur eine schwache Korrelation auf. Die Koeffizienten ließen einen negativen Zusammenhang vermuten.

Tab. 7: Korrelation zwischen den SMase-Aktivitäten und der Differenzierung im Wundrand haarloser Mäuse während der Heilung.

	Involucrin-Expression	Loricrin-Expression
Neutrale Sphingomyelinase-Aktivität	-0,397	-0,767
Saure Sphingomyelinase-Aktivität	-0,739	-0,898

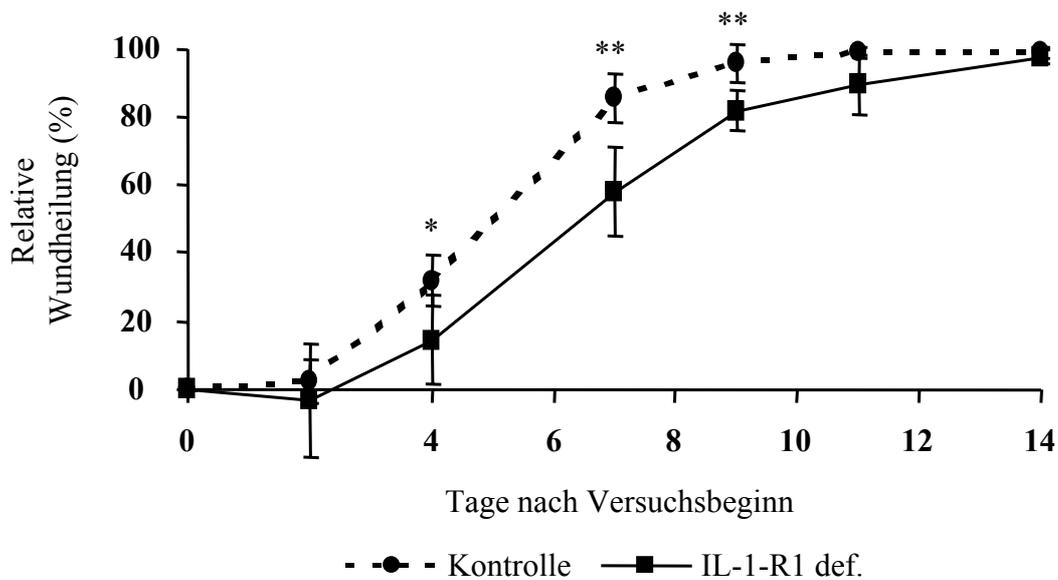
3.2 Untersuchungen von Vollhautwunden an transgenen Mäusen

3.2.1 Wundheilung transgener Mäuse mit IL-1-R1 Defizienz

IL-1 wird als proinflammatorisches Zytokin bezeichnet, da es nach einer Verletzung als einer der ersten Botenstoffe von Zellen der Immunabwehr (Lymphozyten, Granulozyten sowie Monozyten) und den Keratinozyten sezerniert wird. Die Signalübertragung von IL-1 α /- β stellt daher ein wichtiges Element dar, um die Reparaturmechanismen nach einer Organschädigung zu aktivieren. Wie sich eine gestörte Signaltransduktion in IL-1-Rezeptor 1 defizienten Mäusen während der Heilung nach Totalexzision von kreisförmigen Hautarealen mit 10 bzw. 20 mm Durchmesser auswirkt, wurde an transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Die Untersuchungen zeigten, daß eine IL-1-R1 Defizienz die Wundheilung signifikant verzögerte (Abb. 21). Die Verzögerung war dabei teilweise von der Wundgröße abhängig. Während bei einer kreisförmigen Wunde mit einem Durchmesser von zehn Millimetern die Heilung hoch signifikant verzögert war, erholte sich bei einer viermal so großen Wundfläche (\varnothing 20 mm) keine der transgenen Mäuse von der Verletzung (Abb. 21). Die letzte defiziente Maus verstarb elf Tage nach Versuchsbeginn, obwohl bereits deutliche Zeichen einer Abheilung erkennbar waren. Die größere Verletzung führte auch bei den nicht transgenen Kontrolltieren zunächst zu einer Weitung der Wunde, wodurch eine scheinbar negative Heilung suggeriert wurde. Die ersten Tage des Heilungsprozesses zeigten außerdem, daß einige IL-1-R1 defiziente Mäuse bei einer größeren Verwundung zunächst sogar eine unveränderte Wundheilung aufwiesen.

a)



b)

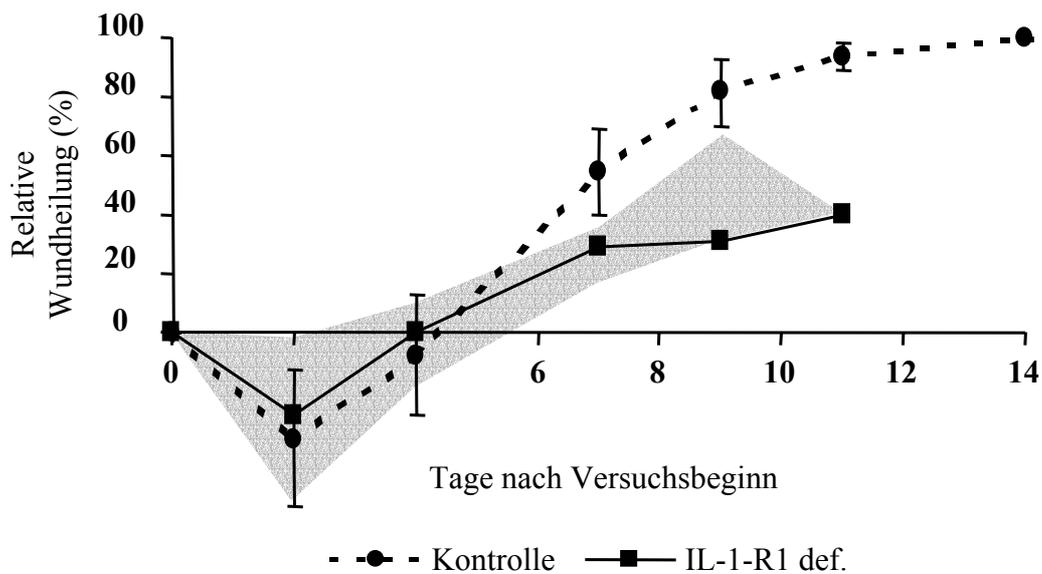
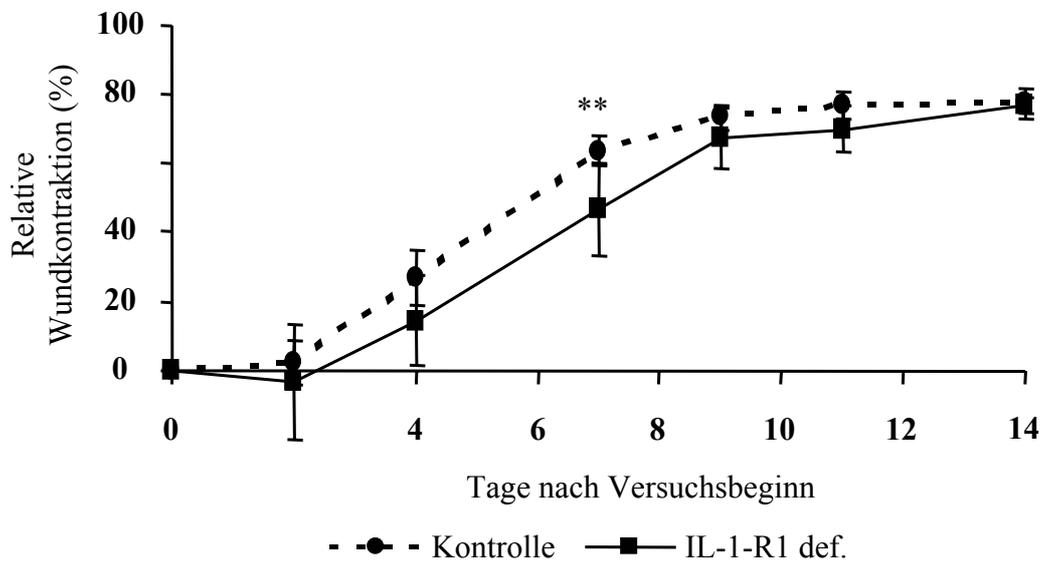


Abb. 21: Heilungsverlauf von kreisförmigen Hautwunden (\varnothing 10 mm (a) und 20 mm (b)) IL-1-R1 defizienter Mäuse. Die grau unterlegte Fläche zeigt den Bereich des Heilungserfolges der während der Untersuchung verstorbenen defizienten Mäuse an. Die durchgezogene Linie zeigt den Heilungsverlauf, der einzigen transgenen Maus, die bis zum elften Tag überlebte. Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Bei der Betrachtung der Wundparameter, Geweberegenerierung und Wundkontraktion, wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Bei der kleineren Verwundung verringerte sich das Wundareal in beiden Mausgruppen am Ende zu etwa 80 % durch Kontraktion der Wundränder und führte mit einer zwanzigprozentigen Reepithelialisierung schließlich zur Abheilung (Abb. 22 und 23). Die Kontrolle zeigte den gleichen Verlauf ebenfalls nach der

größeren Verletzung. Die Hautneubildung setzte jedoch mit einer zeitlichen Verzögerung von zwei Tagen ein.

a)



b)

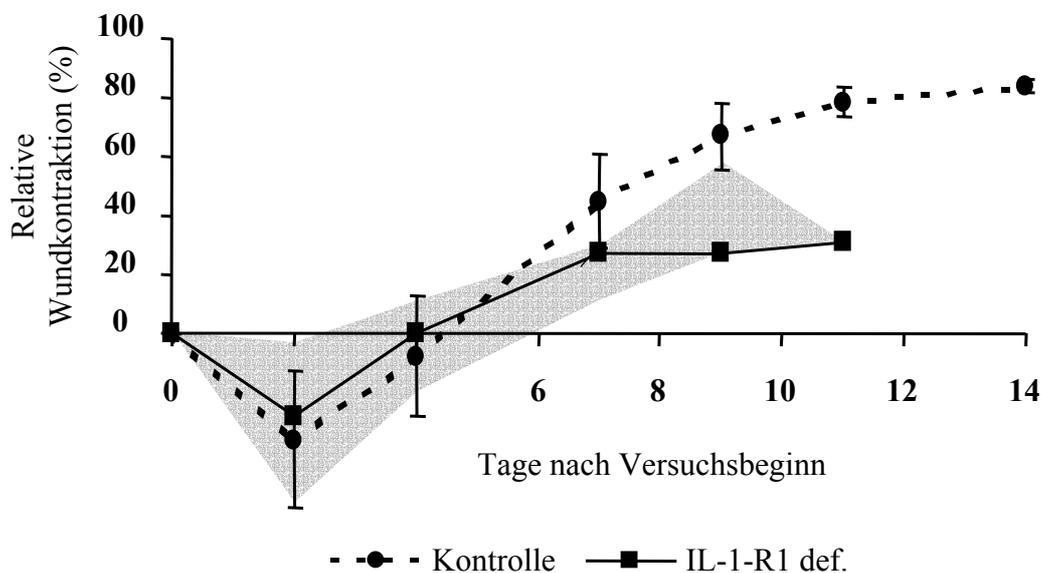
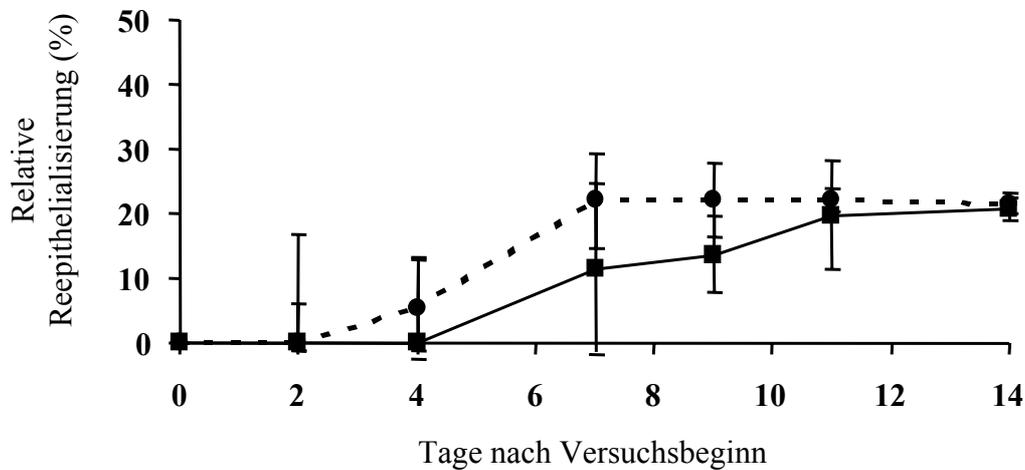


Abb. 22: Wundkontraktion bei IL-1-R1 defizienten Mäusen nach Totalexzision eines kreisförmigen Hautareals (\varnothing 10 mm (a) und 20 mm (b)). Mittelwert \pm Standardabweichung; ** $p < 0,01$. Nähere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 21.

Die Epithelregenerierung (Abb. 23) zeigt darüber hinaus, daß bei einer IL-1 Rezeptor 1 Defizienz nach einer Vollhautexzision die Hautneubildung weniger stark ausgeprägt war wie bei

den Kontrollmäusen. Unabhängig von der Wundgröße war das erste regenerierte Gewebe jeweils am siebten Tag nach Versuchsbeginn zu erkennen.

a)



b)

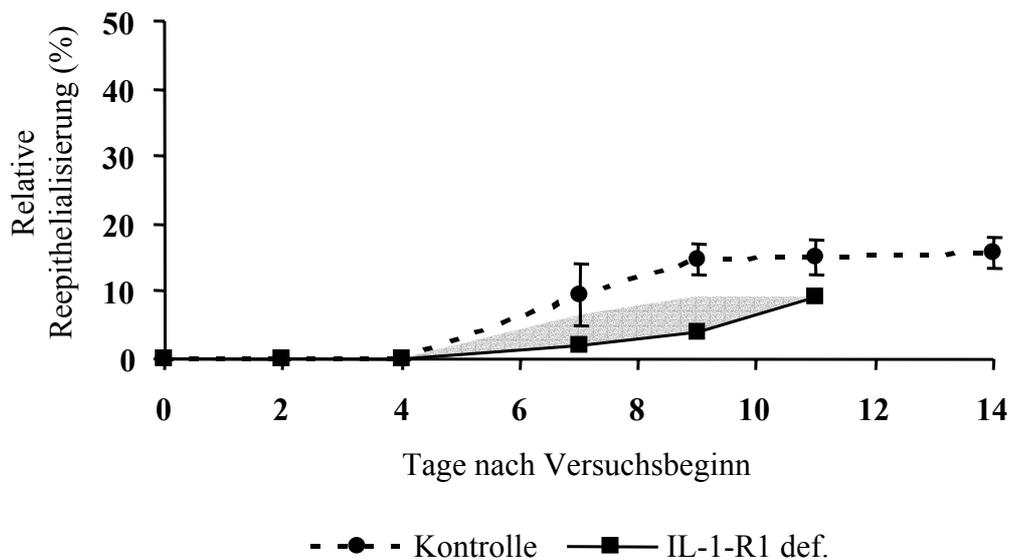


Abb. 23: Hautneubildung nach Verletzung (\varnothing 10 mm (a) und 20 mm (b)) bei IL-1-R1 defizienten Mäusen. Mittelwert \pm Standardabweichung. Nähere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 21.

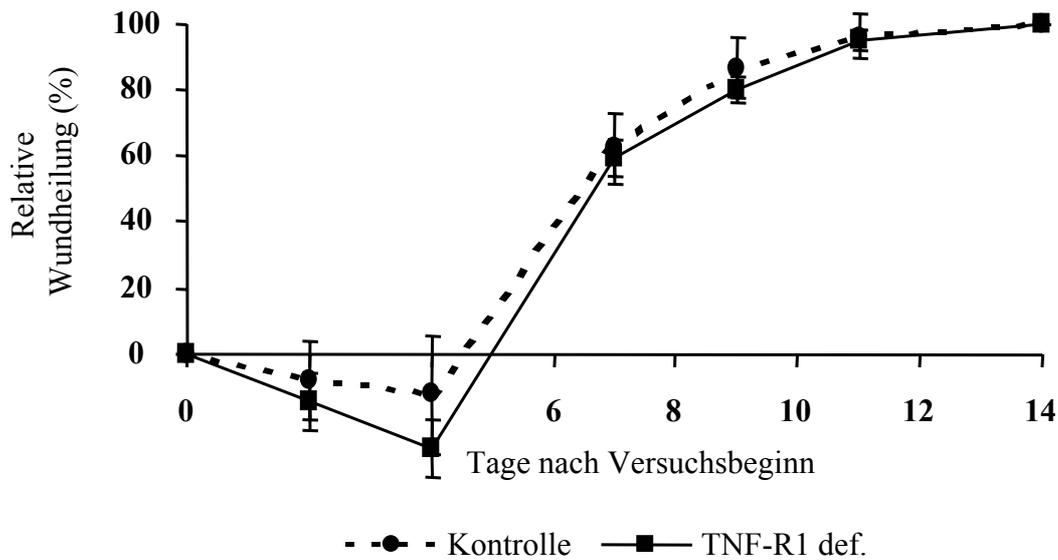
3.2.2 Wundheilung transgener Mäuse mit TNF-R1 Defizienz

Neben IL-1 zählt auch der Tumor Nekrose Faktor zu den proinflammatorischen Zytokinen. TNF α induziert in den Zielzellen dabei teilweise die gleichen Signale wie das Interleukin 1. Wie sich eine unterbrochene TNF α -Signaltransduktion auf die Heilung verschieden großer

Hautverletzungen auswirkt, wurde anhand TNF-Rezeptor 1 defizienter Mäuse im Vergleich zu nicht transgenen Tieren untersucht.

Es zeigte sich, daß die transgenen Mäuse eine Verwundung von zehn Millimetern Durchmesser überlebten und auch bei einer Vervierfachung der Wundfläche nicht an der Verletzung starben. In beiden Versuchsansätzen weiteten sich die Wunden in den ersten Tagen zunächst (Abb. 24). In den Kontrollgruppen fiel die Wundweiterung dabei weniger stark aus. Während die Heilung der kleineren Wunden der TNF-R1 defizienten Mäuse ohne zeitliche Verzögerung vonstatten ging, resultierte aus der größeren Wunde einer hoch bis höchst signifikant verzögerte Wundheilung. Vierzehn Tage nach Versuchsbeginn waren die Wunden der trans-genen Tiere erst zu 80 %, die der Kontrolltiere dagegen vollständig abgeheilt.

a)



b)

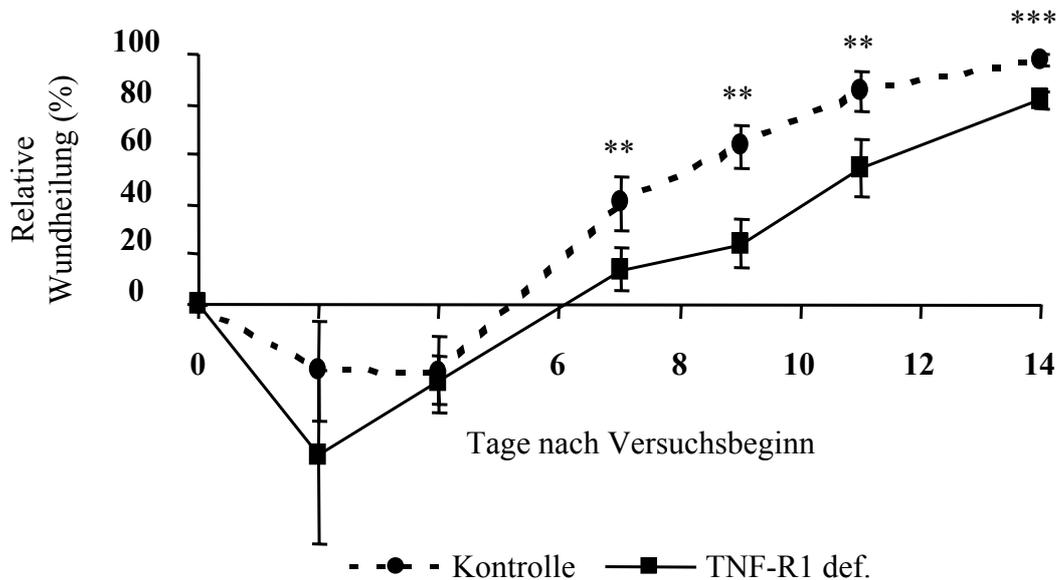
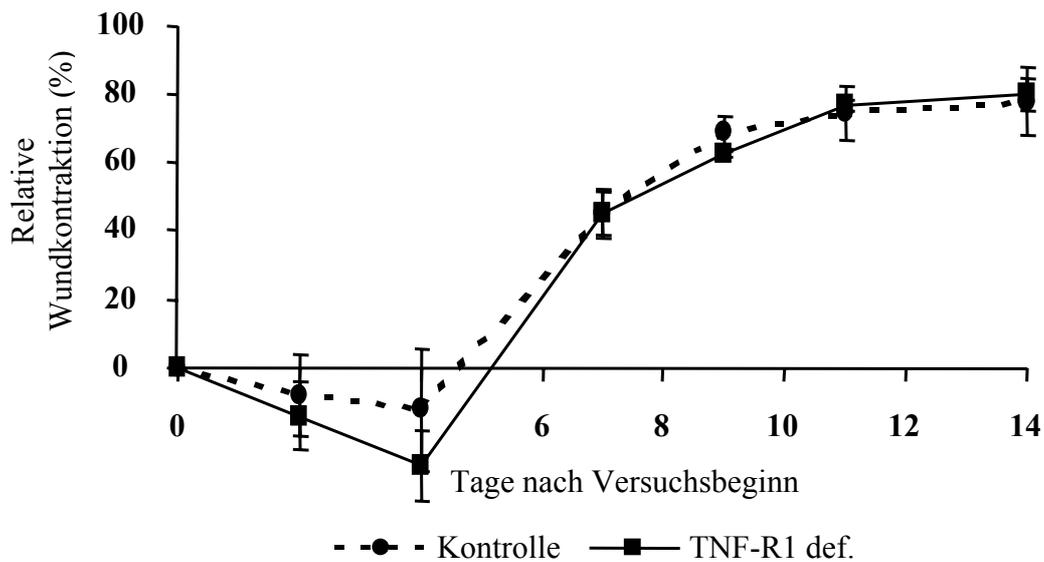


Abb. 24: Heilungsverlauf von kreisförmigen Hautwunden (\varnothing 10 mm (a) und 20 mm (b)) TNF-R1 defizienter Mäuse. Mittelwert \pm Standardabweichung; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die verzögerte Abheilung spiegelte sich in der Wundkontraktion und der Reepithelialisierung wider (Abb. 25 und 26). Beide Versuchsgruppen wiesen nach der Abheilung der kleineren Vollhautwunden ca. 20 % neues Gewebe auf. 80 % der Wunde schlossen sich jeweils durch Kontraktion.

a)



b)

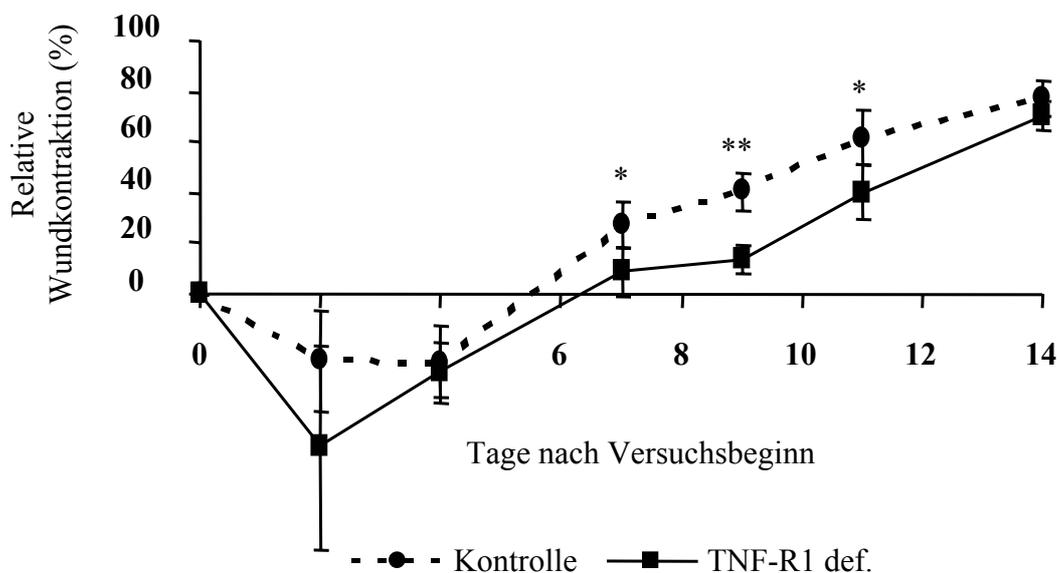
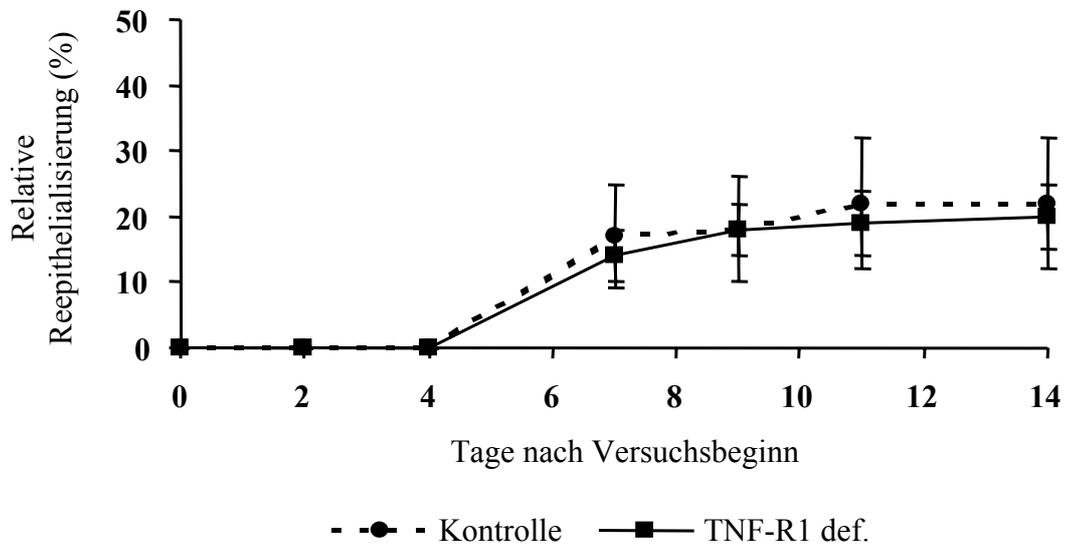


Abb. 25: Wundkontraktion bei TNF-R1 defizienten Mäusen nach Totalexzision eines kreisförmigen Hautareals (\varnothing 10 mm (a) und 20 mm (b)). Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Bei den kreisförmigen Vollhautwunden mit 20 mm Durchmesser wurden für die Kontrollmäuse die gleichen Resultate erzielt. Es bildete sich circa 20 % neue Haut, und 80 % der Heilung war durch Kontraktion der Wundränder bedingt. Bei den TNF-R1 defizienten Tieren verringerte sich der Anteil des neugebildeten Epithels bei der Heilung der größeren Verletzungen signifikant (Abb. 26).

a)



b)

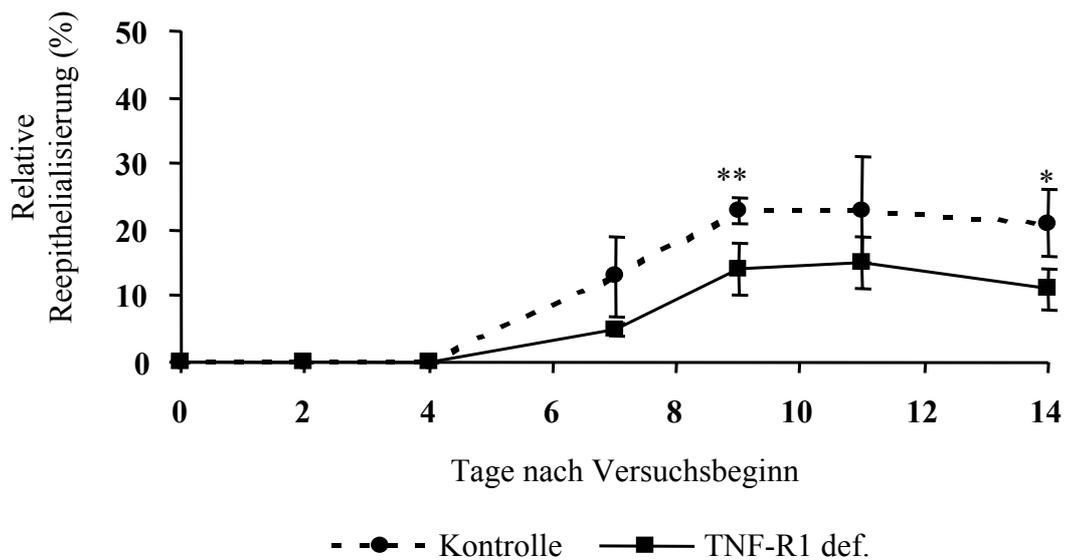


Abb. 26: Hautneubildung nach Verletzung (\varnothing 10 mm (a) und 20 mm (b)) bei TNF-R1 defizienten Mäusen. Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.2.3 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung IL-1-R1 und TNF-R1 defizienter Mäuse

Die beiden Ligand/Rezeptorsysteme, IL-1/IL-1-R1 und TNF α /TNF-R1, vermitteln unabhängig voneinander ein Signal, das Keratinozyten zur Zellteilung anregt. An Mäusen mit einer einfachen Rezeptordefizienz für den IL-1-R1 bzw. für den TNF-R1 wurde untersucht, ob bei einer tiefen Verletzung die epidermale Proliferation und somit die Hautregeneration beeinflusst wird.

Im Vergleich transgener Mäuse mit einer IL-1 Rezeptor 1 Defizienz zu Wildtyp-Mäusen konnte weder in unverletzter Haut noch während des Verlaufes der Wundheilung ein signifikanter Unterschied bezüglich der Keratinozyten-Proliferation ermittelt werden (Abb. 27 a). In beiden Versuchsgruppen verringerte sich die Proliferation mit fortschreitender Heilung vom dritten Tag an bis zum zwölften Tag nach Versuchsbeginn.

TNF Rezeptor 1 defiziente Mäuse wiesen in unverletzter Haut ebenfalls keine abnormen Proliferationswerte auf (Abb. 27 b). Auffällig war jedoch die unterschiedliche Proliferation in unverletzter Haut zwischen den Kontrollgruppen der beiden Versuchsansätze, obwohl jeweils der gleiche Mausstamm, C57Bl/6, als Wildtyp-Kontrolle benutzt worden war (vergleiche Abb. 27 a) und b). Eine übergreifende Interpretation der Ergebnisse konnte so nur bedingt vorgenommen werden. In wundheilungsaktivem Gewebe der TNF-R1 transgenen Mäuse zeigte sich eine signifikant verringerte Proliferation. Während diese bei den Wildtyp-Mäusen zum Ende des Heilungsprozesses, wie schon im ersten Versuchsansatz, abnahm, blieb die Keratinozyten-Proliferation der TNF-R1 defizienten Tiere unverändert.

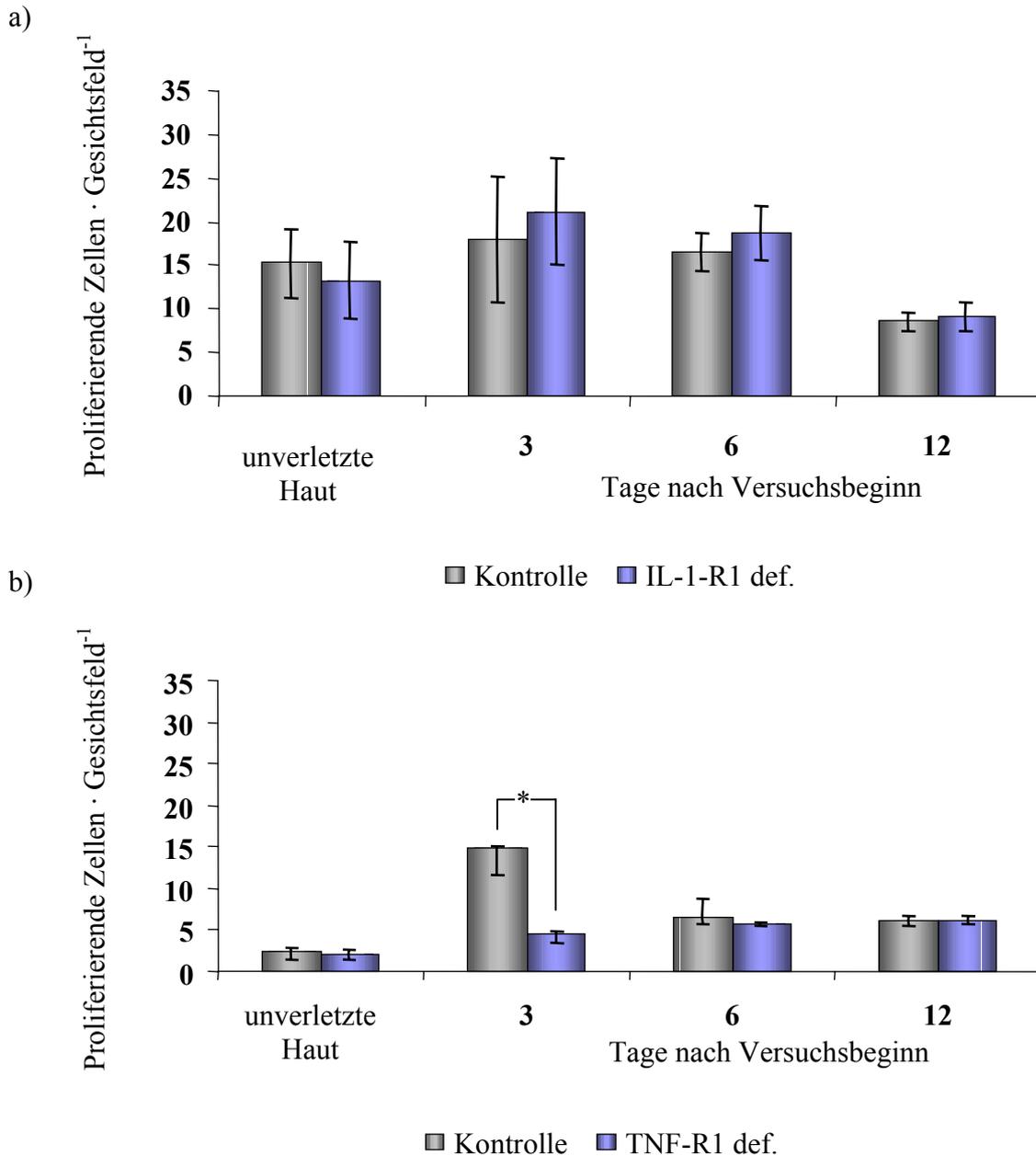


Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis der Proliferation im Wundrand während der Heilung transgener Mäuse mit IL-1-R1 (a) oder TNF-R1 Defizienz (b). Mittelwert \pm Standardabweichungen (a); Wegen des geringeren Stichprobenumfangs sind die Werte in (b) als Median \pm Interquartile angegeben; * $p < 0,05$.

3.2.4 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung IL-1-R1 und TNF-R1 defizienter Mäuse

Die Differenzierung stellt neben der Proliferation einen weiteren wichtigen Vorgang in der Wundheilung dar. Inwieweit die beiden Ligand/Rezeptorsysteme, IL-1/IL-R1 und TNF/TNF-R1, in diesen Prozeß eingebunden sind, wurde an IL-1-R1 und TNF-R1 defizienten Mäusen untersucht. Die Differenzierung der Keratinozyten wurde immunhistologisch anhand der Involucrin- und Loricrinexpression nachgewiesen.

In Wundrandpräparaten nicht transgener Kontrollmäuse zeigte sich, daß Involucrin in unverletzter Haut in den beiden obersten lebenden Zellagen expremiert wurde, während Loricrin nur in der äußersten Zellschicht nachweisbar war (Abb. 28). Im Laufe der Wundheilung erhöhte sich die Anzahl der epidermalen Zellreihen. Die Expression beider „cornified envelope“-Proteine dehnte sich jedoch erst in einem mittleren Genesungsstadium, erkennbar in sechs Tage alten Wundrändern, auf tiefer liegende Hautbereiche aus. Mit dem Abheilen ging sowohl die Hautdicke als auch die Expression von Involucrin und Loricrin auf das Maß unbehandelter Maushaut zurück.

In unverletzter Haut IL-1 Rezeptor 1 defizienter Mäuse zeigte Involucrin eine ähnliche Ausprägung in der ersten und zweiten oberen epidermalen Zellreihe wie in den Kontrolltieren (Abb. 29). Loricrin war dagegen auf den äußersten Rand der oberen Zellschicht begrenzt. Während der Gehalt an Involucrin in drei Tage alten Wundrandepithelien wiederum das gleiche Erscheinungsbild wie bei den Kontrolltieren aufzeigte (vergleiche Abb. 28), dehnte sich die Loricrinexpression zu diesem Zeitpunkt bereits auf zwei Zellreihen aus. Im weiteren Wundheilungsverlauf ließen sich dann keine maßgeblichen Unterschiede mehr zwischen den transgenen Mäusen und den Kontrolltieren ausmachen.

Im Vergleich der TNF Rezeptor 1 defizienten Mäuse zu den Kontrollen war der Involucrinanteil in unverletzter Haut ähnlich. Die Loricrinexpression entsprach mehr der der IL-1-R1 defizienten Mauslinie und war auf den äußeren Rand der oberen Zellschicht beschränkt (Abb. 30). Beide „cornified envelope“-Proteine zeigten im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine bis zum zwölften Tag nach der Verwundung anhaltend hohe Expression in den TNF-R1 defizienten Mäusen (vergleiche Abb. 28).

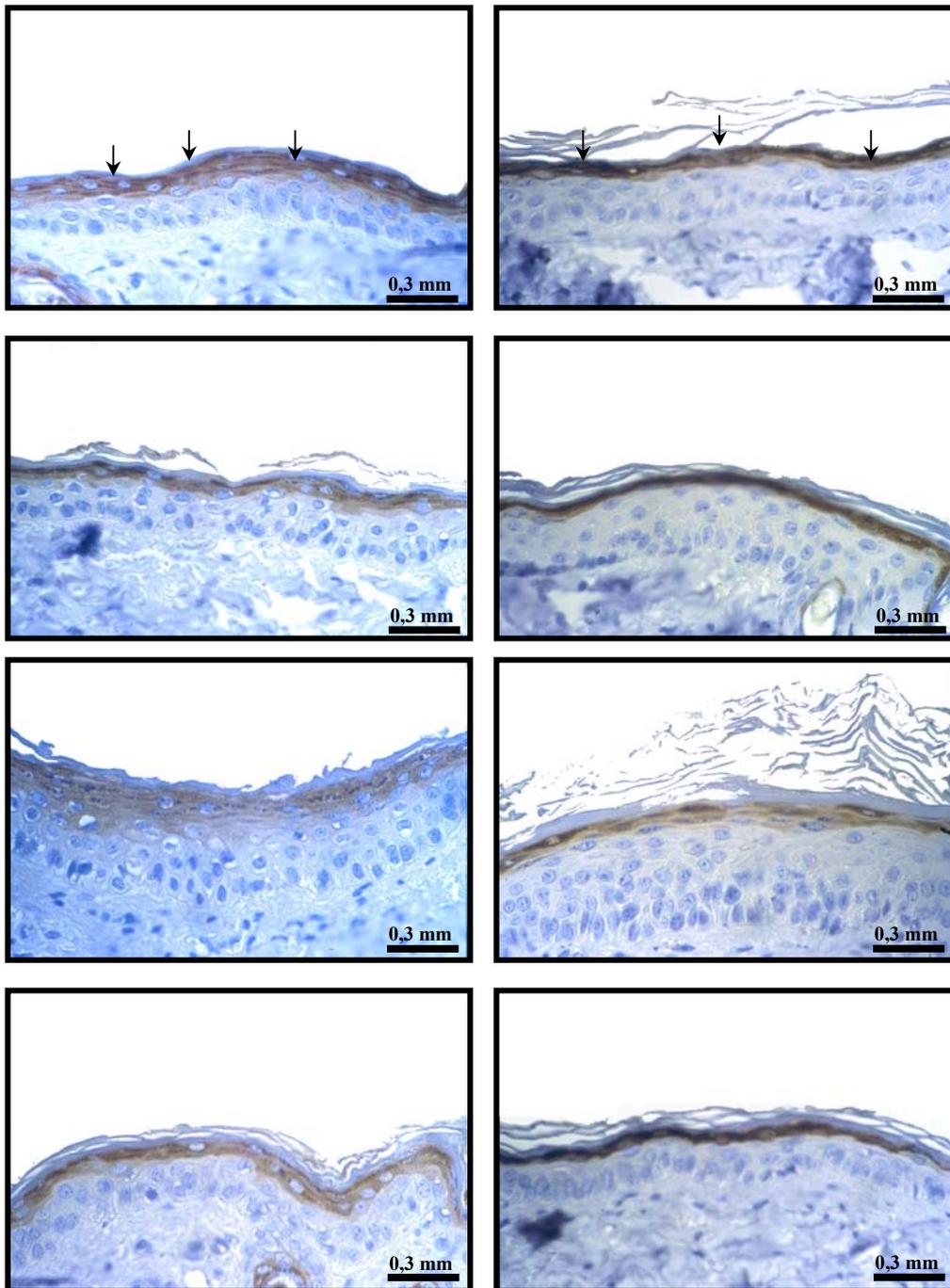


Abb. 28: Expression der „cornified envelope“-Proteine, Involucrin (links) und Loricrin (rechts), während der Wundheilung von normalen Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6. Von oben nach unten sind jeweils die unbehandelte Haut sowie drei, sechs und zwölf Tage altes Wundrandepithel dargestellt. Die Proteine sind braun gefärbt und in den oberen Abbildungen durch Pfeile gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen siehe Text.

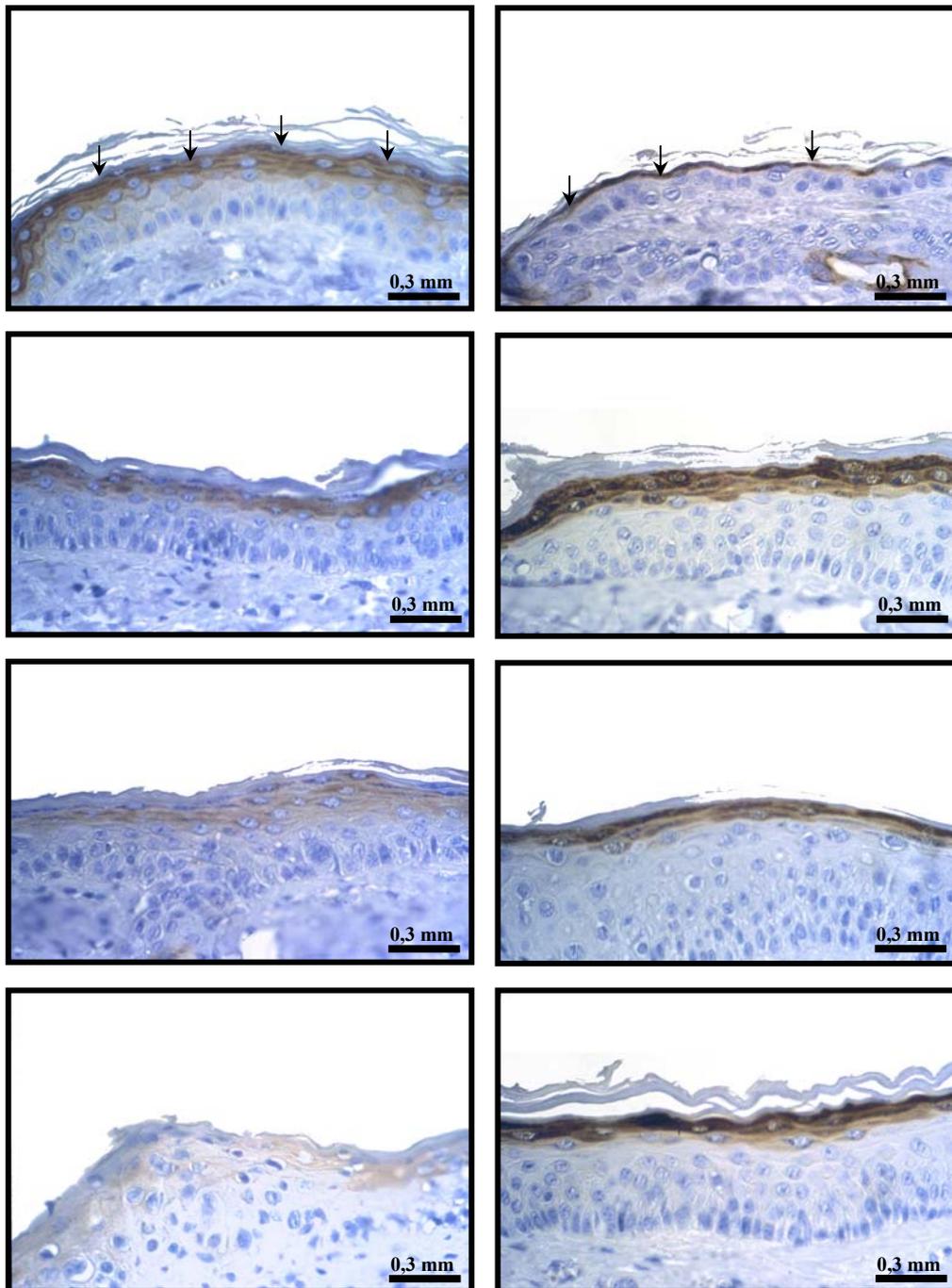


Abb. 29: Expression der „cornified envelope“-Proteine, Involucrin (links) und Loricrin (rechts), während der Wundheilung von IL-1-R1 defizienten Mäusen. Von oben nach unten sind jeweils unbehandelte Haut sowie drei, sechs und zwölf Tage altes Wundrandepithel dargestellt. Die Proteine sind braun gefärbt und in den oberen Abbildungen durch Pfeile gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen siehe Text.

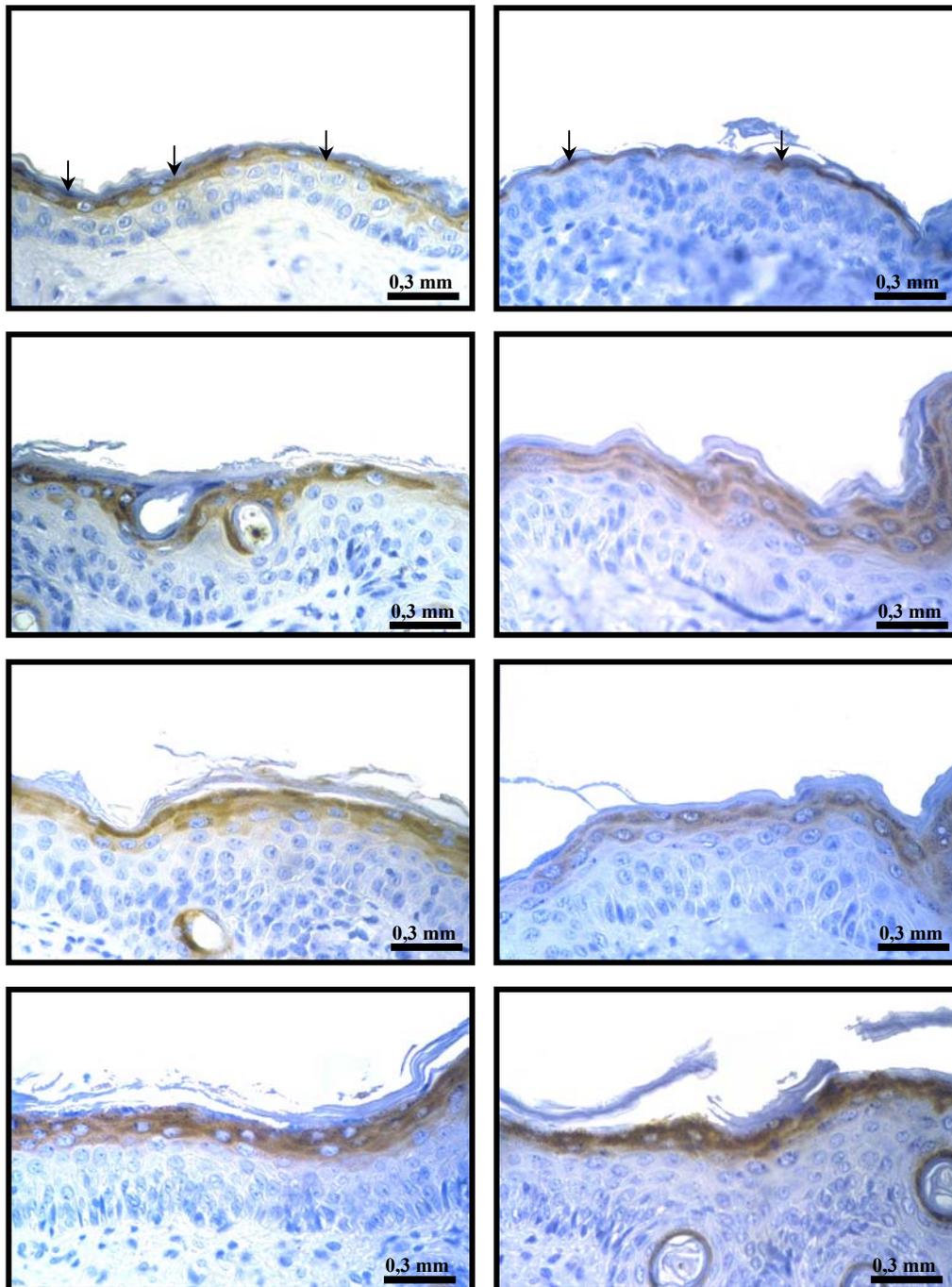


Abb. 30: Expression der „cornified envelope“-Proteine, Involucrin (links) und Loricrin (rechts), während der Wundheilung von TNF-R1 defizienten Mäusen. Von oben nach unten sind jeweils unbehandelte Haut sowie drei, sechs und zwölf Tage altes Wundrandepithel dargestellt. Die Proteine sind braun gefärbt und in den oberen Abbildungen durch Pfeile gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen siehe Text.

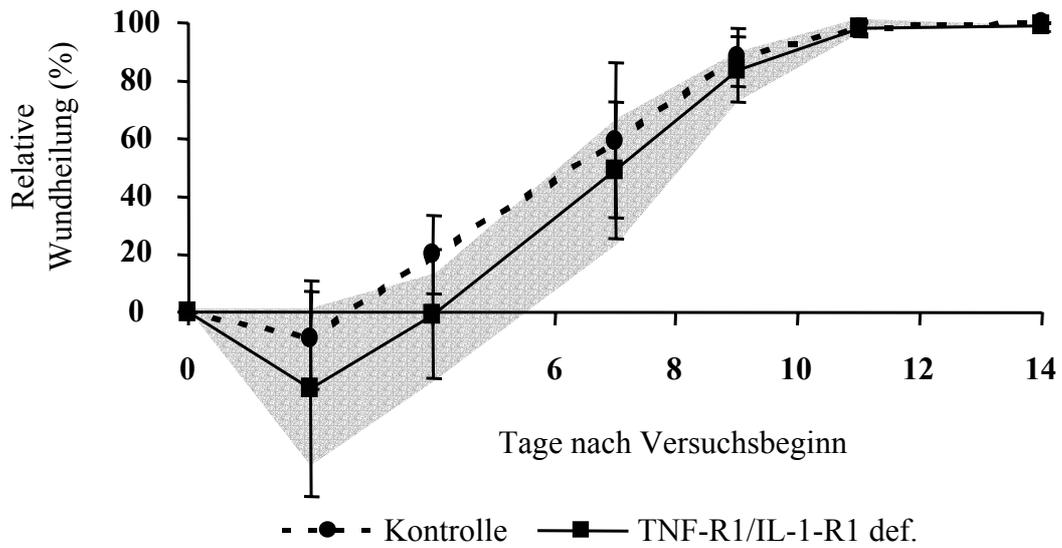
3.2.5 Wundheilung transgener Mäuse mit TNF-R1/IL-1-R1 Doppeldefizienz

Die TNF- oder IL-1-Signaltransduktion ist bei Mäusen mit einer Defizienz für einen der proinflammatorischen Zytokin-Rezeptoren eingeschränkt, da diese Liganden nur spezifisch an ihren Rezeptortyp binden. Um die additive Signalwirkung beider Zytokine auf die Wund-

heilung aufzuzeigen, wurde das Heilungsvermögen von TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen vergleichend zu Wildtyp-Mäusen untersucht.

Die doppelrezeptordefizienten Mäuse ertrugen bereits die Verletzung eines zehn Millimeter Durchmesser großen Hautareals nur bedingt. Obwohl zwei von fünf untersuchten Tieren den Versuch überlebten, war ihre Wundheilung insgesamt verzögert. In Abbildung 31 ist der Bereich der beginnenden Heilung aller doppeltransgenen Mäuse grau unterlegt. Dramatischer wirkte sich jedoch eine zwanzig Millimeter im Durchmesser aufweisende Verwundung aus (Abb. 31, unteres Bild). Die Wunden weiteten sich in den ersten Tagen nach Versuchsbeginn. Während sich in der Kontrollgruppe vom vierten Tag an die Wunden sichtlich verkleinerten, blieben sie bei den TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen unverändert. In diesem Versuchsansatz verstarben sämtliche transgenen Tiere spätestens zwei Wochen nach Beginn des Experiments. Bevor die Mäuse verendeten, verloren diese mit ihrem Harn große Mengen Blut. Ähnliche Beobachtungen konnten bei den einfachrezeptordefizienten Mäusen nicht gemacht werden. Eine Inspektion des Urogenitaltraktes zeigte, daß die Harnblase stark vergrößert und durch Blutinfiltration rötlich verfärbt war (Abb. 32). Die Heilungsrate der am längsten überlebenden Mäuse war innerhalb der transgenen Mausgruppe mit einem 20 mm Wunddurchmesser im oberen Drittel angesiedelt. Im Vergleich zu den nicht defizienten Kontrolltieren war die Heilungsintensität sehr stark beeinträchtigt. Die Wunden der Kontrolltiere heilten in einem Zeitraum von zwölf bis vierzehn Tagen komplett ab. Die transgenen Mäuse erreichten im gleichen Zeitraum lediglich eine zehnprozentige Verringerung der Wundgröße.

a)



b)

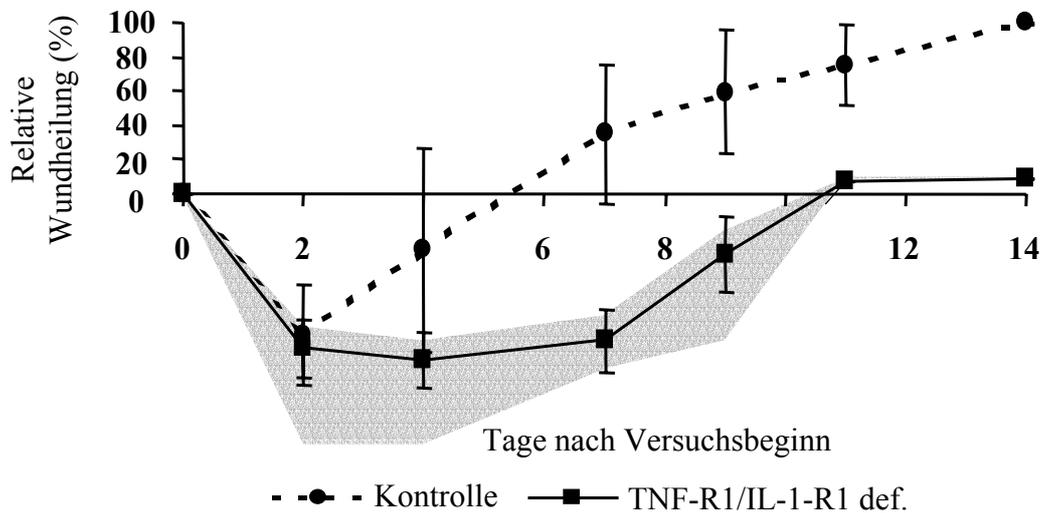


Abb. 31: Heilungsverlauf von kreisförmigen Hautwunden (\varnothing 10 mm (a) und 20 mm (b)) TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienter Mäuse. Die grau unterlegte Fläche zeigt den gesamten Bereich des Heilungserfolges der während der Untersuchung verstorbenen defizienten Mäuse an. Die durchgezogene Linie zeigt den Heilungsverlauf der transgenen Mäuse, die bis zum Versuchsende überlebten. Mittelwert \pm Standardabweichung.

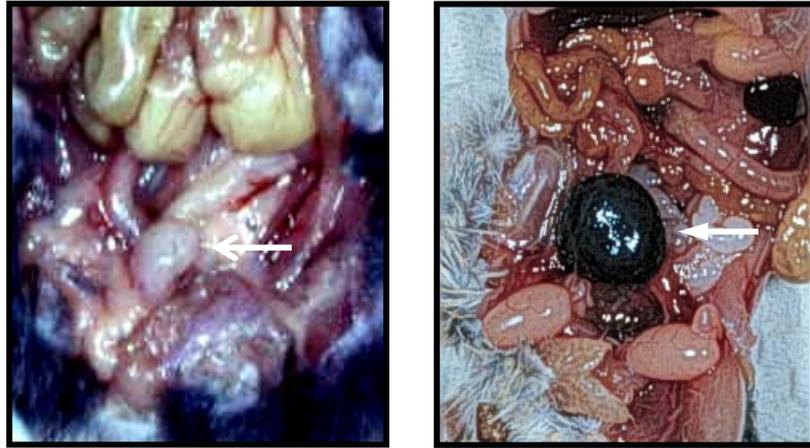
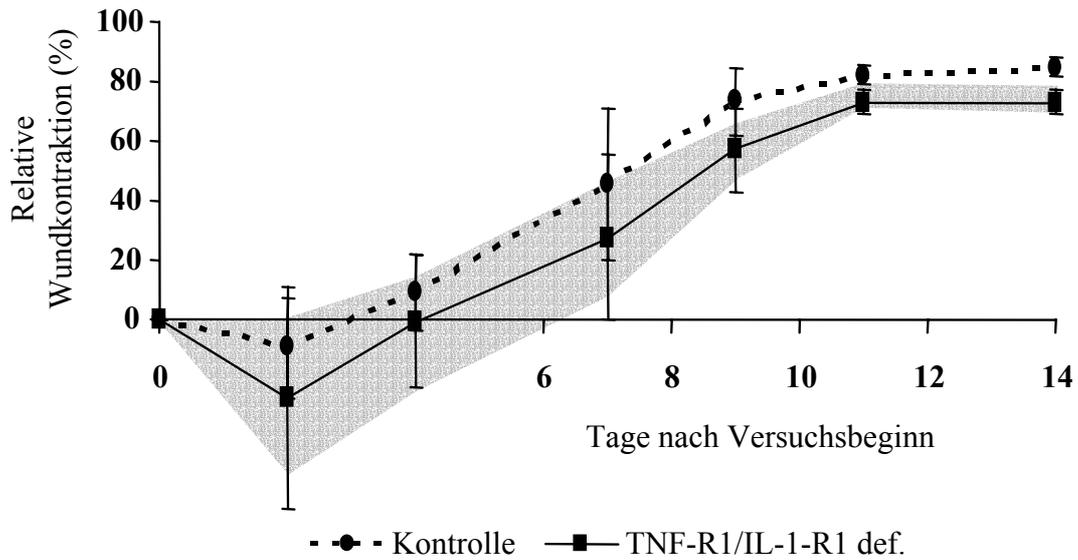


Abb. 32: Innere Anatomie einer TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Maus, die während der Wundheilungsstudie starb (rechts). Die Harnblase erscheint durch abnorme Blutinfiltation stark vergrößert und dunkelrot verfärbt (geschlossener Pfeil). Zum Vergleich ist links die Harnblase einer gesunden Maus dargestellt (offener Pfeil).

Die dramatischen Auswirkungen einer Verletzung der Haut spiegelten sich bei den TNF-R1/IL-1-R1 defizienten Tieren auch in den anderen Wundparametern wider. Aus einer Wundgröße mit zehn Millimetern Durchmesser resultierte eine Kontraktion von 76 % (Abb. 33). Bei der Wildtyp-Kontrolle kontrahierten die Wundränder unabhängig von der verletzten Hautfläche jeweils zu über 80 %. Bei der größeren Verwundung (\varnothing 20 mm) der transgenen Mäuse fiel die Kontraktionsrate so gering aus, daß durch sie nicht einmal die Ausgangsgröße des ursprünglich geschädigten Hautareals wiedererlangt wurde.

a)



b)

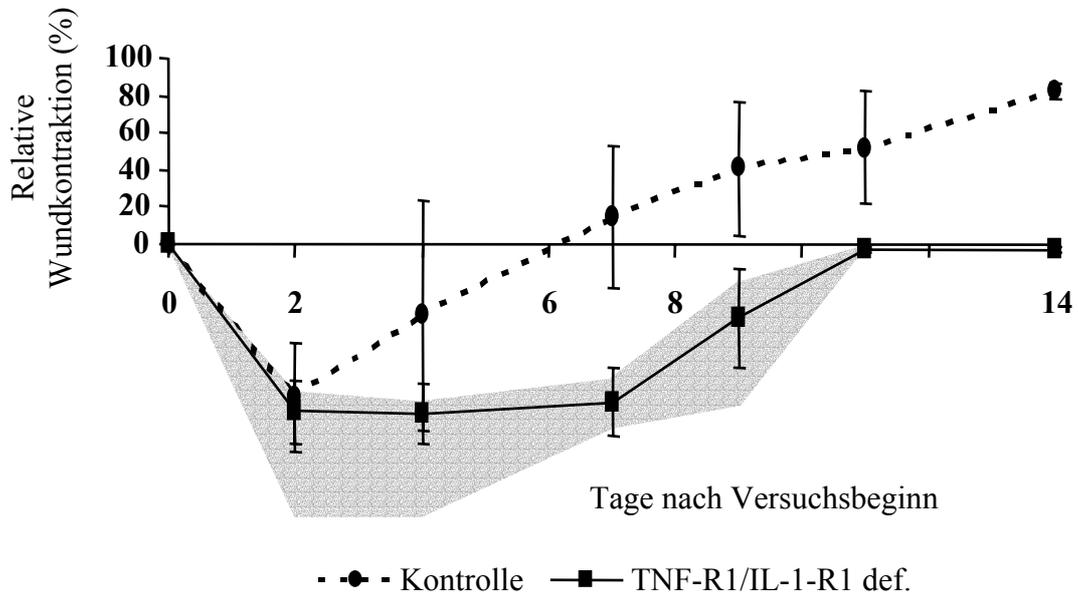


Abb. 33: Wundkontraktion bei TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen nach Totalexzision eines kreisförmigen Hautareals (\varnothing 10 mm (a) und 20 mm (b)). Mittelwert \pm Standardabweichung. Nähere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 31.

Der Anteil der Gewebeneubildung am Heilungsprozeß der doppeldefizienten Mäuse wies im Gegensatz zu den einfachrezeptordefizienten Mausmodellen eine Besonderheit auf (vergleiche Abb. 34 mit Abb. 23 und 26). Während diese Tiere unabhängig von der Wundgröße jeweils eine geringere Reepithelialisierung im Vergleich zu den Kontrollmäusen zeigten, war die Epithelneubildung bei den doppeldefizienten Mäusen bei der kleinen Verletzung höher ausgefallen als bei den Wildtyp-Mäusen (22 zu 15%). Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die TNF-R1/IL-1-R1 transgenen Tiere die stärkere Verletzung nicht überlebten, war das Wundareal zwei Wochen nach Beginn dieses Versuchs

dagegen nur zu knapp elf Prozent mit neuer Haut verschlossen. Die Kontrollmäuse bildeten im gleichen Versuch 22,9 % neues Epithel aus.

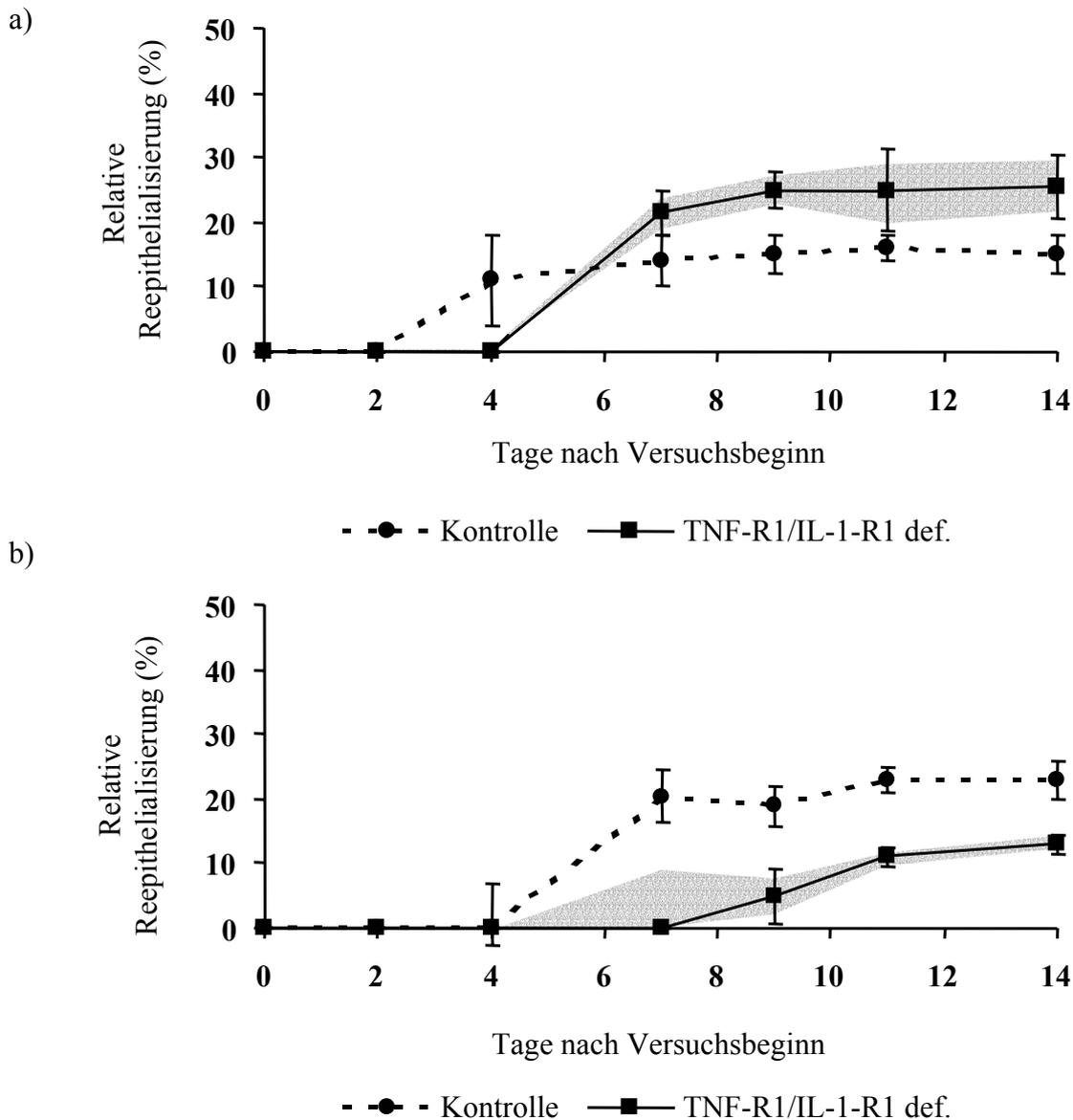


Abb. 34: Hautneubildung nach Verletzung (\varnothing 10 mm (a) und 20 mm (b)) bei TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen. Mittelwert \pm Standardabweichung. Nähere Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 31.

3.2.6 Epidermale Proliferation im Verlauf der Wundheilung TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienter Mäuse

An TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen wurde untersucht, wie sich eine unterbundene Signaltransduktion der beiden proinflammatorischen Zytokine, TNF α und IL-1, hinsichtlich des Proliferationsverhaltens geschädigter Haut während des Wundheilungsprozesses auswirkt.

In unverletzter Haut war der Anteil mitotisch aktiver Keratinozyten in den transgenen Mäusen normal und wies mit 7,5 proliferierenden Zellen pro ausgezähltem Gesichtsfeld ein gleich hohes Niveau wie bei den nicht transgenen Kontrollen (7,3 aktive Zellen · Gesichtsfeld⁻¹) auf. Dieses Bild änderte sich jedoch gravierend während des Abheilens der Vollhautwunden (Abb. 35). In den doppeldefizienten Mäusen kam die Proliferation zwei Tage nach der Verletzung im Wundrandepithel praktisch zum Erliegen. Während die Proliferation der Kontrollmäuse sich stark erhöhte, verminderte sie sich gleichzeitig höchst signifikant auf weniger als eine aktive Zelle in der Haut der transgenen Tiere. Dieser Zustand normalisierte sich zu einem späteren Zeitpunkt der Wundheilung (sechs Tage nach Versuchsbeginn) dadurch, daß die Proliferation der Kontrolltiere auf acht aktive Zellen sank, in den TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen dagegen auf fünf aktive Zellen pro Gesichtsfeld anstieg.

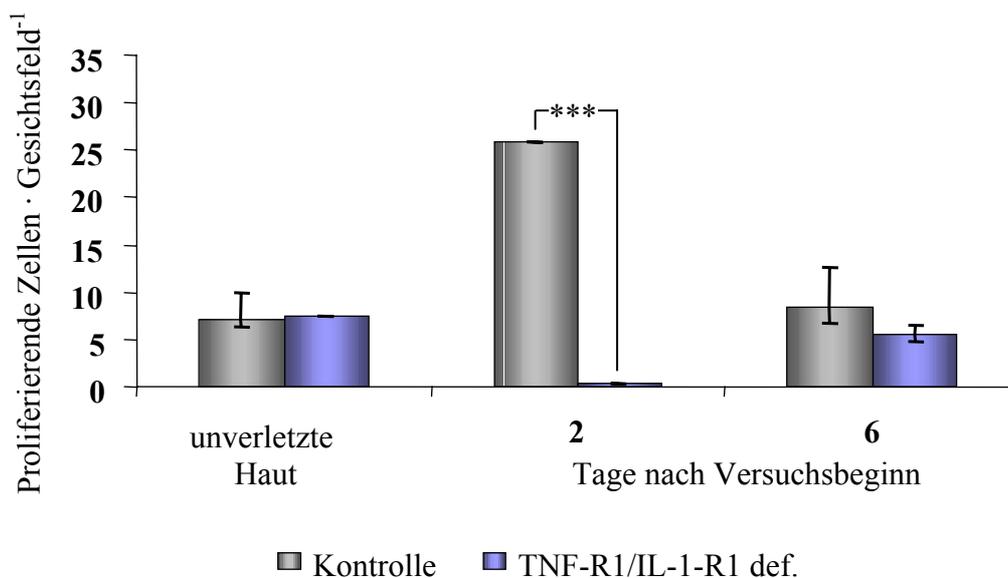


Abb. 35: Immunhistochemischer Nachweis der Proliferation im Wundrand während der Heilung doppeltransgener Mäuse mit TNF-R1/IL-1-R1 Defizienz. Median ± Interquartile; *** p < 0,001.

3.2.7 Epidermale Differenzierung im Verlauf der Wundheilung TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienter Mäuse

Die Keratinozytendifferenzierung kann durch die proinflammatorischen Zytokine, TNF α und IL-1, beeinflusst werden. Das Reifungsverhalten der Keratinozyten wurde außer bei einer einfachen Zytokinrezeptordefizienz für den TNF- oder IL-1-Rezeptor auch in einem Mausmodell, das für beide Rezeptoren gleichzeitig transgen war, untersucht (vergleiche 3.2.4).

Die beiden „cornified envelope“-Proteine, Involucrin und Loricrin, wiesen in den doppelrezeptordefizienten Mäusen ein anderes Differenzierungsmuster auf als in der Haut

der Kontrollmäuse (vergleiche 3.2.4, Seite 75). In unverletzter Haut ließ sich Involucrin nur in der äußersten epidermalen Zellschicht nachweisen (Abb. 36). Wildtyp-Mäuse exprimierten Involucrin dagegen in den beiden oberen Zellagen (Abb. 28). Loricrin war, ähnlich wie in den einfachrezeptordefizienten Mäusen (vergleiche Abb. 29 und 30), mehr auf den obersten Rand der äußersten Zellreihe begrenzt. Bei den Kontrollmäusen war es indessen in der ganzen Zellage exprimiert. Die hohe Anfälligkeit der doppeltransgenen Mäuse gegenüber äußeren Verletzungen ließ nur noch einen weiteren Zeitpunkt für die Untersuchung der Differenzierung zu. Die Expression beider CE-Proteine erhöhte sich sechs Tage nach Verletzung auf die zwei äußersten Zellschichten der Epidermis. Trotz dieser Zunahme fiel die Ausbildung der Differenzierungsproteine somit geringer aus als bei den Kontrolltieren und den einfach defi-zienten Mausmodellen.

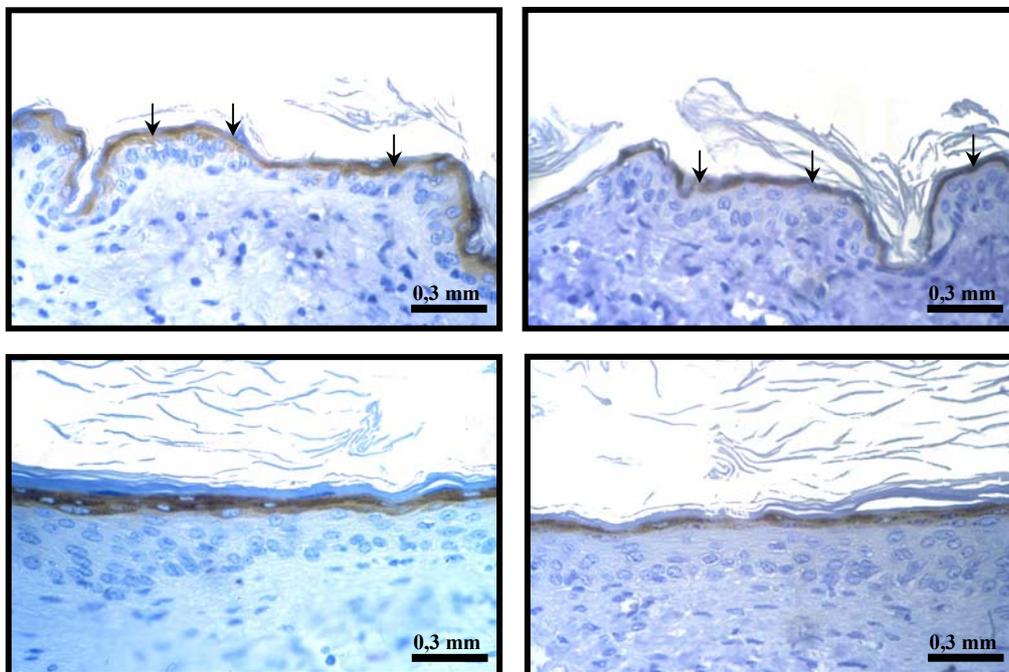


Abb. 36: Expression der „cornified envelope“-Proteine, Involucrin (links) und Loricrin (rechts), während der Wundheilung von TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen. Die oberen Bilder zeigen unverletzte Haut, die unteren sechs Tage altes Wundrandepithel. Die Proteine sind braun gefärbt und in den oberen Abbildungen durch Pfeile gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen siehe Text.

3.2.8 Wundheilung transgener Mäuse mit FAN Defizienz

Mit FAN, dem „Faktor zur Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase“, wird das Adapterprotein bezeichnet, über das die N-SMase unmittelbar aktiviert wird, wenn eine TNF-Ligandenbindung an den TNF Rezeptor 1 erfolgt. Anhand FAN defizienter Mäuse konnte die Wirkung einer eingeschränkten Aktivierbarkeit der neutralen Sphingomyelinase während der

Wundheilung untersucht werden, ohne die verbleibende Signaltransduktion, insbesondere über die saure Form dieses Isoenzym, zu unterbinden.

Die Abheilung einer Wunde (\varnothing 20 mm) an der Flanke FAN defizienter Mäuse machte deutlich, daß eine unterbundene Signalübermittlung, ausgehend von dem TNF Rezeptor 1 zur neutralen Sphingomyelinase, die Wundheilung nicht wesentlich beeinflußt. Abbildung 37 zeigt einen fast identischen Verlauf der Heilung der Vollhautwunden FAN defizienter und nicht transgener Mäuse.

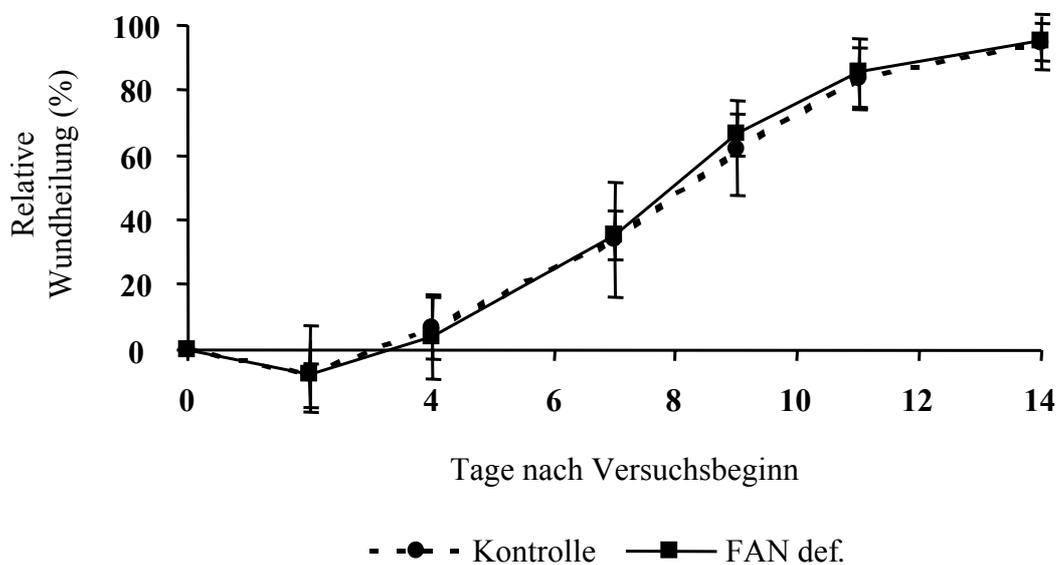


Abb. 37: Wundheilungsverlauf FAN defizienter Mäuse nach Totalexzision der Haut (\varnothing 20 mm). Mittelwert \pm Standardabweichung.

Die Gewebeneubildung der transgenen Tiere fiel am Ende des Heilungsprozesses etwas geringer als bei den Kontrollmäusen aus (Abb. 38). Aufgrund einer entsprechend leicht verstärkten Wundkontraktion bei den FAN defizienten Mäuse resultierte schließlich die gleiche Abheilungsgeschwindigkeit wie bei den nicht transgenen Kontrolltieren (Abb. 39).

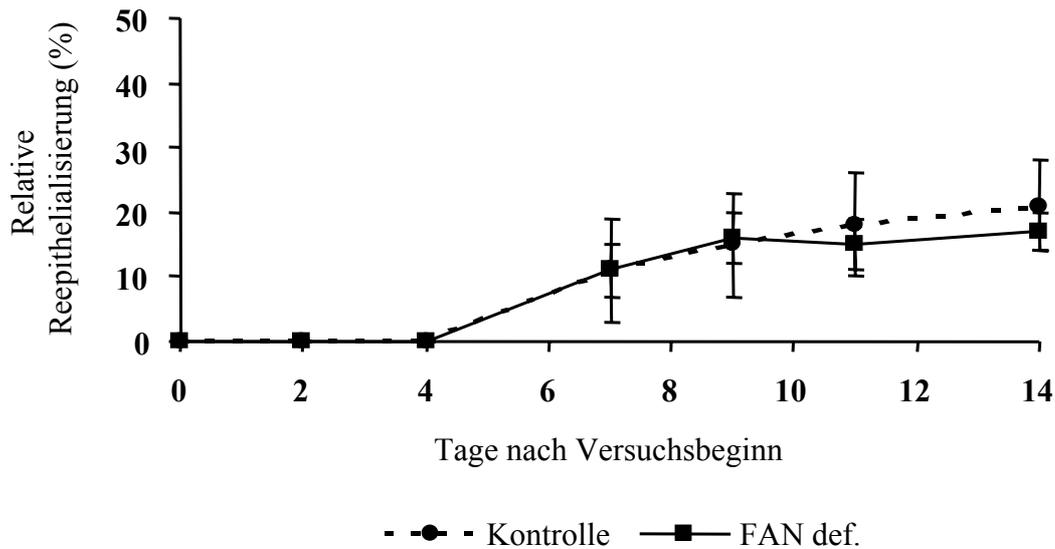


Abb. 38: Geweberegenerierung nach Totalexzision der Haut (\varnothing 20 mm) FAN defizienter Mäuse. Mittelwert \pm Standardabweichung.

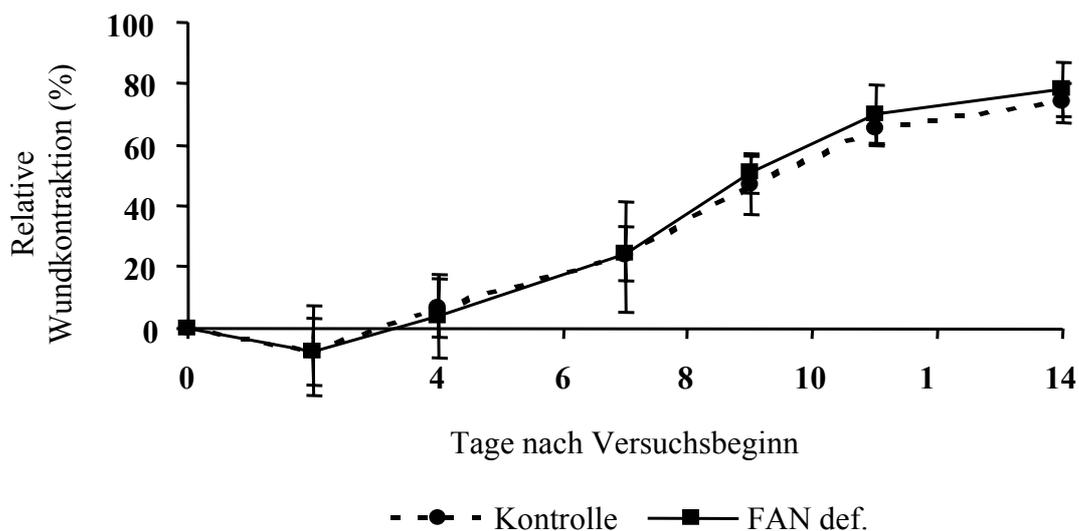


Abb. 39: Wundkontraktion nach einer kreisförmigen Vollhautexzision mit einem Durchmesser von 20 mm bei FAN defizienten Mäusen. Mittelwert \pm Standardabweichung.

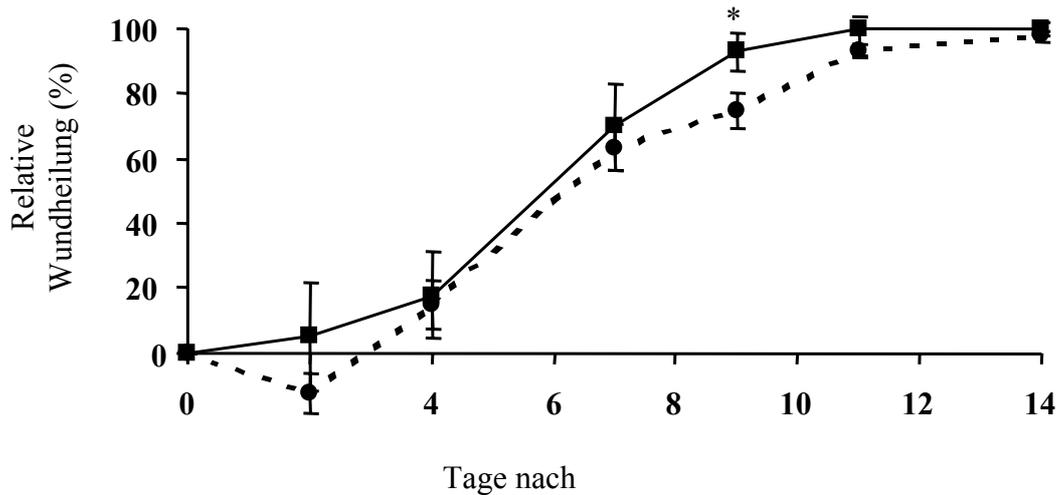
3.2.9 Wundheilung transgener Mäuse mit A-SMase Defizienz

Die saure Sphingomyelinase stellt ein zentrales Element der Signaltransduktion der proinflammatorischen Zytokine, TNF α und IL-1, dar, die wiederum bei einer Hautschädigung als erstes sezerniert werden. An A-SMase defizienten Mäusen wurde die Wundheilung verschieden großer Hautareale im Vergleich zu nicht transgenen Mäusen untersucht.

Sowohl bei einer kleinen, im Durchmesser zehn Millimeter messenden Verletzung als auch nach einer Verdopplung des Wunddurchmessers heilten die die Wunden der A-SMase defi-

zienten Mäuse schneller als die der Wildtyp-Kontrolltiere (Abb. 40). Am Heilungsverlauf war besonders augenfällig, daß nur bei den Wildtyp-Mäusen in den ersten Tagen eine Weitung der Verletzungen beobachtet wurde. Aus den Weitungen resultierte bei den größeren Verwundungen eine hoch bis sehr hoch signifikant verminderte Abheilungsgeschwindigkeit zu den defizienten Mäusen.

a)



b)

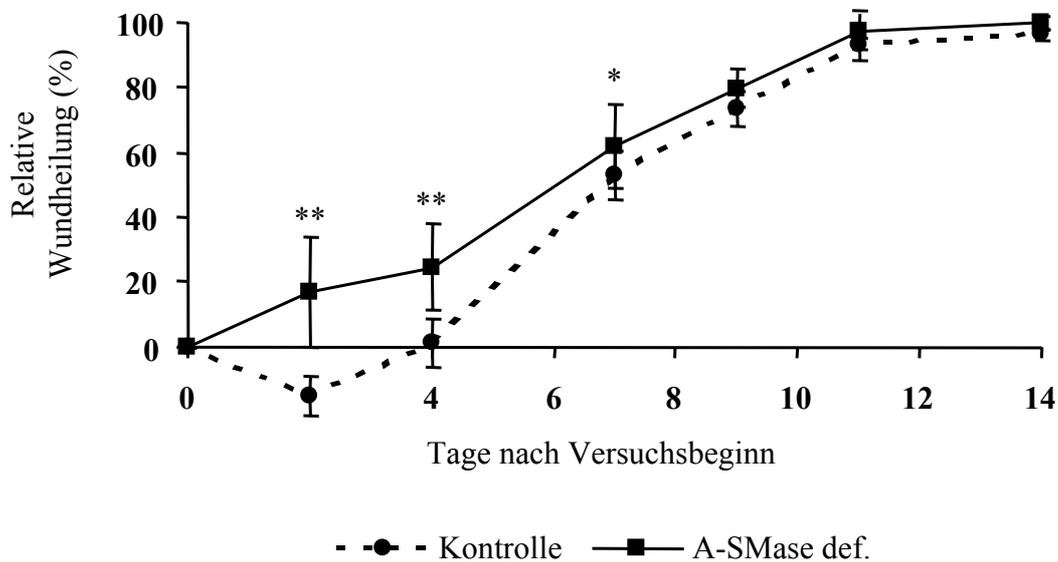
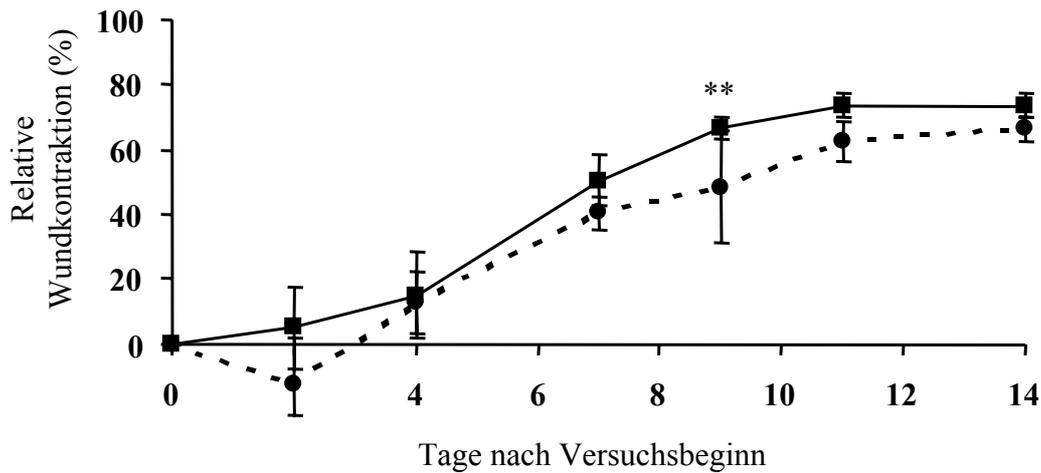


Abb. 40: Verlauf der Wundheilung A-SMase defizienter Mäuse nach Totalexzision der Flankenhaut; Ø 10 mm (a) und Ø 20 mm (b). Mittelwert ± Standardabweichung; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Dieser Unterschied manifestierte sich ebenfalls in der Wundkontraktion (Abb. 41). Unabhängig von der Größe der Verletzung kontrahierten die Wundareale der A-SMase

defizienten Mäuse früher und in einem höheren Maße als bei den Wildtyp-Mäusen. Die kleineren Verletzungen der transgenen Tiere schlossen sich schließlich zu 74 % durch eine Kontraktion der Haut, bei den Kontrollmäusen hingegen dadurch nur zu 66 %. Durch die Erhöhung des Wunddurchmessers auf zwanzig Millimeter stieg der Anteil der Kontraktion an der Heilung in beiden Gruppen auf 81 % an.

a)



b)

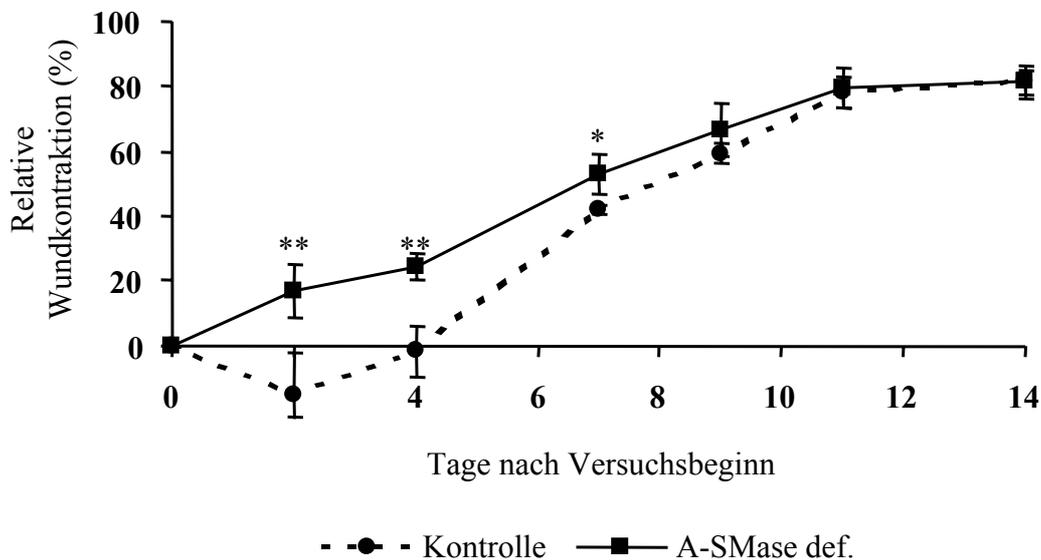


Abb. 41: Wundkontraktion nach einer kreisförmigen Vollhautexzision mit einem Durchmesser von 10 mm (a) und 20 mm (b) bei A-SMase defizienten Mäusen. Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Am vierten Tag nach dem Setzen der kleineren Verletzung wurde in beiden Versuchsgruppen erstmals neugebildetes Epithel festgestellt (Abb. 42). Ein Drittel der Wundheilung der Kon-

trolltiere ging zuletzt auf eine Geweberegenerierung zurück. Bei den A-SMase defizienten Mäusen lag dieser Anteil bei 26 %. Mit einer vergrößerten Verletzung ging eine Verminderung der Reepithelialisierung einher. Hierbei überwog der Anteil an regenerierter Haut bei der transgenen Mausgruppe mit 19 % vor den Wildtyp-Mäusen mit 15 %. Die A-SMase defizienten Mäuse zeigten also unabhängig von der Größe der Verletzung einen rascheren Heilungserfolg auf. Die Heilung der großen Wunden veränderte sich positiv im Vergleich zur Abheilung der kleineren Verletzungen, da bei den A-SMase defizienten Mäusen mehr neues Epithel gebildet worden war und die Wundkontraktion entsprechend geringer ausfiel.

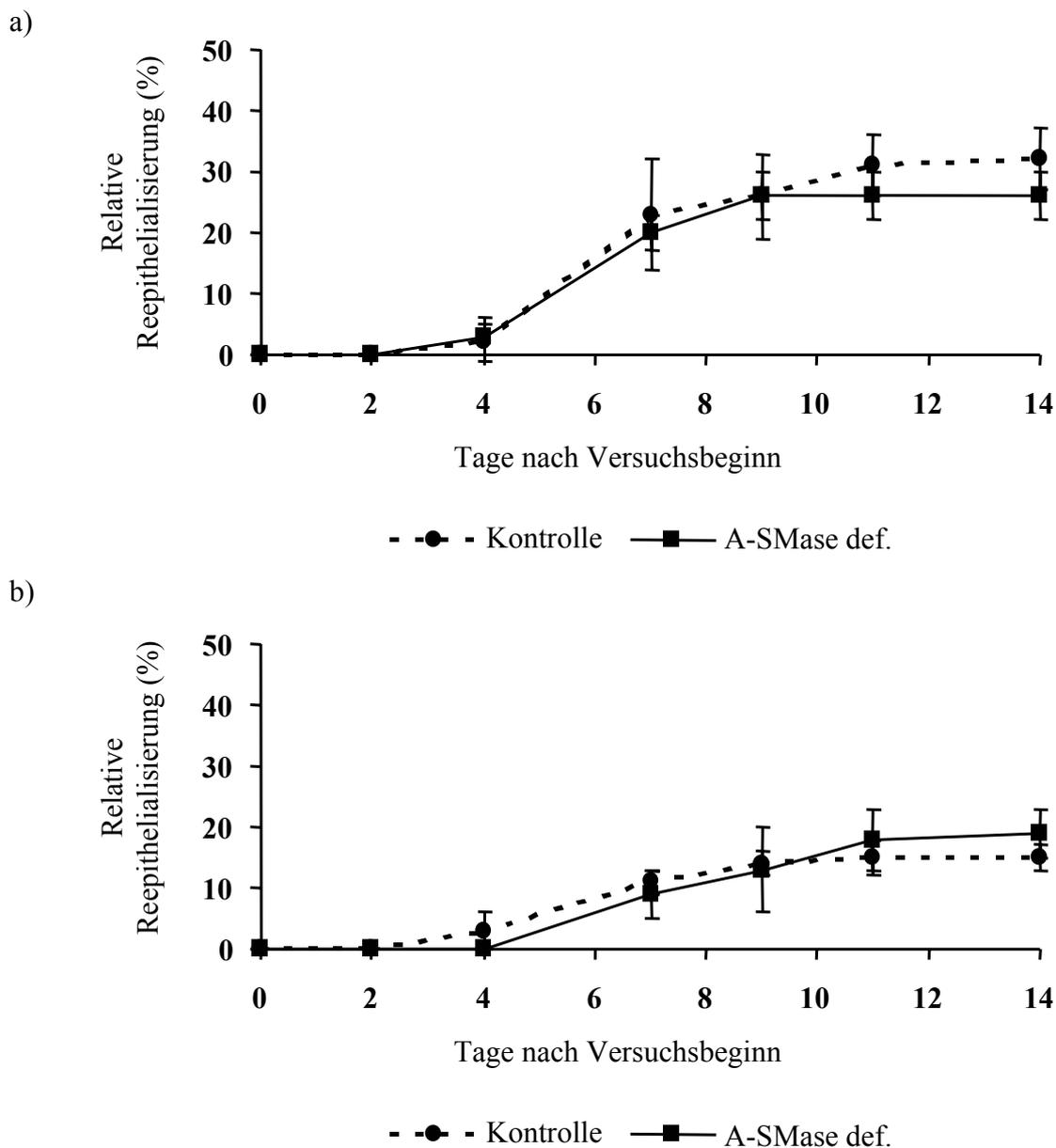


Abb. 42: Geweberegenerierung nach Totalexzision der Haut (\varnothing 10 mm (a) und \varnothing 20 mm (b)) A-SMase defizienter Mäusen. Mittelwert \pm Standardabweichung.

3.2.10 Epidermale Proliferation und Differenzierung im Verlauf der Wundheilung FAN und A-SMase defizienter Mäuse

Die neutrale Sphingomyelinase wird unter anderem über FAN aktiviert, während die A-SMase mit einem sauren pH-Optimum nicht über dieses Adapterprotein reguliert wird. Beide Sphingomyelinase-Enzyme werden mit Stoffwechselfvorgängen der Zelle in Verbindung gebracht, die der Zellteilung und -reifung dienen. Inwieweit die verringerte Aktivierbarkeit der N-SMase Auswirkungen auf die Proliferation und Differenzierung während der Heilung tiefer Hautwunden hat, wurde *in vivo* an Mäusen mit einer FAN Defizienz untersucht. Dieselben Parameter wurden entsprechend an transgenen Mäusen mit einer A-SMase Defizienz untersucht.

Der Anteil mitotisch aktiver Zellen in unverletzter Haut der FAN defizienten Mäuse unterschied sich nicht signifikant von der bei Kontrolltieren (Abb. 43). In beiden Versuchsgruppen wurde zu Beginn der Wundheilung eine erhöhte Zellteilung nachgewiesen, die im Verlauf des Heilungsprozesses wieder abnahm. Die Anzahl mitotisch aktiver Zellen fiel bei den transgenen Tieren zunächst hoch signifikant geringer aus. Die Teilungsintensität der Keratinozyten verlangsamte sich während der Wundheilung in den FAN transgenen Mäusen weniger schnell als in den Wildtyp-Kontrollen. Bei den A-SMase defizienten Mäusen wurde über den gesamten Zeitraum der Wundheilung keine veränderte Proliferation in der Haut festgestellt. (Abb. 43). In drei Tage altem Wundrand war der Anteil mitotisch aktiver Keratinozyten zwar etwas geringer als bei den Kontrollmäusen. Dies führte jedoch nicht zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Mausgruppen.

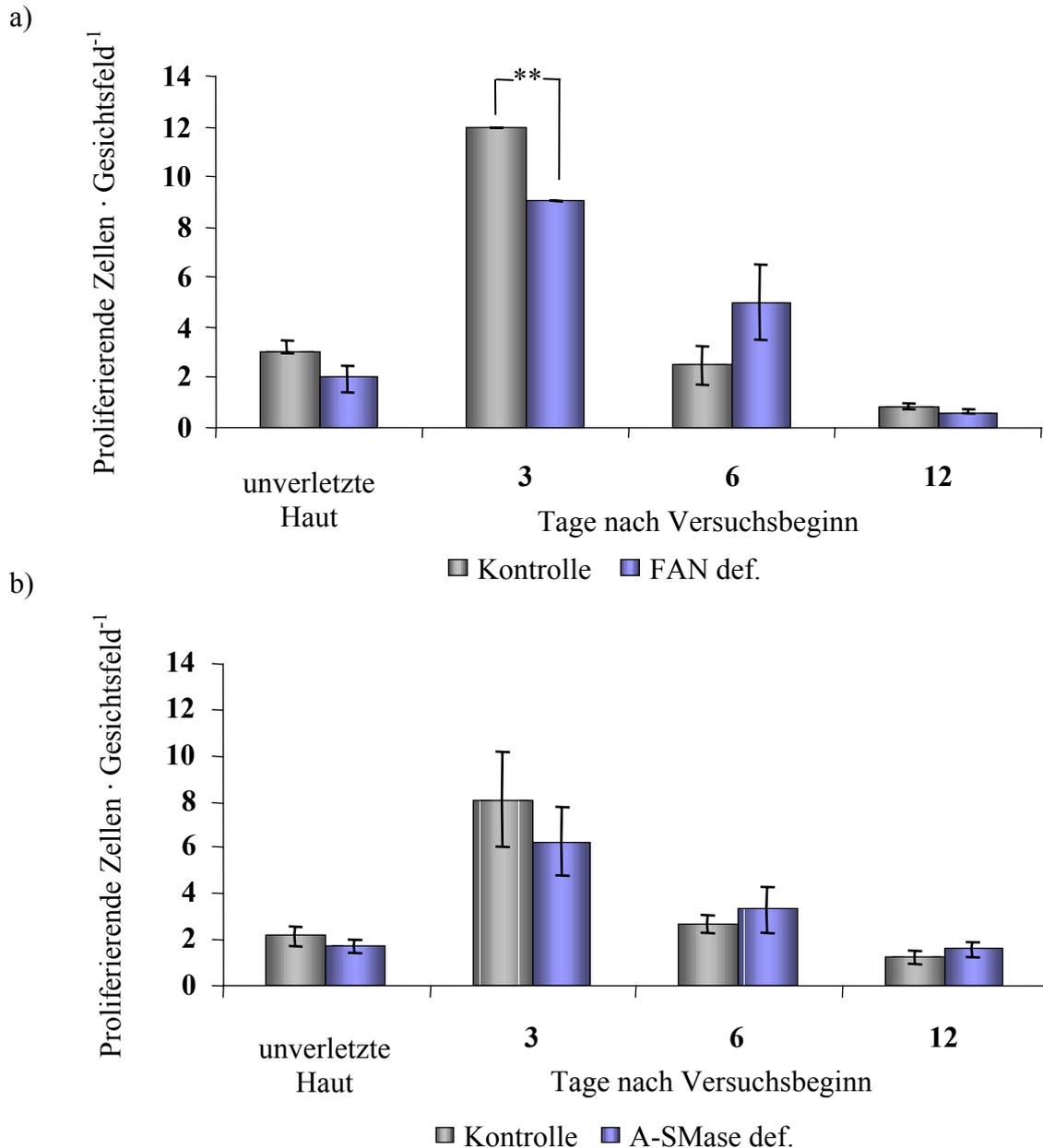


Abb. 43: Proliferation während der Wundheilung bei FAN defizienten (a) und A-SMase defizienten Mäusen (b). Mittelwert \pm Standardabweichung; ** $p < 0,01$.

Das Differenzierungsmuster in der unverletzten Epidermis FAN defizienter Mäuse glich hinsichtlich der Involucrinexpression dem der Wildtyp-Kontrollen (vergleiche Abb. 44 mit Abb. 28). Im Gegensatz dazu wurde Loricrin, wie bereits schon bei den anderen transgenen Tieren (siehe unter 3.2.4 und 3.2.7), nur in sehr geringem Maße in der Haut expremiert. Im Verlauf der Wundheilung stieg die Expression beider „cornified envelope“ Proteine in der transgenen Maushaut an. Loricrin blieb bis zum Ende der Wundheilung dauerhaft auf die oberste Zellage beschränkt. Involucrin fand seine stärkste Ausprägung, abweichend zu den Kontrollen, statt am sechsten schon am dritten Tag nach der Verletzung.

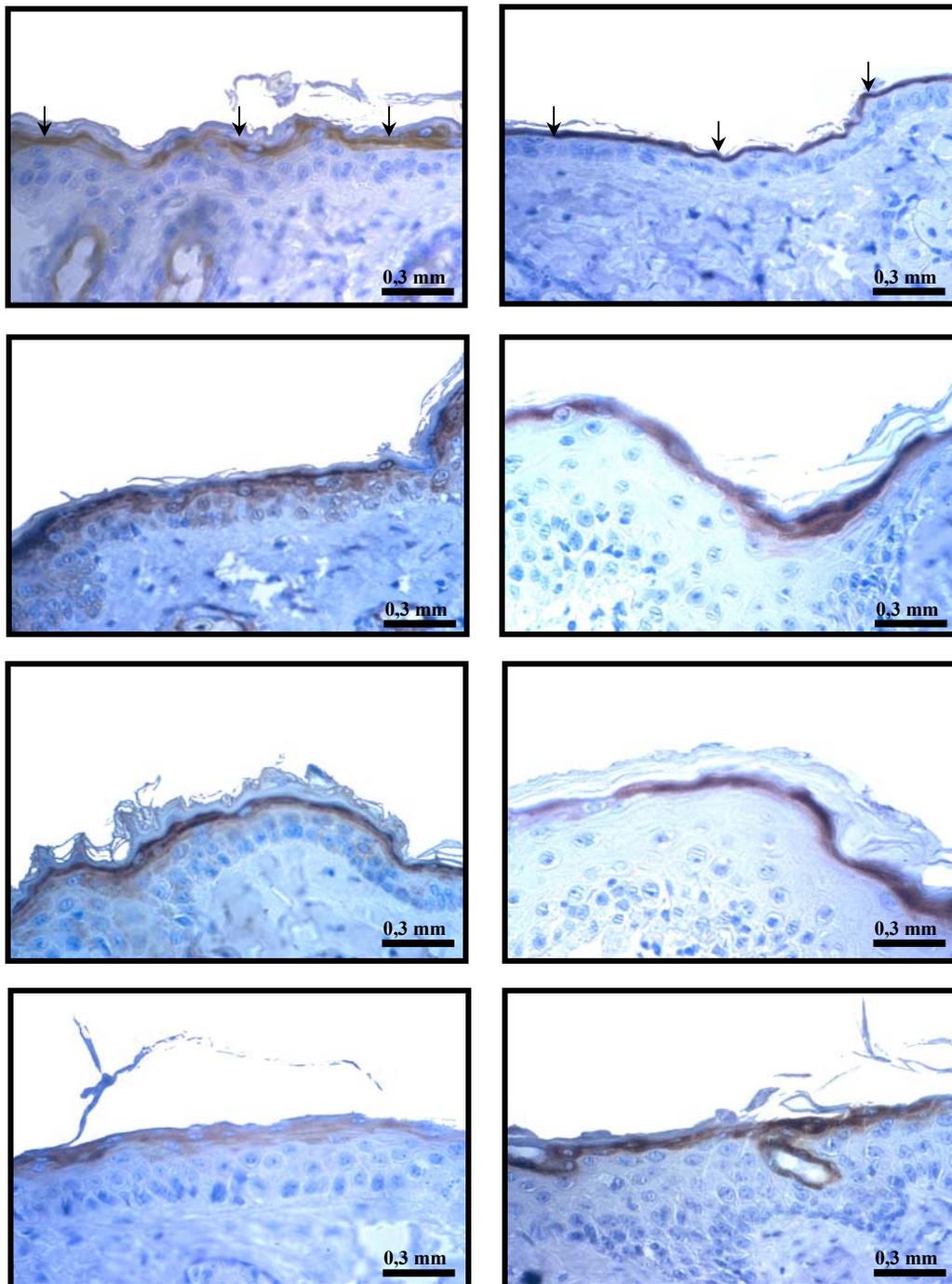


Abb. 44: Expression der „cornified envelope“ Proteine Involucrin (links) und Loricrin (rechts) in FAN defizienten Mäusen während der Wundheilung. Von oben nach unten sind unverletzte Haut, drei, sechs und zwölf Tage altes Wundrandepithel dargestellt. Die Proteine sind braun gefärbt und in den oberen Abbildungen durch Pfeile gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Bei den A-SMase defizienten Mäusen konnte keine abnorme Involucrinexpression festgestellt werden (Abb. 45). Die stärkste Ausprägung wurde, wie in den Wildtyp-Kontrollen, nach sechs Tagen im Wundrand nachgewiesen. Eine interessante Besonderheit wies dagegen das spätere Differenzierungsprotein, Loricrin, bei den A-SMase defizienten Mäusen auf. Während in unverletzter Haut und in einem frühen Stadium der Wundheilung ein

normales Expressions-muster auftrat, wurde in sechs Tage altem Wundrandepithel verstärkt Loricrin expremiert. Der hohe Gehalt an Loricrin hielt bis zum zwölften Tag des Heilungsprozesses an.

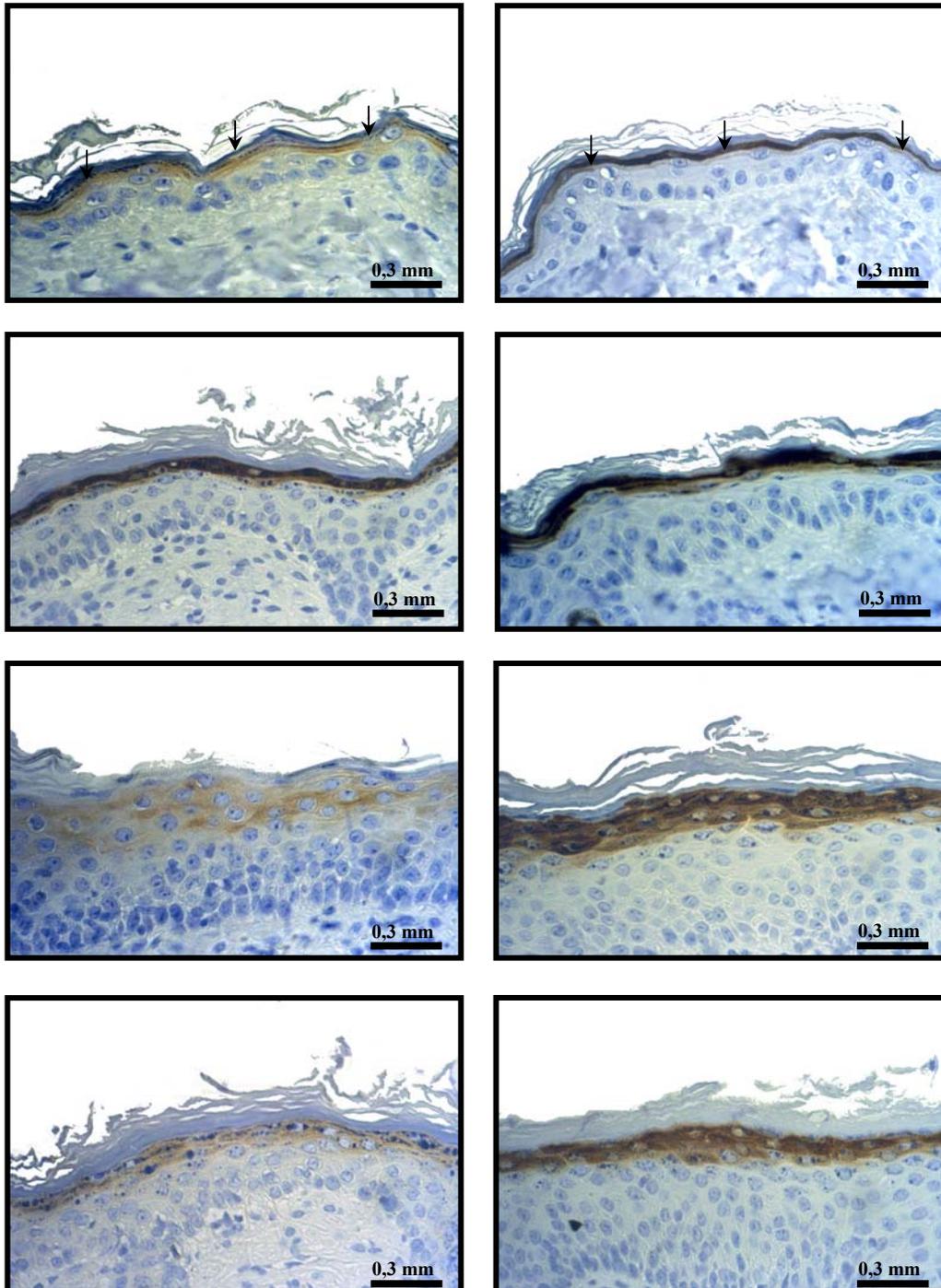


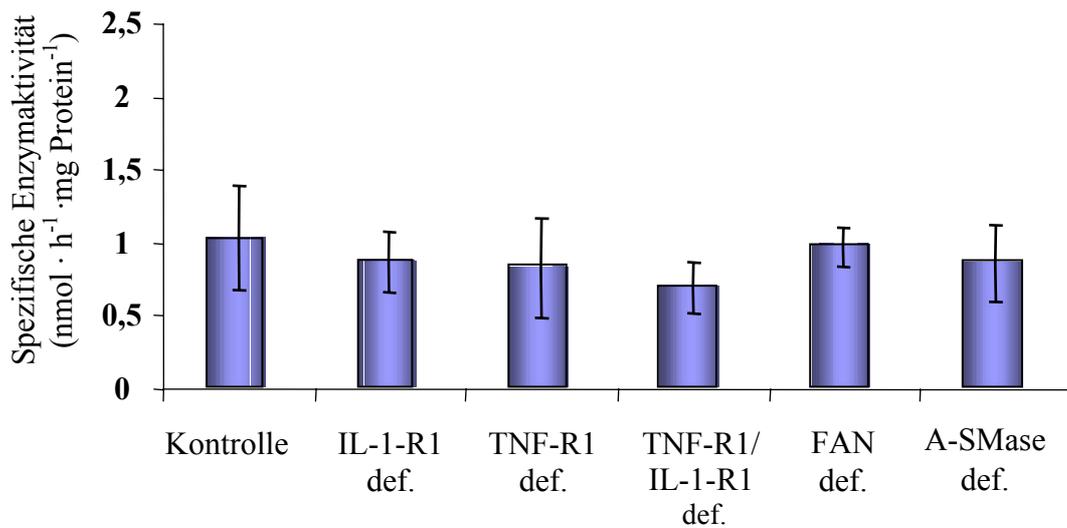
Abb. 45: Expression der „cornified envelope“ Proteine Involucrin (links) und Loricrin (rechts) in A-SMase defizienten Mäusen während der Wundheilung. Von oben nach unten sind unverletzte Haut, drei, sechs und zwölf Tage altes Wundrandepithel dargestellt. Die Proteine sind braun gefärbt und in den oberen Abbildungen durch Pfeile gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen siehe Text.

3.2.11 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung transgener Mäuse

Die proinflammatorischen Zytokine, $\text{TNF}\alpha$ und IL-1, induzieren in den Keratinozyten der Haut unter anderem die Aktivierung der beiden Phosphodiesterasen, neutrale und saure Sphingomyelinase. In welchem Zusammenhang die Aktivität der Sphingomyelinasen mit dem Heilungsprozeß einer tiefen Hautverletzung stehen, wurde an TNF-R1- und IL-1-R1- einfach- wie doppeldefizienten Mäusen, sowie an Tieren mit FAN- bzw. A-SMase Defizienz untersucht.

Abbildung 46 a) zeigt, daß die neutrale SMase der untersuchten transgenen Mausmodelle im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen in unbeschädigter Haut keine abnorme Aktivität aufwies. Die durchschnittliche spezifische Enzymaktivität lag bei 0,7 bis 1,1 $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$. Ein ähnliches Bild lieferte die saure Sphingomyelinase. In unverletzter Epidermis der untersuchten defizienten Maustypen wurde eine mittlere Aktivität von 3,4 bis 5 $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ nachgewiesen, wodurch die transgenen Mäuse sich nicht signifikant von den Wildtyp-Kontrollen unterschieden (Abb. 46 b). Einzige Ausnahme bildeten hierbei die A-SMase defizienten Mäuse, die sich durch das Fehlen dieses Isoenzymtyps auszeichnen.

a)



b)

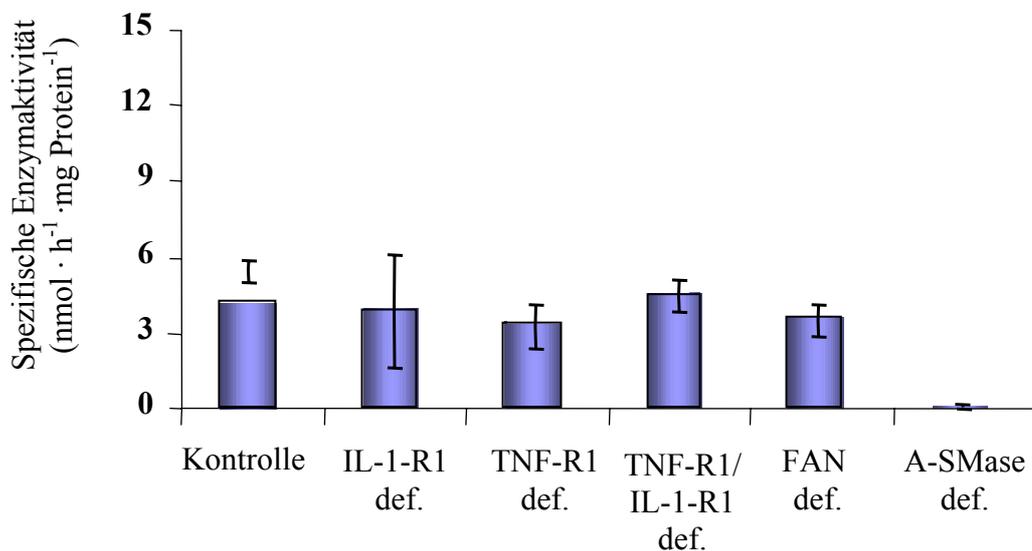


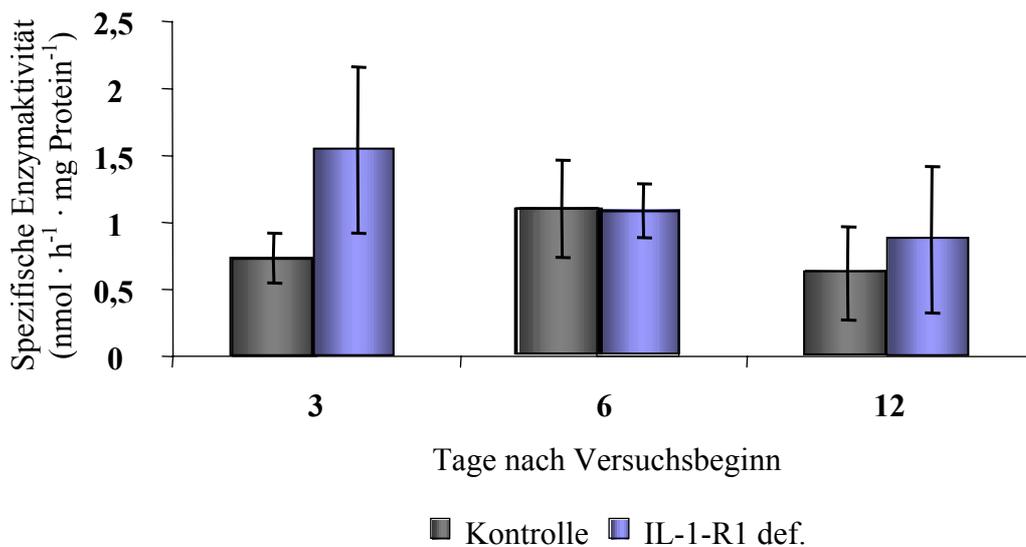
Abb. 46: Spezifische Aktivität der neutralen (a) und sauren Sphingomyelinase (b) in unverletzter Haut der transgenen Mausmodelle im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Mittelwert \pm Standardabweichung.

3.2.11.1 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei IL-1-R1 und TNF-R1 Defizienz

Die Aktivität der Sphingomyelinasen während der Wundheilung der transgenen und der Kontrollmäuse zeigte eine hohe Variabilität. Obwohl in allen Versuchen der Mausstamm C57Bl/6 als Kontrolle diente, war die Aktivität der neutralen SMase bei diesen Mäusen nicht in jedem Versuch gleich hoch. Während die Kontrollmäuse im Versuchsansatz mit den IL-1-R1 defizienten Tieren noch einen Aktivitätsanstieg sechs Tage nach der Verwundung aufwiesen (vergleiche 3.1.3, Abb. 16), konnte dieser beim Vergleich zu den TNF-R1 defizienten Mäusen nicht nachgewiesen werden (Abb. 47 b). Lediglich in drei Tage altem

Wundrand wurde ein ähnlich hohes Aktivitätsniveau in beiden Kontrollgruppen erzielt. Weder die IL-1-R1- noch die TNF-R1 defizienten Mäuse ließen eine von der Kontrolle abweichende N-SMase-Aktivität erkennen. Die IL-1-R1 defizienten Tiere erreichten allerdings zu Beginn des Heilungsprozesses eine, wenn auch nicht signifikante, höhere spezifische Aktivität der neutralen Sphingomyelinase als die Wildtyp-Mäuse.

a)



b)

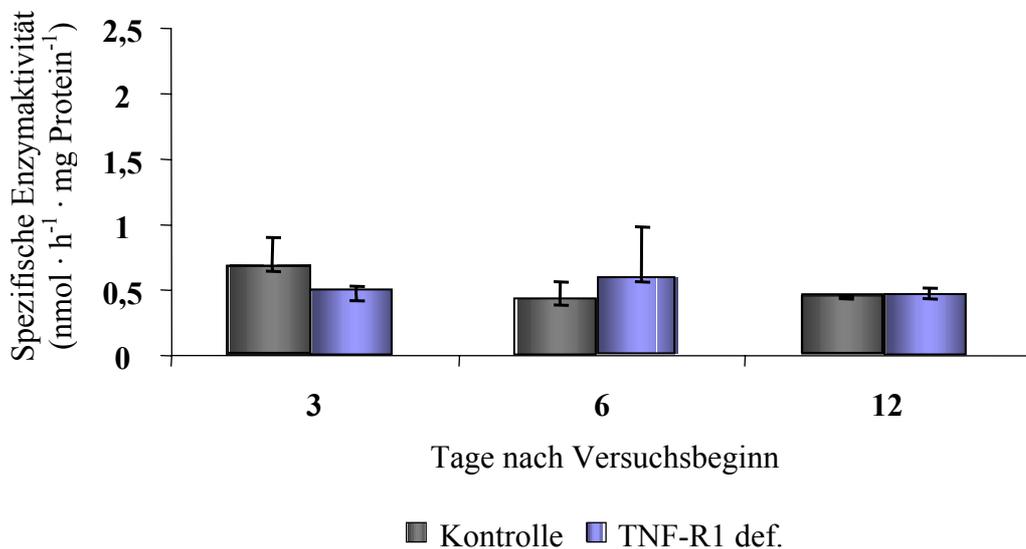
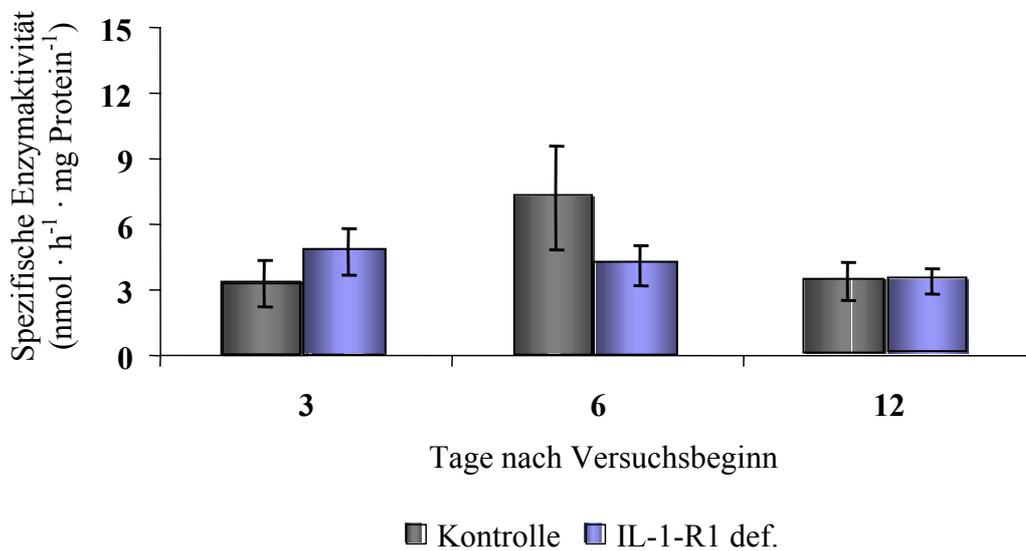


Abb. 47: Spezifische Aktivität der neutralen Sphingomyelinase während der Wundheilung von IL-1-R1 defizienten (a) und von TNF-R1 defizienten Mäusen (b). Mittelwert \pm Standardabweichung (a). Wegen der geringeren Stichprobengröße ist in (b) der Median \pm Interquartile angegeben. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Bei der Bestimmung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase während der Wundheilung zeigten die Kontrolltiere in der Untersuchung mit den IL-1-R1 defizienten Mäusen wiederum

ihr SMase-Aktivitätsmaximum nach sechs Tagen (Abb. 48). Bei dem Vergleich zu den TNF-R1 transgenen Mäusen nahm die Aktivität bei den Wildtyp-Mäusen dagegen bis zum Ende der Wundheilung stetig zu. Dies zeigt wiederum, daß die Aktivität der Sphingomyelinasen eine hohe Variabilität aufwies (siehe auch Abb.47). Bei den defizienten Mausmodellen wurden, wie bereits bei dem Vergleich der N-SMase, keinerlei signifikante Unterschiede zur Kontrolle ermittelt. Der Anstieg der A-SMase Aktivität blieb jedoch bei den IL-1-R1 defizienten Mäusen vollends aus. Die TNF Rezeptor 1 Defizienz führte bei den transgenen Mäusen nicht zu einer abweichenden Aktivierbarkeit der sauren Sphingomyelinase.

a)



b)

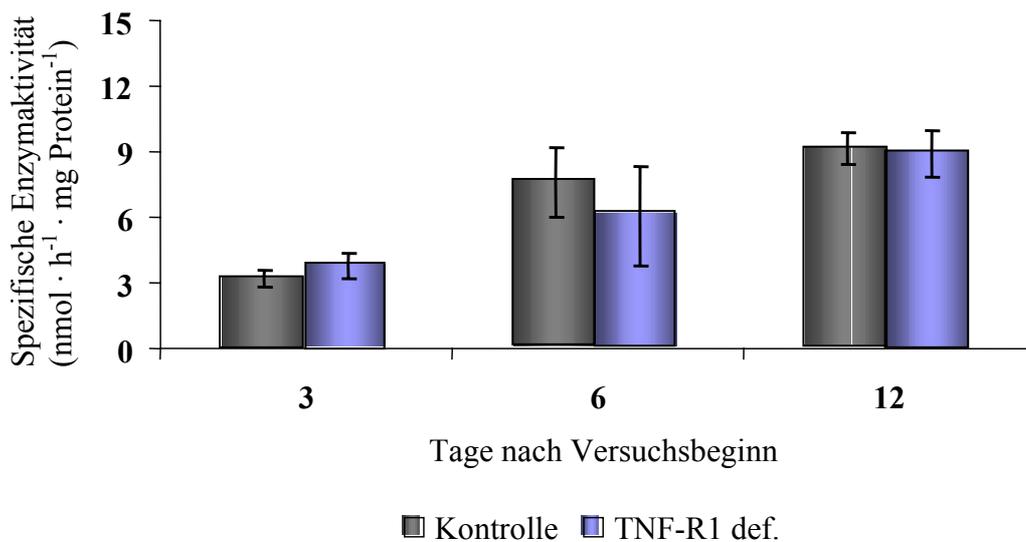


Abb. 48: Spezifische Aktivität der sauren Sphingomyelinase während der Wundheilung von IL-1-R1 defizienten (a) und von TNF-R1 defizienten Mäusen (b). Mittelwert ± Standardabweichung. Nähere Erläuterungen siehe Text.

3.2.11.2 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei TNF-R1/IL-1-R1 Doppeldefizienz

Die Untersuchung der Sphingomyelinase-Aktivitäten der doppeldefizienten Mäuse erwies sich als äußerst schwierig, da eine Totalexzision der Haut eine hohe Sterblichkeit nach sich zog (vergleiche auch 3.10). Die wenigen überlebenden Tiere zeigten jedoch im Falle der neutralen SMase in sechs Tage altem Wundrandepithel eine deutlich verringerte Aktivität im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abb. 49).

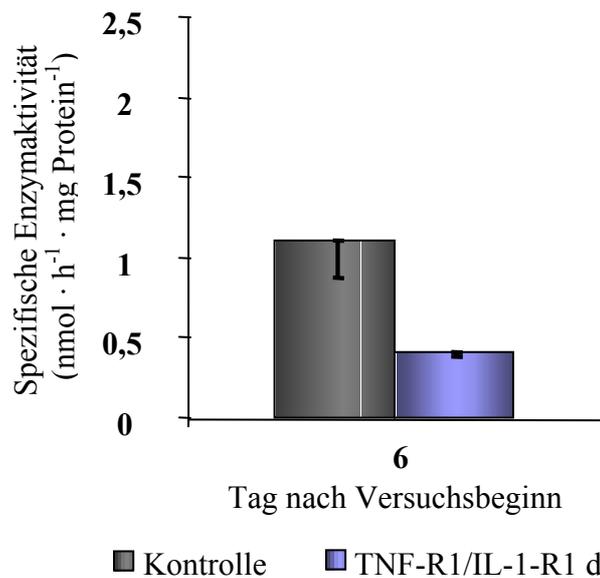


Abb. 49: Spezifische Aktivität der neutralen Sphingomyelinase während der Wundheilung von TNF-R1/IL-R1 doppeldefizienten Mäusen am sechsten Tag nach Versuchsbeginn. Wegen der geringen Stichprobengröße sind die Werte als Median \pm Interquartile angegeben.

Beim Vergleich der sauren Sphingomyelinase der doppeltrangen Mäuse mit den Wildtyp-Kontrollen zeigte sich erst zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 12 der Wundheilung) eine verminderte spezifische Aktivität (Abb. 50).

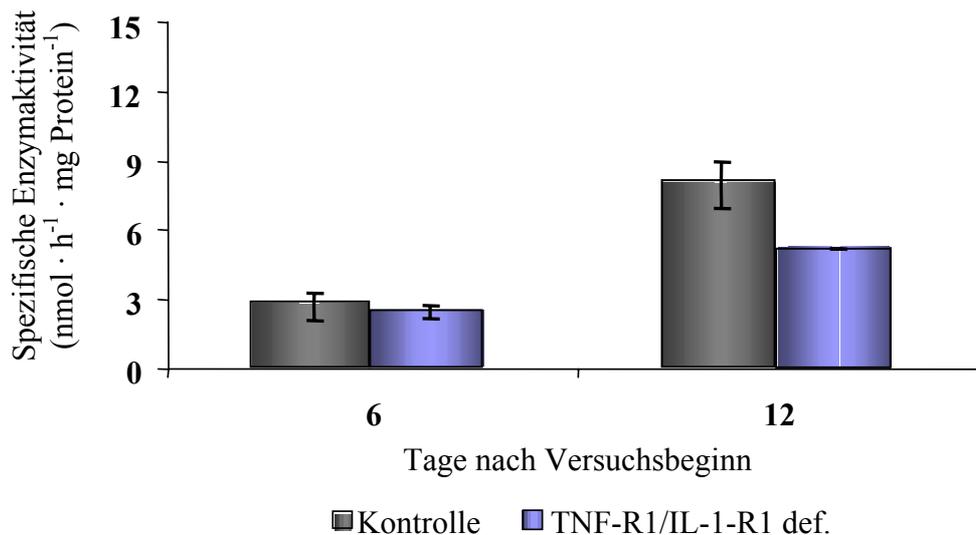


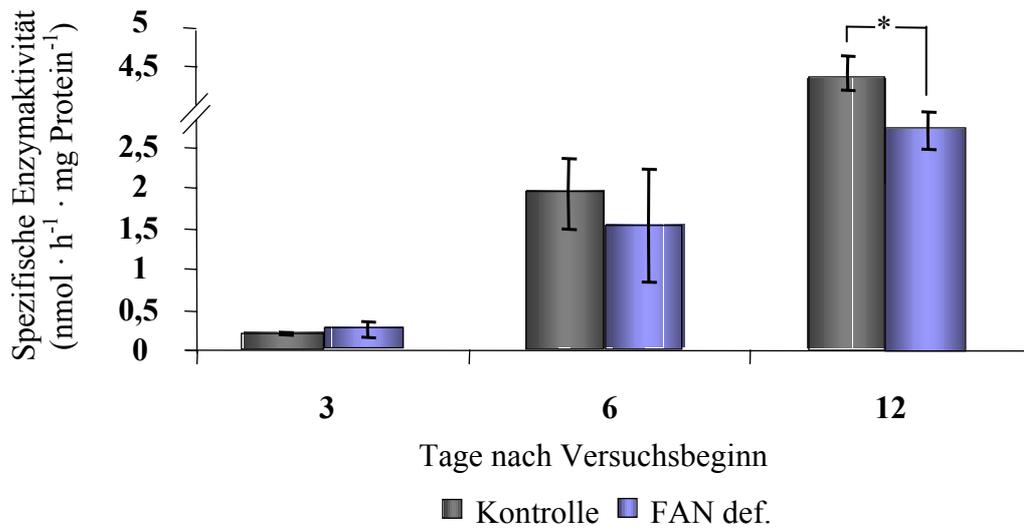
Abb. 50: Spezifische Aktivität der sauren Sphingomyelinase während der Wundheilung von TNF-R1/IL-1-R1 doppeltdefizienten Mäusen. Mittelwert \pm Standardabweichung.

3.2.11.3 Aktivität der neutralen und sauren Sphingomyelinase im Verlauf der Wundheilung bei FAN und A-SMase Defizienz

Über FAN, das Adapterprotein zur Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase, wird die N-SMase aktiviert, wenn TNF α an den TNF Rezeptor 1 bindet. An FAN defizienten Mäusen wurde zum Ende des Wundheilungsprozesses eine signifikant verringerte Aktivität der N-SMase ermittelt (Abb. 51). A-SMase defiziente Mäuse wiesen im Wundrandepithel während der Heilung zwar eine anhaltend geringere neutrale Sphingomyelinase-Aktivität als die Wildtyp-Kontrolltiere auf, der Unterschied war aber nicht signifikant.

Die saure SMase, die von FAN nicht gesteuert wird, erreichte ihre maximale Aktivität bei den FAN transgenen Tieren während des Heilungsverlaufes sechs Tage nach Versuchsbeginn (Abb. 52). Das höchste Aktivitätsniveau der Kontrollen war hingegen erst am zwölften Tag gegeben, so daß die FAN defizienten Mäuse im mittleren Heilungsstadium sogar eine signifikant höhere A-SMase Aktivität aufwiesen. In den A-SMase defizienten Mäusen war aufgrund der Enzym-Defizienz die saure Sphingomyelinase nicht weiter evaluiert worden (siehe Abb. 46 b).

a)



b)

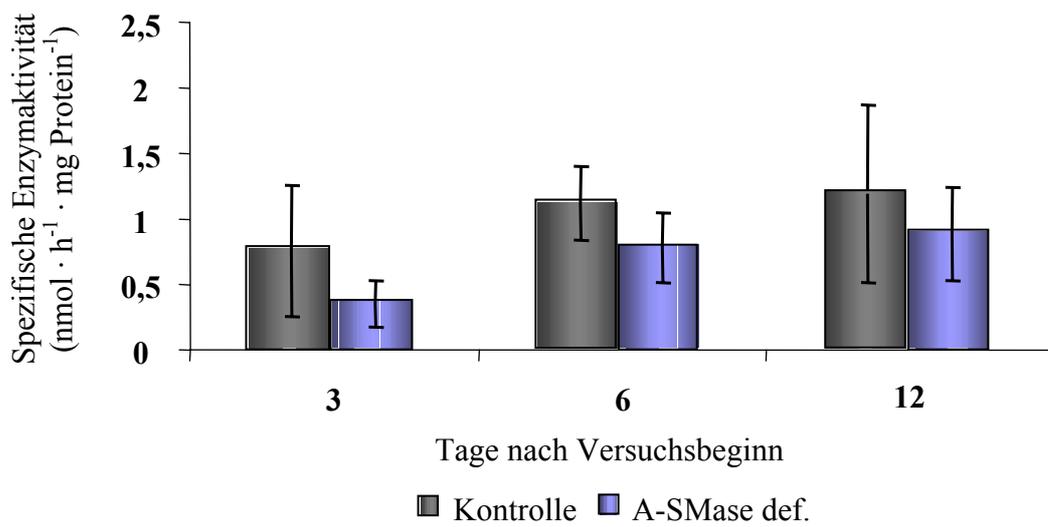


Abb. 51: Spezifische Aktivität der neutralen Sphingomyelinase während der Wundheilung von FAN (a) und A-SMase defizienten Mäusen (b). Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$.

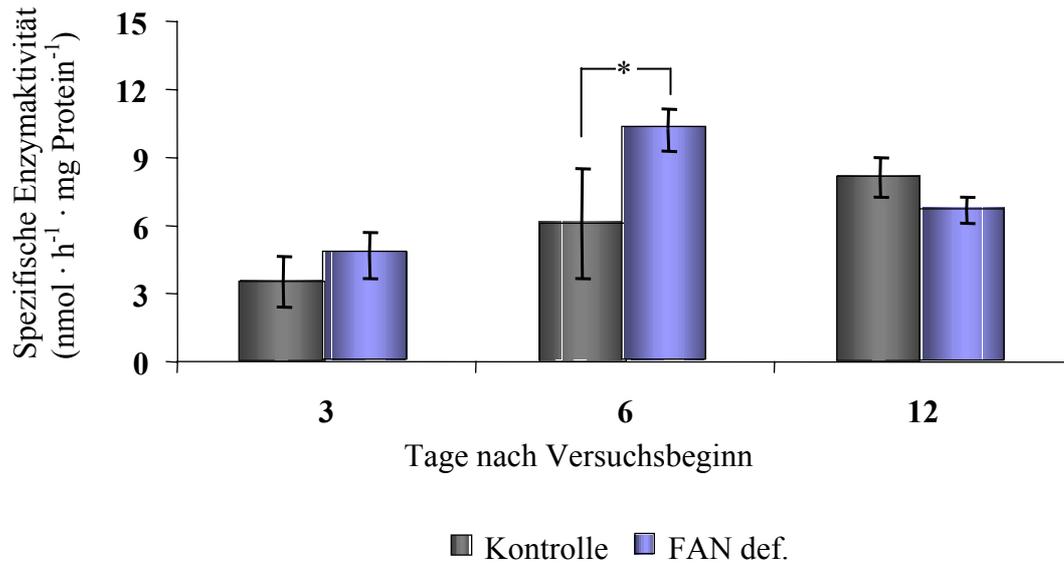


Abb. 52: Spezifische Aktivität der sauren Sphingomyelinase während der Wundheilung von FAN defizienten Mäusen. Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,05$.

4 Diskussion

Die primäre Aufgabe der Haut liegt in dem Schutz des Organismus gegen infektiöse Keime und toxische Substanzen aus der Umwelt. Durch mechanische, physikalische und chemische Einwirkungen kann die Integrität der Haut gestört werden, was zu einer offenen Wunde führen kann. Eine länger anhaltende Störung der Haut führt zu einer chronischen Verletzung. Endogene Erkrankungen können ebenfalls ursächlich für chronische Hautveränderungen sein. Beispielsweise kann durch eine venöse Insuffizienz, einem Verlust der Venenklappenfunktion, ein Ulcus cruris („offenes Bein“) entstehen, der mit einer gestörten Wundheilung einhergeht. Das oberste Ziel bei der Therapie jeder Hautverletzung ist eine schnelle Wundheilung, um das Risiko einer Infektion zu minimieren, Funktionseinschränkungen zu verhindern und Schmerzen zu beseitigen.

Bei der Behandlung von Ulcera und Dekubitalulcera werden seit einigen Jahren verstärkt verschieden okklusive Folien zur Wundbehandlung eingesetzt. Der Wirkungsweise solcher Verbandmaterialien ist aber bislang nicht vollkommen geklärt. MAZZALUPO et al. (2002) stellten in einem *ex vivo* Modell fest, daß die Heilung einer Wunde aus der Kontraktion dermalen Fibroblasten bei der Bildung des Granulationsgewebes und aus der Migration epidermaler Keratinozyten resultiert. Für die Wundkontraktion sind vor allem neugenerierte Fibroblasten verantwortlich, die in einem ein bis zwei Millimeter breiten Bereich an den Wundrändern gebildet werden und dort zu Myofibroblasten ausdifferenzieren (GROSS et al., 1995). Die Wundkontraktion wird durch den Einsatz differenter Wundabdeckungen beeinflusst. MORGAN et al. (1994) fanden heraus, daß tiefe Verletzungen an der Vorderextremität von Hunden eine erhöhte Kontraktion erfahren, wenn sie mit einer okklusiven Folie behandelt worden waren. Die Geweberegenerierung, von der der Heilungserfolg außerdem abhängt, fiel dagegen am höchsten unter semiokklusiven Verbandmaterialien aus (MORGAN et al., 1994). LEVINE et al. (1998) erzielten an Schweinen durch Anlegen einer okklusiven Folie nach einer Exzision der oberen Epidermis und der papillären Dermis eine beschleunigte Reepithelialisierung. Bei einer auf das Stratum corneum beschränkten Verletzung wurde diese hingegen durch den Einsatz desselben Okklusivverbandes verlangsamt. Die verzögerte Geweberegenerierung unter einer undurchlässigen Folie wurden von VAN ROSSUM et al. (1998) noch weiter spezifiziert, indem sie eine abnehmende Proliferationsrate mit zunehmender Undurchlässigkeit des Verbandes feststellten.

VAN DE KERKHOFF et al. (1995) untersuchten am Menschen die Wirkung von zwei verschiedenen Hydrocolloid-Verbänden, Duoderm[®] und Comfeel[®], im Vergleich zu anderen superfiziellen Verletzungen, deren Heilung ohne eine Wundabdeckung erfolgte. Zwischen unbehandelten und mit den semiokklusiven Verbänden versorgten oberflächlichen Verletzungen erzielten sie keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Proliferationsvermögens der Epidermis. Im Gegensatz dazu wurde bei Mäusen durch eine Duoderm[®]-Behandlung die epidermale Proliferation inhibiert (VAN DE KERKHOFF et al., 1995). DE CONINCK et al. (1996) stellten beim Schwein eine beschleunigte Wundheilung unter dem okklusiven Verband, Tegaderm[®], im Vergleich zu einer Behandlung mit der semiokklusiven Folie, Melolin[®] fest. Sie führten diese Resultate auf eine erhöhte Reepithelialisierung zurück, die durch das feuchtere Milieu unter Tegaderm[®] erzielt worden war. Die Wundkontraktion fiel bei der Behandlung mit Tegaderm[®] mit ca. 80 % gleichzeitig etwas geringer als beim Einsatz der Melolin[®]-Folie aus (DE CONINCK et al., 1996).

HOWARD et al. (1993) konnten an den unteren Extremitäten von Pferden zeigen, daß nach einer Totalexzision der Haut (von 2,5 cm²) die Abheilung durch eine semiokklusive Folie im Gegensatz zu einer Behandlung mit einem okklusiven Verband begünstigt wurde. Ihre Resultate stehen daher konträr zu denen von DE CONINCK et al., obgleich sie die Reepithelialisierung nicht quantitativ erfaßten, sondern deren zeitlich verzögertes Eintreten als Grund für die spätere Heilung bei Verwendung der okklusiven Folie anführten. MOHR et al. (1999) sprachen darüber hinaus der erhöhten Feuchtigkeit des Wundbettes, die durch Verbände allgemein verursacht wird, die positive Wirkung für die Hautregenerierung zu.

COLLAWN (2000) untersuchte mit der Zellmigration einen weiteren wichtigen Parameter der Wundheilung. Die Zellmigration variiert nach COLLAWNS Untersuchungen mit dem ansteigenden Feuchtigkeitsgehalt des Wundbettes, der durch unterschiedliche Wundabdeckungen hervorgerufen werden kann. Gleichzeitig wird dabei die Schorfbildung reduziert, was für die Migration förderlich ist. ÅGREN & EVERLAND (1997) konnten bei der Nutzung der Hydrocolloid-Verbände, Comfeel[®] und Duoderm[®], feststellen, daß Teile aus dem Material durch das Granulationsgewebe phagozytiert wurden. Im Falle des Comfeel[®] bildeten sich dabei geringere Mengen extrazellulärer Vakuolen aus (weniger als 5 % zu mehr als 25 % beim Duoderm[®]). Durch die minimale Einlagerung der Comfeel[®]-Bestandteile wurde im Gegensatz zu der Duoderm[®]-Behandlung die Zellmigration nicht beeinträchtigt.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich an Vollhautwunden bei Mäusen, daß ein Verband je nach dem Grad seiner Okklusion die Wundkontraktion, die Epithelneubildung sowie die Zellmigration und damit schließlich die gesamte Wundheilung unterschiedlich stark beeinflusst. Die Ergebnisse im von mir untersuchten Mausmodell zeigten, daß die Wundkontraktion bei einer vollständigen Okklusion stärker ausfiel als bei der Behandlung mit der semiokklusiven Folie Comfeel®. Die Wundkontraktion setzte unter dem Comfeel®-Verband zwei Tage später ein als bei der Latex-Behandlung und den ohne Verband gehaltenen Kontrollmäusen. Dieses Phänomen wurde bereits früher beim Vergleich von verschiedenen hydrocolloiden Verbänden (Com-feel® und Duoderm®) mit Polyurethan-Folien beobachtet (ÅGREN et al., 1997). Hydrocolloid-Verbände quellen im Gegensatz zu Polyurethan-Folien durch die Absorption überschüssigen Wundexsudats auf und schließen diese Feuchtigkeit in sich ein. Die Gewebeneubildung setzte in meinen Untersuchungen an Mäusen, die mit einer Latex-Okklusion behandelt worden waren, später ein als bei den mit einer semiokklusiven Folie behandelten Mäuse. Außerdem wurde der Anteil an neugebildetem Epithel besonders durch das semiokklusive Comfeel® im Vergleich zu den nicht mit einem Verband behandelten Kontrollen erhöht, was letztlich zu einer Reduzierung der Wundkontraktion führte.

Als Nachweis für die Zellmigration wurde die Expression des aktivierten Transkriptionsfaktors, Phospho-STAT-3, untersucht. Dieser Faktor wird von wandernden Zellen im Rattenhirn (PLANAS et al., 1997) expremiert und reguliert u. a. auch die Migration von Leukozyten und Keratinozyten (HIRANO et al., 2000). SANO et al. (1999) fanden in STAT-3 defizienten Mäusen bei normal entwickelter Hautstruktur und einem nicht abnormen Proliferationsvermögen der Keratinozyten eine vollständig inhibierte Zellmigration. Sie folgerten aus ihren weiteren Untersuchungen, daß kein anderer Transkriptionsfaktor aus der STAT-Familie speziell in migrierenden Keratinozyten expremiert wird. In das Wundbett eingewanderte Keratinozyten dienen, nach den Untersuchungen von LAPLANTE et al. (2001), neben den Zellen aus den Wundrändern und den Haarfollikeln, als Quelle für die Epithelregenerierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch den Einsatz verschieden okklusiver Verbandmaterialien in der Wundheilung haarloser Wildtyp-Mäuse sowohl der Zeitpunkt als auch die Intensität der Keratinozytenmigration verändert. In Wunden, die mit einem Verband versorgt worden waren, setzte die Zellmigration verspätet ein. Gleichzeitig wurde das

Ausmaß der Migration, besonders durch den Einsatz von Comfeel[®], erhöht und zeitlich ausgedehnt. Ohne jegliche Wundbedeckung setzte die Zellmigration bei den untersuchten Mäusen relativ früh während des Heilungsprozesses ein. Unter dem okklusiven Latex-Verband setzte die Phospho-STAT-3 Expression später ein und nahm an Intensität im Vergleich zu der von nicht mit einer Wundauflage behandelten Wunden zu. Dies konnte nach den Aussagen von SANO et al. (1999) und HIRANO et al. (2000) als Beweis für eine verzögerte Keratinozytenmigration gewertet werden. Mit Hilfe von Comfeel[®] wurde ebenfalls eine verspätete Zellmigration induziert. Gleichzeitig wurde jedoch die Intensität der Migration bei der Verwendung von Comfeel[®] noch weiter erhöht.

Der von COLLAWN (2000) beschriebene positive Effekt eines feuchten Wundbettes für die Wundheilung kann sich aber auch umkehren und eher schädigend auf die Heilung einer Wunde auswirken. In meinen Untersuchungen stellte ich an den mit Latex behandelten Mäusen fest, daß überschüssiges Wundexsudat auf den Wunden verblieb, da die okklusive Folie eine Evaporation der Haut verhinderte. Außerdem absorbierte die von mir eingesetzte Latex-Folie die überschüssige Feuchtigkeit der Wunde anders als der Hydrocolloid-Verband Comfeel[®] nicht. Die auf der Wunde verbliebene überzählige Feuchtigkeit führte zu starken Irritationen in der Wunde und an den gesunden Hautbereichen, die ebenfalls durch den Latex-Verband abgedeckt worden waren. Meine Ergebnisse stützen damit die Annahme von HOWARD et al (1993), daß eine semiokklusive Folie besser für die Wundheilung geeignet ist als ein okklusiver Verband. Bei stark nässenden Wunden ist allerdings selbst die Durchlässigkeit semiokklusiver Folien nicht ausreichend, eine Hautirritation zu verhindern. In der Praxis werden solche Wunden „offen“, d. h. ohne Wundabdeckung behandelt (PROKSCH, persönliche Mitteilung).

Der komplexe Vorgang der Wundheilung wird jedoch nicht allein durch äußere Einflüsse gesteuert. Vielmehr sind eine Vielzahl verschiedenartiger Zellen, Zytokine und Wachstumsfaktoren, Proteasen sowie Proteine der extrazellulären Matrix (des Granulationsgewebes und des Fibringerinnsels) in den Wundheilungsprozeß eingebunden.

Eine besondere Bedeutung für die Wundheilung kommt den proinflammatorischen Zytokinen, Interleukin-1 und Tumor Nekrose Faktor 1, zu, da sie von Zellen des Immunsystems und von Keratinozyten gleichermaßen sehr früh nach einer Verletzung sezerniert werden (DINARELLO,

1991; DEYERLE et al., 1992; TSAI et al., 1994; HOFMEISTER et al., 1997). WOOD et al. (1994) untersuchten, inwiefern die Bildung proinflammatorischer Zytokine bei Mäusen durch eine Latex-Okklusion nach einer oberflächlichen Hautverletzung verändert ist. Sie stellten fest, daß die Bildung von TNF α , IL-1 α und IL-1 β auf mRNA Ebene durch den Einsatz der okklusiven Folie nicht beeinflußt wird.

Die Signaltransduktionswege von TNF α und IL-1 überschneiden sich in ihren Zielzellen zum Teil und führen dabei auf unterschiedlichen Wegen zur Aktivierung derselben Enzyme. Eine zentrale Position bei der proinflammatorischen Signalvermittlung nehmen die Sphingomyelinasen ein, die mit einem neutralen und einem sauren Isoenzym die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose von Keratinozyten beeinflussen (HOFMEISTER et al., 1997; PERRY & HANNUN, 1998; FENSOME et al., 2000). Die Bedeutung der Sphingomyelinasen für die Wundheilung von Vollhautwunden ist bislang noch nicht untersucht worden.

JENSEN et al. (1999) zeigten an haarlosen Mäusen, daß bei einer oberflächlichen Wunde durch Störung der Permeabilitätsbarriere der Haut mit Hilfe von Tesafilmabrissen ein Anstieg in der Aktivität der sauren und neutralen Sphingomyelinase erfolgt. Die Permeabilitätsbarriere ist im Stratum corneum, der äußersten Hautschicht, lokalisiert. Sie setzt sich aus differenzierten Keratinozyten (Korneozyten) und lipidartigen Substanzen zusammen, die zwischen den Zellen im Interzellularraum eingelagert sind. Mit einer Vollhautexzision wird die Haut anders als bei einer Barrierestörung in ihrer vollständigen Struktur entfernt. Auf diese Weise läßt sich die Aktivität der Sphingomyelinasen bei einer tiefen Wunde in der ganzen Komplexität eines Heilungsprozesses, von der Proliferation bis zur Zelldifferenzierung, untersuchen.

SINGER & CLARK (1999) unterteilten den Heilungsprozeß von Vollhautwunden in drei Phasen. In der Entzündungsphase wird die Wunde provisorisch mit Fibrin verschlossen. Unter dem Fibrin bildet sich das Granulationsgewebe aus, eine netzartige Matrix, die aus Fibroblasten, Blutgefäßen u. a. besteht. Das Granulationsgewebe dient als Grundgerüst für die Hautneubildung und unterstützt die Versorgung der regenerierenden Hautzellen (Phase der Gewebeneubildung). Die letzte Phase der Wundheilung wird als Reepithelialisierung bezeichnet, bei der, vom Epithel der Wundränder und der Infundibuli der Haarfollikel ausgehend, Keratinozyten in die Wunde hineinwachsen und schließlich zum Wundverschluß führen. Dabei wird zunächst eine einschichtige, epidermale Zelllage gebildet, die später durch eine

Vielzahl von Zellteilungen mehrschichtig wird (SINGER & CLARK, 1999). Die Keratinozyten durchlaufen mehrere Zellzyklen, bevor sie zu Korneozyten ausdifferenzieren. In die Interzellularräume ausgeschleuste Lipide bilden mit den Korneozyten als Stratum corneum schließlich die regenerierte Permeabilitätsbarriere der Haut.

Ob und in welchem Zeitraum der Wundheilung die Sphingomyelinasen aktiv sind, war Bestandteil meiner Untersuchungen an Vollhautwunden haarloser Mäuse. Bei der Signaltransduktion von TNF α und IL-1 sind die Sphingomyelinasen in intrazelluläre Vorgänge wie die Proliferation, die Differenzierung oder den programmierten Zelltod, die Apoptose, eingebunden (GREENHALGH, 1998; MATHIAS et al., 1998). Welche Wirkung durch die Bindung eines proinflammatorischen Zytokins an seinen Rezeptor ausgelöst wird, ist von dem Differenzierungsstadium und der Art der aktivierten Zelle abhängig. Die Arbeitsgruppe um ANDRIEU (1994) stellte beispielsweise fest, daß in humanen Fibroblasten die saure Sphingomyelinase bei einer TNF α - oder IL-1-Stimulation kein zentraler Bestandteil der Signaltransduktion für die Zellproliferation ist.

Bei meinen Untersuchungen an haarlosen Mäusen fielen die Enzymaktivitäten in Gewebestrukturen der extrazellulären Matrix (Fibrin und Granulationsgewebe) wie auch im neugebildeten Epithel verhältnismäßig gering aus. Die Ergebnisse zur Aktivität der SMasen im Granulationsgewebe, das zum Großteil aus Fibroblasten aufgebaut ist, stimmen damit gut mit denen von ANDRIEU et al. (1994) überein. Im Wundrandepithel der untersuchten Mäuse konnte ich hingegen sowohl für die saure als auch für die neutrale Sphingomyelinase eine starke Enzymaktivität nachweisen. Meine Ergebnisse zeigen damit die Bedeutung der Wundränder für den Ablauf der Heilung durch die TNF α - und IL-1-Signaltransduktion auf.

Die Proliferation der Keratinozyten, die Hauptbestandteil des Wundrandepithels sind, war bei haarlosen Mäusen in meinen Untersuchungen zu Beginn der Wundheilung um ein Vielfaches erhöht und nahm im Verlauf der Heilung kontinuierlich ab. Die Enzymaktivitäten der Sphingomyelinasen im Wundrand haarloser Mäuse erhöhten sich hingegen während der Wundheilung vom dritten bis zum zwölften Tag nach Versuchsbeginn stetig. Daraus läßt sich ableiten, daß die Keratinozytenproliferation nur bedingt mit der Aktivität der beiden SMasen korreliert ist. Zudem war in dem neu gebildeten, noch nicht ausdifferenzierten Epithel ebenfalls nur eine geringe Sphingomyelinase-Aktivität nachzuweisen. Dies deutet ebenfalls

darauf hin, daß die neutrale und die saure SMase nicht vordringlich die Proliferation der Keratinozyten während der Wundheilung regulieren.

JENSEN et al. (1999) zeigten an haarlosen Mäusen, daß die saure Sphingomyelinase besonders in den äußeren epidermalen Zellschichten aktiv ist. Im Stratum granulosum finden beim Übergang zum Stratum corneum verstärkt Differenzierungsprozesse statt. Es ist nach den Ergebnissen von JENSEN et al. daher zu vermuten, daß zumindest die saure Sphingomyelinase in die Differenzierung eingebunden ist.

Das Differenzierungsstadium der Keratinozyten in den Wundrändern wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Expression von Involucrin und Loricrin untersucht, die Bausteine des „cornified envelope“ (CE), einer zellulären Gerüststruktur, sind (MEHREL et al, 1990; LI et al., 2000). Das CE verleiht den Korneozyten Festigkeit und dient als Verankerungsmatrix für die lipophilen Substanzen im Stratum corneum (HOHL et al., 1991; STEINERT & MAREKOV, 1997). Mit Hilfe der Immunhistochemie und der Westernblot-Technik konnte ich zeigen, daß der Gehalt der CE-Proteine zu Beginn der Wundheilung zunahm. Besonders die Menge an Involucrin steigerte sich über das Normalmaß unverletzter Haut hinaus. Als Ursache dafür ist denkbar, daß mehr Gerüstproteine gebildet worden waren, als für den Aufbau des CE benötigt wurden, um einen schnellen Wundverschluß zu erreichen. Der Überschuß an produzierten CE-Proteinen wurde in einem späteren Stadium der Wundheilung wieder resorbiert, was im Westernblot nachweisbar war. Meine Untersuchungen zeigten weiterhin, daß die Differenzierung der Keratinozyten unmittelbar nach Beginn der Proliferation einsetzte. Die Überexpression der Differenzierungsproteine hielt deutlich länger an als der Anstieg der Keratinozytenproliferation.

Die Aktivität der SMasen erhöhte sich von Beginn der Heilung an bis zum Ende des untersuchten Zeitraums von zwölf Tagen nach Setzen der Verletzung. Bis zu einem mittleren Heilungsabschnitt nahmen die SMase-Aktivitäten gleichzeitig mit der ansteigenden Keratinozytendifferenzierung zu. Die Aktivität der Sphingomyelinasen fiel somit zeitlich gesehen stärker mit den Differenzierungsprozessen als mit der Proliferation des Wundrandepithels zusammen. Dies Ergebnis stützt zum einen die Aussage von JENSEN et al. (1999), daß die saure SMase an der Zelldifferenzierung beteiligt ist. Zum anderen trifft dies nach meinen Untersuchungen auch für die neutrale SMase während der Wundheilung zu, deren Aktivität

mit steigendem Differenzierungsgrad ebenfalls zunahm. Die erhöhte Aktivität der SMasen am Ende der Wundheilung, als die Differenzierungsintensität bereits wieder rückläufig war, kann mit der Weiterleitung apoptotischer Signale über diese Enzyme erklärt werden. Die Apoptose soll eine überschießende Geweberegenerierung und damit eine Narbenbildung verhindern (GREENHALGH, 1998). Die anhaltende Enzymaktivität der SMasen bei bereits verringerten Differenzierungsabläufen war ursächlich für die negative Korrelation zwischen den beiden Prozessen. Meine erzielten Ergebnisse an haarlosen Mäusen stützen die Thesen von MATHIAS et al. (1998), daß die Sphingomyelinasen mit der Proliferation und der Differenzierung in Verbindung stehen. Es läßt sich aus den Ergebnissen allerdings eine stärkere Verbindung der Sphingomyelinasen zu den Differenzierungsprozessen als zur Proliferation der Keratinozyten ableiten.

Es ist bekannt, daß die Sphingomyelinasen zentrale Bestandteile der Signaltransduktionskaskaden darstellen, die durch die proinflammatorischen Zytokine, TNF α und IL-1, bei einer Störung der Homöostase der Haut ausgelöst werden (KOLESNICK & GOLDE, 1994). Anhand transgener Mausmodelle mit einer Defizienz für bestimmte Rezeptoren oder Proteine der Signalkaskaden konnte die Bedeutung bestimmter Signalübertragungen, die während eines Heilungsprozesses ablaufen, untersucht werden. TNF α und IL-1 überlappen teilweise in ihrem biologischen Wirkungsspektrum, was bereits dadurch deutlich wird, daß beide Zytokine auf differenten Wegen die neutrale und saure Sphingomyelinase aktivieren.

IL-1 bindet an zwei unterschiedliche Membranrezeptoren, IL-1-R1 und IL-1-R2, die in ihrer cytoplasmatischen Domäne stark voneinander variieren. Die Domäne des IL-1-Rezeptor 1 besteht aus 215 Aminosäuren, während der IL-1-R2 nur 29 cytosolische Reste aufweist (DEYERLE et al., 1992). Bedingt durch die C-terminale Verkürzung unterscheidet sich der IL-1-Rezeptor 2 nicht allein durch seine Masse von 60 bis 65 kD von dem IL-1-R1 (80 bis 85 kD), sondern vor allem in seiner Funktionalität. HOFMEISTER et al. (1997) und WOOD et al. (1997) führten an, daß nur über den IL-1-Rezeptor 1 eine Signaltransduktion erfolgt. Möglicherweise dient der IL-1-R2 dazu, das Signal des IL-1 abzuschwächen (HOFMEISTER et al. 1997), obwohl DINARELLO (1991) in seinem Übersichtsartikel erwähnt, daß IL-1 α bevorzugt am Rezeptor 1, IL-1 β dagegen am Rezeptor 2 bindet.

IL-1 α und - β üben wie TNF α eine pleiotrope Wirkung auf eine Reihe von Zelltypen aus. Beide Zytokintypen sind, wie schon bemerkt, als Entzündungsmediatoren in die Stimulation der Proliferation, der Differenzierung und des programmierten Zelltods involviert. IL-1 ist außerdem in die Zelladhäsion, Endothelzellaktivierung, in die Kollagenproduktion und die Knochen- und Knorpelresorption eingebunden (DEYERLE et al., 1992). In der Haut werden die beiden zugehörigen Interleukin-Rezeptoren in unterschiedlichen Zellschichten gebildet. WOOD et al. (1997) fanden heraus, daß in nicht geschädigter Maushaut kein IL-1-Rezeptor 1 nachzuweisen ist. DEYERLE et al. (1992) konnten den IL-1R1 auf Keratinozyten des epidermalen Gewebes sowie in der Dermis und in Haarfollikeln nachweisen. Außerdem wurde der IL-1-R1 auf T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Chondrozyten nachgewiesen (KIRCHNER et al., 1994). Der IL-1-Rezeptor 2 wird nach DEYERLE et al. (1992) hingegen hauptsächlich auf Keratinozyten in der Basalschicht ausgebildet und laut KIRCHNER et al. (1994) von B-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten expremiert. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte ich die Bedeutung des IL-1-Rezeptor 1 für die Wundheilung an IL-1-R1 defizienten Mäusen.

Bei der Heilung einer oberflächlichen Wunde, die durch eine Störung der Permeabilitätsbarriere der Haut verursacht wurde, war die Heilung bei Mäusen mit einer IL-1-R1-Defizienz nur gering verzögert (JENSEN et al., 1998). MAN et al. (1999) fanden bei den gleichen Mäusen und ähnlichen Versuchsbedingungen sogar eine beschleunigte Wiederherstellung der Barriere. Obwohl durch eine oberflächliche Verletzung der Haut eine erhöhte Sezernierung von IL-1 erfolgt, schlossen sie aus ihren Versuchen, daß IL-1 allein nicht essentiell für die Barriere-reparatur ist. Das Ergebnis wurde noch durch die Tatsache gestützt, daß die IL-1-R1 defizienten Mäuse keine morphologische Abnormalität unter basalen Bedingungen in ihrem Hautbild und speziell in ihrer Permeabilitätsbarriere zeigten.

Bei meinen Untersuchungen von Vollhautwunden an IL-1-R1 defizienten Mäusen stellte sich ein anderes Bild dar. Abhängig von der Größe der Wunde war die Heilung bei den defizienten Mäusen signifikant verzögert, oder die Tiere starben vorzeitig an ihren Verletzungen. Der verringerte Heilungserfolg wurde vor allem dadurch verursacht, daß die Geweberegenerierung verzögert war. Die Bestimmung der Proliferation in den Wundrändern IL-1-R1 defizienter Mäuse während der Heilung zeigte jedoch keinerlei Auffälligkeiten zu der von Wildtyp-Mäusen. Bei der Expression von Involucrin und Loricrin ließen sich

immunhistologisch kaum merkbare Unterschiede feststellen. Während sich Involucrin, das zu einem frühen Differenzierungsstadium in Hautzellen expremiert wird, in seiner Ausprägung nicht von der bei Wildtyp-Mäusen unterschied, setzte die Loricrin-Produktion bei den IL-1-R1 defizienten Mäusen früher als bei den Kontrolltieren ein. Loricrin gilt als ein Markerprotein für Keratinozyten in einem späteren Differenzierungsstadium (MEHREL et al., 1990). Die epidermalen Zellen der IL-1-R1 defizienten Mäuse zeigten in meinen Untersuchungen eine Differenzierungsstörung, da dieses Markerprotein stärker expremiert wurde als bei Mäusen mit einer intakten IL-1 Rezeptor 1 Signaltransduktion.

Nach einer im Durchmesser 1,5 mm messenden Hautexzision konnte GRAVES et al. (2001) keine Verzögerung im Verlauf der Heilung an IL-1-R1 defizienten Mäusen feststellen. Die Ergebnisse von GRAVES et al. widersprechen denen dieser Arbeit. Ihren Untersuchungen legten sie allerdings histologische Präparate zugrunde, so daß von jedem verletzten Tier nur ein Zeitpunkt der Heilung und nicht der ganze Heilungsverlauf betrachtet werden konnte. Außerdem bemaßen sie den Heilungsgrad der Hautwunden, anders als in der vorliegenden Arbeit, lediglich am Abstand der Wundränder zueinander in den quer geschnittenen Präparaten.

Nach KIRCHNER et al. (1994) entfaltet IL-1 β seine Funktion hauptsächlich als sezernierter, löslicher Botenstoff. IL-1 α bleibt nach ihren Aussagen hingegen meist an Zellen assoziiert und entfaltet seine biologische Aktivität in direktem Zell-Zell-Kontakt. GROVES et al. (1995) wiesen in gesunden Hautarealen bei transgenen Mäusen mit einer IL-1 α Überexpression eine Hyperkeratose, also eine verstärkte Differenzierung nach. Die Mäuse von GROVES et al. waren genetisch nur soweit manipuliert worden, daß sie mehr IL-1 α expremierten. In die Expression der IL-1 Rezeptoren wurde bei den Mäusen nicht eingegriffen. GROVES et al. (1995) machten in ihrem Artikel keine Angaben über ein verändertes Verhalten der Signaltransduktion über die IL-1 Rezeptoren der Keratinozyten. Wenn man davon ausgeht, daß IL-1 α an ihren Donorzellen assoziiert bleibt, muß es bei einer IL-1 α Überexpression zu Störungen bei der Bindung des IL-1 α an die IL-1-Rezeptoren der Zielzellen kommen, da viele IL-1 α präsentierende Zellen um wenige freie IL-1-Rezeptoren „konkurrieren“. Die Signaltransduktion könnte entsprechend vermindert sein.

Ein ähnlicher Fall ist gegeben, wenn, wie bei meinen Untersuchungen an Mäusen, eine Defizienz für den IL-1-R1 vorliegt. Die IL-1-Signaltransduktion dieser Mäuse war direkt unterbrochen, was ebenfalls zu einer früheren Differenzierung führte. Ein Fehlen der IL-1-Rezeptoren 1 kann außerdem eine Reihe anderer Veränderungen verursachen, da über den IL-1 Rezeptor 1 normalerweise auch andere, für die Wundheilung relevante Signalkaskaden angeschaltet werden. Eine Untersuchung dieser Signalwege war jedoch nicht Thema meiner Arbeit. Eine endgültige Klärung der veränderten Differenzierung in der IL-1 Signaltransduktion könnten an IL-1 α - und IL-1-R1 überexprimierenden Mäusen evaluiert werden, die am Department of Dermatology in Boston, USA bereits generiert wurden.

Eine primäre Aufgabe der IL-1/IL-1-R1 Signalvermittlung bei offenen Wunden liegt nach GRAVES et al. (2001) hauptsächlich in der Abwehr bakterieller Krankheitskeime. Bei Verletzungen am Gaumen IL-1-R1 defizienter Mäuse hielten die Entzündungsphase und die Infiltration von Monozyten und polymorphkernigen Zellen länger als bei Wildtyp-Mäusen an. Aus der zeitlich ausgedehnten Inflammationsphase resultierte eine verlangsamte Wundheilung. GROVES et al. (1995) entdeckten in transgenen Mäusen mit einer IL-1 α Überexpression das spontane Auftreten von Hautveränderungen. Sie konnten in den Läsionen eine erhöhte Infiltration von Macrophagen und Monozyten sowie Akanthosen (Verdickungen der Haut) oder Parakeratosen nachweisen.

Die von GRAVES et al. (2001) propagierte Aufgabe der IL-1 Signaltransduktion in der bakteriellen Abwehr spielte bei den von mir untersuchten IL-1-R1 defizienten Mäusen ebenfalls eine Rolle. Eine Keimfreiheit der Wundoberflächen war nicht vorausgesetzt worden, da die Untersuchungsbedingungen nach Möglichkeit natürliche Gegebenheiten widerspiegeln sollten. Der Heilungsprozeß IL-1-R1 defizienter Mäuse wurde von einer Reihe bakterieller Keime (u. a. von *Staphylococcus aureus* und verschiedenartigen Pseudomonaden) begleitet, die im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen länger in der Wunde nachweisbar waren (Daten unveröffentlicht). Ein vermehrter Keimbefall störte die natürliche Regeneration massiv und führte damit zu einer verzögerten Abheilung der IL-1-R1 defizienten Mäuse. Im Extremfall entstand nicht nur eine lokale Infektion, sondern die Krankheitserreger gelangten über das Gefäßsystem in den Blutkreislauf und die Mäuse starben an einer Sepsis.

Die Bedeutung der IL-1 Signaltransduktion in der Haut für Entzündungs- und Immunreaktionen bei einer Störung der Homöostase wurde auch von HOFMEISTER et al. (1997) herausgestellt. Da sowohl die neutrale als auch die saure Sphingomyelinase über die IL-1 Rezeptor 1 Signalkaskade aktiviert werden (KOLESNICK & GOLDE, 1994), lag es nahe, die Funktion der SMasen während der Wundheilung an IL-1-R1 defizienten Mäusen zu untersuchen.

HOFMEISTER et al. (1997) zeigten auf, daß für die Aktivierung der sauren SMase über den IL-1-Rezeptor 1 eine Internalisierung des IL-1/IL-1-R1 Komplexes notwendig ist. Außerdem wird die Aufnahme des Liganden-Rezeptor-Komplexes über ein Protein gesteuert, daß sie als IL-1 Rezeptor akzessorisches Protein (IL-1RAcP) bezeichneten. Die Aktivierung des neutralen Isoenzym über den IL-1 Rezeptor 1 läuft dagegen unabhängig von einer Internalisierung ab (BEZOMBES et al., 2000).

In meinen Untersuchungen an unverletzter Haut IL-1-R1 defizienter Mäuse wirkte sich die unterbundene Signalübertragung des IL-1/IL-1-R1 Systems nicht negativ auf die basale Aktivität der Sphingomyelinasen aus. Im Verlauf der Wundheilung, bei der vermehrt IL-1 und andere proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden, unterschied sich die Aktivität der sauren und neutralen SMase IL-1-R1 defizienter Mäuse ebenfalls nicht von der von Wildtyp-Mäusen. Allerdings blieb auch bei den Kontrollmäusen die deutliche Zunahme der Enzymaktivitäten mit fortschreitender Wundheilung, wie sie bei den zuvor untersuchten haarlosen Wildtyp-Mäusen ermittelt worden waren, aus. Die Bedingungen der Enzymaktivitätstests (pH-Wert, Reaktionstemperatur, Reaktionszeit, Substratmenge etc.) waren in Vorversuchen optimiert worden und schieden als mögliche Ursachen dafür aus. Der wahrscheinlichste Grund für die divergenten Ergebnisse meiner Arbeit ist in der geringeren Stichprobengröße bei allen Vergleichsstudien mit defizienten Mäusen zu suchen. Statt der üblichen zehn bis zwölf Tiere standen bei allen Versuchen an defizienten Tieren je Untersuchungszeitpunkt nur vier oder fünf Mäuse zur Verfügung. Durch die internen Kontrollen in jedem Versuchsansatz, die durch die jeweiligen Wildtyp-Mäuse gegeben waren, war eine Interpretation der Ergebnisse der jeweiligen Fragestellung dennoch zulässig. Eine Überschneidung der beiden Signaltransduktionswege, IL-1/IL-1-R1 und TNF α /TNF-R1, könnte für die normale Aktivierbarkeit der Sphingomyelinasen bei meinen Untersuchungen an IL-1-R1 defizienten Mäusen verantwortlich sein. Die Aktivierbarkeit der

Sphingomyelinasen sowohl über das IL-1/IL-1-R1 als auch über das TNF α /TNF-R1 System wurde bereits beschrieben (ADAM-KLAGES et al., 1998).

Wenn TNF α am TNF-Rezeptor 1 gebunden wird, führt das Signal über zwei distinkte Abschnitte der cytosolischen Rezeptordomäne zur Aktivierung der neutralen und sauren Sphingo-myelinase (SCHÜTZE et al., 1992; KOLESNICK & GOLDE, 1994; WIEGMANN et al., 1994). Während die N-SMase über die NS-Domäne (NSD, N-SMase activation domain) gesteuert wird, führt die Signaltransduktion zur A-SMase über die Todesdomäne (DD, Death domain) (ADAM et al., 1996). Für den Tumor Nekrose Faktor α sind wie für das IL-1 zwei Membranrezeptoren bekannt, die sich hinsichtlich ihrer cytoplasmatischen Domäne unterscheiden (TREFZER et al., 1991; KRISTENSEN et al., 1993; KOLESNICK & GOLDE, 1994). Während der TNF-R2 in der Haut nur eine untergeordnete Rolle spielt (TREFZER et al., 1991; WOOD et al., 1997; JENSEN et al., 1999), ist der 55 bis 60 kD große TNF-Rezeptor 1 maßgeblich für die Signaltransduktion, die zur Bildung von Zytokinen führt (WOOD et al., 1997). Außerdem wird durch das proinflammatorische Zytokin TNF α über den TNF-R1 die Zielzelle zur Proliferation, Differenzierung oder Apoptose angeregt. TNF α weist dadurch in seiner biologischen Aktivität eine große Übereinstimmung mit IL-1 auf, obwohl IL-1 keine Apoptose induziert (SMITH et al., 1990; DINARELLO, 1991). Jedoch ist die Spezifität der Zytokine zu den zugehörigen Rezeptoren klar abgegrenzt, und so bindet TNF α weder an IL-1-Rezeptoren noch IL-1 an TNF-Rezeptoren (SMITH et al., 1990).

Der TNF-Rezeptor 2 vermittelt hauptsächlich die Entwicklung der Thymus-Zellen (T-Zellen) und ist an der Steuerung der Proliferation von cytotoxischen T-Lymphozyten sowie des programmierten Zelltodes involviert. Der TNF-R2 hat eine Masse von 75 bis 80 kD. TREFZER et al. (1991) konnten in humanen Keratinozyten nur den TNF-Rezeptor 1 nachweisen, und auch in muriner Epidermis kommt hauptsächlich der TNF-R1 vor (WOOD et al., 1997). Allerdings konnten KRISTENSEN et al. (1993) in normaler Haut das Vorkommen des TNF-Rezeptor 2 in ekkrinen Schweißdrüsengängen und dendritischen Zellen der Dermis belegen. Ihre Untersuchungen zeigten aber deutlich die dominierende Rolle des TNF-R1 in den epidermalen Keratinozyten, in den Talg- und Schweißdrüsen sowie Haarfollikeln. JENSEN et al. (1999) untersuchten den transepidermalen Wasserverlust (TEWL, transepidermal water loss) transgener Mäuse mit einer TNF-R1 und TNF-R2 Defizienz nach oberflächlicher Verletzung der Epidermis. Ihre Ergebnisse bestätigten die Annahmen von KRISTENSEN et al.,

daß der TNF-Rezeptor 2 der Hautzellen nicht an der Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase beteiligt ist. Es war also sinnvoll, daß sich meine Untersuchungen zur Wundheilung der Haut auf den Signalweg des TNF-Rezeptor 1 konzentrierten.

JENSEN et al. (1999) zeigten, daß in unbehandelter Haut von TNF-R1 defizienten Mäusen das Aktivitätsniveau der SMasen nicht von dem der Wildtyp-Kontrollen abwich. Dieses Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit an unverletzter Haut TNF-R1 defizienter Mäuse bestätigt. Außerdem zeigten JENSEN et al., daß durch eine Störung der Permeabilitätsbarriere mittels Tesafilmabrissen bei TNF-R1 defizienten Mäusen im Gegensatz zu den Wildtyp-Kontrollen keine oder nur eine geringere Stimulation der neutralen und sauren Sphingomyelinase erfolgt. Die Heilungsprozesse einer oberflächlichen Verletzung und einer tiefen Wunde sind wegen der höheren Komplexität der Heilung bei einer tiefen Verletzung nur bedingt vergleichbar. Mit der Regenerierung der Permeabilitätsbarriere als letzten Schritt der Wundheilung wird die Homöostase der Haut endgültig wieder hergestellt.

In meinen Untersuchungen an TNF-R1 defizienten Mäusen zur Wundheilung nach tiefer Verletzung der Haut unterschieden sich die Sphingomyelinase-Aktivitäten im gesamten Verlauf der Heilung nicht von denen der Kontrolltiere. Denkbar ist jedoch, daß bei den TNF-R1 defizienten Mäusen die Aktivierung der SMasen über den intakten IL-1/IL-1-R1-Signalweg erfolgte.

MORI et al. (2002) fanden bei ihren Untersuchungen an TNF-R1 defizienten Mäusen in drei und sechs Tage alten Hautwunden einen verringerten IL-1 α - β Spiegel. Sie führten dies darauf zurück, daß die Expression dieser Zytokine über den TNF-Rezeptor 1 gesteuert wird. Allerdings sind am Anfang einer Signalkette einige wenige Liganden ausreichend, um eine Informationsübertragung auszulösen und dabei ein Signal gleichzeitig zu potenzieren. Es ist also denkbar, daß bei meinen Untersuchungen an TNF-R1 defizienten Mäusen eine Kompensation der Signaltransduktion zur Aktivierung der SMasen über das IL-1/IL-1-R1 System stattfand.

MAN et al. (1999) beschrieben, daß die Heilung einer oberflächlichen Hautverletzung bei einer TNF-Rezeptor 1 Defizienz nicht verzögert ist. Im selben Jahr wurde von JENSEN et al. (1999) dagegen das genaue Gegenteil publiziert. Nach MORI et al. (2002) heilten die

Verletzungen TNF-R1 defizienter Mäuse nach einer im Durchmesser vier Millimeter messenden Hautwunde schneller ab als die vergleichbarer Kontrolltiere. Es sind also mehrfach differierende Ergebnisse publiziert worden.

In meinen Untersuchungen ergab sich bei einem Wunddurchmesser von zehn Millimetern bei TNF-R1 defizienten Mäusen eine normale, nicht beschleunigte Wundheilung. Mit zunehmendem Wunddurchmesser verzögerte sich die Wundheilung dieser TNF-R1 defizienten Mäuse allerdings signifikant im Vergleich zu der bei Wildtyp-Mäusen. Die Wundkontraktion war ebenso wie die Gewebeneubildung verringert, so daß die TNF-R1 defizienten Mäuse bis zum vierzehnten Tag nach der Verletzung nicht vollständig abgeheilt waren. Der Vorgang der Proliferation war zu Beginn des Heilungsprozesses signifikant vermindert.

Meine Ergebnisse stehen konträr zu denen von MORI et al. ermittelten Werten, die auf eine beschleunigte Reepithelialisierung bei TNF-R1 defizienten Mäusen schlossen. Bei genauer Betrachtung der Untersuchungskriterien an den TNF-R1 defizienten Mäusen von MORI et al. ergaben sich folgende Gesichtspunkte. Die Mäuse von MORI et al. (2002) wurden auf der Basis der BALB/c Maus generiert, während unsere TNF-R1 defizienten Mäuse auf dem C57Bl/6 Stamm gezüchtet wurden. Dies kann bereits zu differenten Ergebnissen führen. Die Wunden, die von MORI et al. untersucht wurden, waren den Mäusen dorsal mit Hilfe einer Stanze beigebracht worden. Unseren TNF-R1 defizienten Mäusen wurden mit einer Schere lateral kreisförmige Hautstücke entfernt. Vergleicht man allein die Wundheilung der kleineren mit den größeren von mir gesetzten Wunden bei den TNF-R1 defizienten Mäusen, so ist bereits ersichtlich, daß die Wundgröße entscheidenden Einfluß auf den Heilungsverlauf hat. Bei Wunden mit einem Durchmesser von zehn Millimetern war die Heilung nicht verzögert und die Kontraktion sowie Reepithelialisierung fiel gleich hoch aus wie bei den Wildtyp-Mäusen.

Es ist denkbar, daß eine noch kleinere Wunde bei den TNF-R1 defizienten Mäusen, wie im Falle der Untersuchungen von MORI et al. zu ähnlichen Ergebnissen geführt hätte. Den Grad der Reepithelialisierung haben MORI et al., ähnlich wie GRAVES et al. (2001) bereits an IL-1-R1 defizienten Mäusen, nur an histologischen Präparaten getöteter TNF-R1 defizienter Mäuse evaluiert. Diese Technik vermag jedoch nur eine Momentaufnahme der Geweberegenerierung

pro Tier statt einen vollständigen Verlauf der Hautneubildung aufzuzeigen. In der vorliegenden Arbeit wurde neben der immunhistologischen Bestimmung der Proliferation der komplette Verlauf der Reepithelialisierung während des Heilungsprozesses jeder einzelnen Maus bestimmt.

MORI et al. erwähnten in ihrem Artikel auch, daß die Leukozyten- und Makrophageninfiltrationen sowie das Eindringen von neutrophilen Granulozyten in das Wundbett bei TNF-R1 defizienten Mäusen reduziert sind. GRAVES et al. (2001) führten die anhaltende Präsenz immunreaktiver Zellen in der Wunde und die verlängerte Entzündungsphase bei IL-1-R1 defizienten Mäusen als Grund für eine Heilungsverzögerung an. Die Bedeutung der Entzündung und die der immunreaktiven Zellen für die Geschwindigkeit einer Wundheilung ist ungeklärt. Meine Ergebnisse lassen aber darauf schließen, daß sich der systemische Effekt durch die Sepsis bei den von mir untersuchten IL-1-R1 defizienten Mäusen negativ auf den Heilungserfolg der Mäuse auswirkte. Bei den TNF-R1 defizienten Mäusen konnte ich keine Anzeichen einer Sepsis während des Heilungsprozesses ausmachen.

Im Verlauf der Wundheilung bei TNF-R1 defizienten Mäusen ergab sich, wie bei den IL-1-R1 defizienten Mäusen, daß die Reifung der Hautzellen ebenfalls beeinträchtigt war. Die Expression von Involucrin und Loricrin setzte bei den TNF-Rezeptor 1 defizienten Mäusen sogar früher ein als bei den Wildtyp-Mäusen. Anders als bei den IL-1-R1 defizienten Mäusen verlängerte sich bei den TNF-R1 defizienten Mäusen neben der Expression von Loricrin auch die von Involucrin. Beide einfachrezeptordefizienten Mausmodelle zeigten also eine veränderte Differenzierung.

Bei TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen konnte ich die additive kompensatorische Wirkung von TNF α und IL-1 überprüfen, da bei diesen Tieren beide Signaltransduktionswege gleichzeitig unterbrochen waren. Die Expression der beiden CE-Proteine fiel, trotz einer Zunahme in sechs Tage altem Wundrandepithel, deutlich geringer aus als bei den einfachdefizienten und bei nicht transgenen Kontrollmäusen. JENSEN et al. (1998) stellten fest, daß die Wiederherstellung der Homöostase der Haut bei TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen nach einer Störung der Permeabilitätsbarriere durch Tesafilmabrisse hoch signifikant verzögert war. Die Barriere der Haut wird durch den Aufbau und die Vernetzung der Differenzierungsproteine im CE wieder erneuert. Meine Ergebnisse

über die geringere Expression der Differenzierungsproteine, Involucrin und Loricrin, während der Wundheilung bei den TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen bestätigen damit die Ergebnisse von JENSEN et al., daß die Wiederherstellung der Barriere bei diesen Mäusen gestört ist.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten neutralen und sauren Sphingomyelinasen in unverletzter Epidermis TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienter Mäuse zeigten keine abnorme Aktivität. Im Verlauf der Heilung kam es jedoch, im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen, nicht zu einer signifikanten Stimulation der SMase-Aktivitäten. Meine Untersuchungen an den doppeldefizienten Mäusen bestätigen die Annahme, daß bei den einfachrezeptordefizienten Mäusen eine Kompensation der Aktivierbarkeit der SMasen über das verbliebene Rezeptorsystem erfolgte. Beim gemeinsamen Verlust der TNF-R1- und IL-1-R1-Signaltransduktion war nur eine geringe Aktivierbarkeit der SMasen während des Wundheilungsverlaufes nachweisbar.

Die von JENSEN et al. (1998) beschriebene verlangsamte Barriere-reparatur und das in der vorliegenden Arbeit festgestellte veränderte Differenzierungsmuster der TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäuse ließen vermuten, daß auch die Wundheilung nach einer Totalexzision der Haut stark eingeschränkt ist. Schon kleine, zehn Millimeter im Durchmesser messende Verwundungen führten zu einer verzögerten Wundheilung. Die Wundheilung kam bei einer Vervielfachung der Wundfläche bei den doppeldefizienten Mäusen praktisch zum Erliegen. Neben lokalen, die Wunde betreffenden Faktoren können auch systemische Effekte für die verzögerte oder sogar verhinderte Abheilung von Bedeutung sein. Die hohe Sterblichkeitsrate der TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäuse kann durch eine, wie bei den IL-1-R1 defizienten Mäusen beobachtete, Sepsis der Wunde hervorgerufen worden sein. Andererseits ist auch denkbar, daß außer einem Bakterienbefall in der Wunde auch andere Faktoren den Tod der doppeldefizienten Mäuse verursacht haben. Eine Studie der inneren Organe offenbarte, daß die Blase der sterbenden Tiere jeweils eine hohe Blutinfiltration aufwies. Vermutlich führte die eingeschränkte Vitalität der Mäuse durch die künstlichen Gendefekte gekoppelt mit der Verwundung und einer möglichen Bakterieninfektion zu lebensbedrohlichen, systemischen Effekten, die den Tod der Tiere induzierten. Denkbar ist auch, daß das Nierenepithel bei einer TNF-R1/IL-1-R1

Doppeldefizienz verändert ist, was bei erhöhtem Streß durch die Verwundung den Blutverlust in das Urogenitalsystem begünstigte.

Bei äußerlich gesund erscheinenden TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen zeigte sich, daß auch die Proliferation im Verlauf der Wundheilung stark reduziert war. Dies führte speziell bei den größeren Wunden auch während des Abheilens zu einer geringeren Reepithelialisierung. Die Untersuchungen an doppeldefizienten Mäusen ergaben also, daß zumindest einer der beiden Signaltransduktionswege intakt sein muß, damit eine Hautwunde abheilen kann. Jeder einzelne dieser Signaltransduktionswege kann bestimmte Signale, die auch zur Wirkungsweise des anderen Transduktionsweges gehören, in ausreichendem Maße vermitteln. In den einfachdefizienten Mausmodellen waren die Proliferation und Reepithelialisierung sowie die Differenzierung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nur leicht verändert. Die kompensatorische Wirkungsweise der beiden Signaltransduktionswege wurde besonders in der Aktivierung der Sphingomyelinasen deutlich, die bei einer einfachen Rezeptordefizienz nicht von denen der Wildtyp-Mäuse abwich. Die TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäuse waren dagegen in der Aktivierbarkeit ihrer SMasen sehr stark eingeschränkt.

Mit Hilfe von FAN und A-SMase defizienten Mäusen ließ sich der Einfluß der beiden Sphingomyelinase-Isoenzyme auf die Wundheilung stärker differenzieren. FAN überträgt als Adapterprotein das Signal von der NS-Domäne des TNF-Rezeptor 1 zur neutralen Sphingomyelinase (ADAM et al., 1996; ADAM-KLAGES et al., 1998; SÉGUI et al., 2001). In FAN defizienten Mäusen ist die Aktivierung der N-SMase jedoch durch das Fehlen des Adapterproteins lediglich eingeschränkt, da die neutrale Sphingomyelinase weiterhin über den IL-1-Rezeptor 1 und das Fas/APO-1-Ligandensystem stimulierbar bleibt (ADAM et al., 1996; GUAN et al., 2000).

In meinen Untersuchungen unverletzter Haut FAN defizienter Mäuse war die Aktivität der N-SMase nicht verringert. Am Ende des Heilungsprozesses von Vollhautwunden zeigte sich bei diesen defizienten Mäusen aber eine signifikant verringerte Aktivität der neutralen Sphingomyelinase. Die saure Sphingomyelinase, die von der Funktion des FAN-Adapterproteins unabhängig aktivierbar ist, war in ihrer Aktivität zu einem mittleren Zeitpunkt der Heilung signifikant erhöht. Worin diese verstärkte Aktivität der A-SMase im Heilungsverlauf bei einer

FAN Defizienz begründet liegt, ist unklar. Eine mögliche Kompensation der fehlenden Aktivierbarkeit der neutralen Sphingomyelinase durch die saure A-SMase ist die wahrscheinlichste Erklärung dafür.

KREDER et al. (1999) beschrieben zwar, daß in einer FAN defizienten Keratinozytenkultur über einen Zeitraum von fünf Minuten nach einer Stimulation mit TNF α keine Auffälligkeit im Aktivitätsmuster der A-SMase nachzuweisen war. Die *in vivo* Situation ist jedoch wesentlich komplexer und vermittelt eher einen Eindruck natürlicher Vorgänge in den epidermalen Zellen. Nach einer oberflächlichen Verwundung stellten KREDER et al. (1999) bei den FAN defizienten Mäusen eine verringerte Barriere-reparatur fest. Als Meßgröße bestimmten sie den TEWL, nachdem sie das Stratum corneum mit Tesafilmabrisen entfernt hatten. In unbehandelter Haut fanden sie bei den FAN defizienten Mäusen eine erhöhte Evaporation, die, obgleich sie keinen besonderen Phänotyp bei den defizienten Mäusen erkannten, etwa vierzig Prozent höher lag als in vergleichbaren Kontrollmäusen. In einer weiteren Untersuchung an FAN defizienten Mäusen konnten KREDER et al. eine verminderte Proliferation nach einer Störung der Permeabilitätsbarriere der Haut nachweisen.

In meinen Untersuchungen an FAN defizienten Mäusen waren sowohl die Wundheilung als auch die Wundkontraktion und die Reepithelialisierung unauffällig. Im Verlauf der Wundheilung war die Proliferation hoch signifikant verringert. Aus dieser geringeren Proliferation resultierte am Ende der Wundheilung im Vergleich zu den Kontrolltieren eine geringere Epithelneubildung. Die Differenzierung setzte während des Abheilens der Verletzungen FAN defizienter Mäuse etwas früher als bei den Wildtyp-Kontrollen ein. Die Expression des späten Differenzierungsproteins, Loricrin, war zu den Untersuchungszeitpunkten weniger stark ausgeprägt, als in den Wildtyp- und den einfachrezeptordefizienten Mäusen. Anscheinend ist die neutrale SMase außer in die Proliferation vor allem in Differenzierungsprozesse eingebunden. Dafür spricht die abgeschwächte Aktivität der neutralen Sphingomyelinase am Ende der Wundheilung FAN defizienter Mäuse. Die verminderte Expression des CE-Proteins, Loricrin, bei FAN defizienten Mäusen stützt die Annahme, daß die Barriere-rekonstitution der Haut dieser Mäuse gestört ist. Dies kann die erhöhte Evaporation über die ungeschädigte Haut der FAN defizienten Mäuse erklären, die KREDER et al. in ihren Ergebnissen beschrieben.

ROSIEN (2001) zeigte, daß durch die Inhibierung der sauren Sphingomyelinase mit Imipramin und Pepstatin A bei haarlosen Wildtyp-Mäusen eine verminderte Loricrin- und Involucrin-Expression induziert werden kann. Eine topische Applikation des A-SMase Inhibitors, Pepstatin A, verursachte außerdem eine verzögerte Barriere-reparatur, was nochmals auf die enge Verbindung der A-SMase mit der Zelldifferenzierung hinweist. JENSEN et al. (1999) und SCHMUTH et al. (2000) konnten zeigen, daß die A-SMase durch eine Barriestörung besonders in den äußeren, differenzierteren Zellagen der Haut aktiv ist, was die Ergebnisse von ROSIEN stützt. SCHMUTH et al. folgerten aus ihren Untersuchungen, daß die A-SMase in Abhängigkeit zum Schädigungsgrad der Hautbarriere aktiviert wird. Nach ihren Untersuchungen setzt die Aktivierung der A-SMase sehr früh nach einer oberflächlichen Schädigung der Haut ein.

Das Zusammenspiel der sauren Sphingomyelinase und der Differenzierungsvorgänge wurde von mir an Haut A-SMase defizienter Mäuse untersucht. Die immunhistologisch untersuchte Expression des frühen Differenzierungsproteins, Involucrin, in unverletzter Haut unterschied sich nicht von der bei Wildtyp-Mäusen. Involucrin fand seine stärkste Ausprägung auch bei den A-SMase defizienten Mäusen sechs Tage nach Beginn der Wundheilung. Loricrin wurde hingegen, wie bei den TNF α - und IL-1-rezeptordefizienten Mäusen, früher als bei den Wildtyp-Kontrollen drei Tage nach Versuchsbeginn verstärkt im Wundrand nachgewiesen. Die Expression von Loricrin verstärkte sich bei den A-SMase defizienten Mäusen, wodurch Loricrin im weiteren Verlauf der Wundheilung auch in tieferen Zellagen der Wundränder nachzuweisen war. Meine Ergebnisse zeigen, daß die Differenzierung bei einer A-SMase Defizienz gestört ist.

Es ist aber bekannt, daß eine A-SMase Defizienz systemische Effekte zur Folge hat, die sich auch bei einer Wundheilung äußern können (OTTERBACH & STOFFEL, 1995; ZUMBANSEN, 2001). A-SMase defiziente Mäuse retardieren etwa drei Monate nach der Geburt und gehen dann zugrunde. Dafür verantwortlich ist die Tatsache, daß Mäuse mit einem Defekt im A-SMase codierenden Gen in ihrem retikuloendothelialen System der Leber, der Milz, des Knochenmarks, der Lunge und des Gehirns Sphingomyelin, das Substrat der sauren Sphingomyelinase, anreichern. Im Hirn führt dieser Gendefekt, der beim Menschen auch als Niemann-Pick-Erkrankung (NP) bekannt ist, zur Degradierung der Ganglienzellen in den Purkinjefasern (HAIMOWITZ-FRIEDMANN et al., 1997; RÉTHY et al., 2000). Durch einen

partiellen Ausfall der A-SMase kommt es zu visceralen Störungen (NP-Typ B). Bei einer vollständig gestörten Funktion der sauren Sphingomyelinase ist auch das neuronale System betroffen (NP-Typ A). RÉTHY et al. stellten außerdem fest, daß die saure Sphingomyelinase beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) ein 65 % verringertes Aktivitätsniveau aufweist. Sie konnten nachweisen, daß die für beide Erkrankungen verantwortlichen Gene gemeinsam auf einem Chromosom codiert sind und bei Patienten mit BWS einen frühzeitigen Tod herbeiführen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, daß die saure und neutrale Sphingomyelinase unterschiedlich reguliert werden, da ein völlig normaler Aktivitätsverlauf der N-SMase während der Wundheilung der A-SMase defizienten Mäuse nachzuweisen war. Eine Aktivität der sauren Sphingomyelinase war erwartungsgemäß selbst in unverletzter Haut der A-SMase defizienten Mäuse nicht nachweisbar, so daß diese Mäuse phänotypisch dem Niemann-Pick Typ A entsprechen.

Bei A-SMase defizienten Mäusen zeigte sich außerdem, daß die Wundheilung nach einer Vollhautexzision der Flanke unterschiedlicher Größe anfänglich hoch bis höchst signifikant schneller als bei Wildtyp-Mäusen verlief. Dies wurde vor allem durch eine verstärkte Wundkontraktion zu Beginn der Wundheilung erreicht. Am Ende der Wundheilung waren jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den A-SMase defizienten Mäusen und den Kontrolltieren hinsichtlich der einzelnen Heilungsparameter festzustellen. Die Proliferation und die Reepithelialisierung im Verlauf der Wundheilung A-SMase defizienter Mäuse wies keinerlei Auffälligkeiten auf. Die neutrale Sphingomyelinase ist nach den hier vorliegenden Ergebnissen anscheinend stärker als die saure Sphingomyelinase in Prozesse eingebunden, die der Geweberegenerierung der Haut dienen. Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchungen der Proliferation bei FAN defizienten Mäusen indirekt bekräftigt, da die Zellneubildung in diesem Mausmodell mit der eingeschränkten Signalübertragung zur neutralen SMase ausgehend vom TNF-Rezeptor 1 verringert war. Die Ergebnisse zu den beiden SMase-Isoenzymen in der Signaltransduktion deuten darauf hin, daß die neutrale Sphingomyelinase stärker in die Proliferation und Differenzierung eingebunden ist als die saure Form dieses Enzymtyps. Eine endgültige Klärung könnten Untersuchungen an N-SMase defizienten Mäusen bringen, bei denen die Signaltransduktion über dieses Enzym anders als bei FAN defizienten Mäusen vollständig ausgeschaltet ist. Eine N-SMase

defiziente Maus ist bereits in der medizinischen Fakultät der Universität Köln generiert worden (ZUMBANSEN & STOFFEL, 2002). Diese defiziente Maus stand allerdings für meine Versuche nicht zur Verfügung.

Meine Untersuchungen lassen also darauf schließen, daß die Signaltransduktion der proinflammatorischen Zytokine über den TNF-Rezeptor 1 und den IL-1-Rezeptor 1 für die Wundheilung und die Rekonstitution der Haut wichtig sind. Die Aktivität der sauren und neutralen Sphingomyelinase fällt bei der Wundheilung stärker mit den Differenzierungsprozessen als mit der Proliferation der Keratinozyten zusammen. Eine Verbindung zur Proliferation ist aber zumindest für die neutrale Sphingomyelinase nicht auszuschließen. Die Heilung einer Hautwunde kann außerdem durch den Einsatz einer semiokklusiven Folie, wie Comfeel[®] unterstützt werden.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am Mausmodell die Bedeutung der TNF α - und IL-1-Signaltransduktionswege *in vivo* und *in situ* im Verlauf der Wundheilung nach einer tiefen Hautverletzung aufzuklären. Insbesondere sollte die Funktion der neutralen und sauren Sphingomyelinase, wichtiger Enzyme der IL-1- und TNF α -Signalkaskaden, für die Keratinozytenregenerierung und -differenzierung untersucht werden. Ferner sollte der Einfluß verschieden durchlässiger Verbände auf die Wundheilung, die Wundkontraktion und die Geweberegenerierung sowie auf die Zellmigration im Mausmodell erforscht werden.

Die vollständige Abheilung einer Verletzung bei Mäusen wurde durch eine Wundauflage aus einer okklusiven Folie (Latex) oder einem wasserdampfdurchlässigen Verband (Comfeel®) im Vergleich zu nicht abgedeckten Wunden hinausgezögert. Beide Verbände förderten jedoch die Hautneubildung und reduzierten die Wundkontraktion. Außerdem wurde die Keratinozytenmigration durch die Wundauflagen unterstützt, was eine verstärkte STAT-3-Phosphat Expression zeigte. Beim Einsatz von Comfeel® blieb eine Irritation des an die Wundfläche angrenzenden Epithels wie im Falle der Latex-Behandlung aus.

Die Untersuchungen an IL-1- und TNF α -rezeptordefizienten Mäusen zeigten, daß sich sowohl ein fehlender IL-1 Rezeptor 1 als auch eine TNF-Rezeptor 1 Defizienz negativ auf die Wundheilung auswirkt. IL-1-R1 defiziente Mäuse wiesen eine signifikant verzögerte Heilung auf, die mit zunehmender Wundgröße unter dem Einfluß einer auftretenden Sepsis bei diesen Mäusen nicht mehr zur Abheilung führte. Trotz einer normalen Proliferation der Keratinozyten in der Basallamina der Haut, war die Reepithelialisierung bei den IL-1-R1 defizienten Mäusen verringert. TNF-R1 defiziente Mäuse hingegen zeigten erst bei Verwundungen mit einem Durchmesser von 20 mm eine hoch signifikant verringerte Wundheilung, die aus einer signifikant verminderten Wundkontraktion und aus einer ebenfalls geringeren Gewebeneubildung resultierte. Die Proliferation bei den TNF-R1 defizienten Mäusen war zu Beginn der Wundheilung signifikant vermindert.

Im letzten Schritt der Wundheilung wird die Permeabilitätsbarriere der Haut wiederhergestellt, für die die Ausdifferenzierung der Keratinozyten entscheidend ist. Hierbei werden bestimmte Proteine, wie Involucrin und Loricrin, in das „cornified envelope“ eingebaut. Die Involucrinexpression im Wundrand IL-1-R1 defizienter Mäuse wich im Verlauf der Wundheilung nur geringfügig von der vom Wildtyp ab, während sie sich bei den TNF-R1 Defizienten auch auf spätere Stadien der Wundheilung ausdehnte. Auch beim Loricrin zeigten beide ein-

fachrezeptordefizienten Mausmodelle keine normale Expression, was bei ihnen auf eine gestörte epidermale Differenzierung schließen läßt.

Die Bedeutung der proinflammatorischen Zytokine kam besonders bei den TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen zum Ausdruck. Ihre Wundheilung war bereits bei kleineren Hautverletzungen stark eingeschränkt und führte zu einer hohen Sterblichkeit der Tiere während der Untersuchungen. Bei einer einfachen Rezeptordefizienz konnten Teile der für die Wundheilung wichtigen Signaltransduktion über den jeweilig verbliebenen Signalweg kompensiert werden. Bei TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen war zum einen die Proliferation höchst signifikant verringert und zum anderen die Differenzierung stark eingeschränkt. Dies zeigt, daß entscheidende Schritte der Wundheilung über TNF α und IL-1 reguliert werden.

Welche Bedeutung der neutralen und sauren Sphingomyelinase für den Vorgang der Wundheilung zukommt, wurde neben den rezeptordefizienten- auch an haarlosen Wildtyp-Mäusen, an A-SMase- sowie FAN defizienten Mäusen untersucht. Mit FAN wird ein Adapterprotein bezeichnet, das die N-SMase bei einer Bindung von TNF α an den TNF-R1 aktiviert. Untersuchungen an den Wildtyp-Mäusen machten deutlich, daß beide SMase-Enzyme verstärkt am Ende der Wundheilung aktiv sind. Während eine FAN Defizienz nur bedingt zu einer verminderten N-SMase Aktivitierbarkeit führte, waren erst bei TNF-R1/IL-1-R1 doppeldefizienten Mäusen beide Enzyme in ihrer Aktivität stark eingeschränkt.

Die Wundheilung FAN defizienter Mäuse verlief normal, während bei den A-SMase defizienten Tiere durch eine vermehrte Wundkontraktion eine raschere Heilung erfolgte. Die Proliferation war nur bei FAN defizienten Mäusen zeitweise vermindert. Die Differenzierung zeigte in beiden Mausmodellen Abweichungen zum Maus-Wildtyp auf. Involucrin wurde bei FAN defizienten Mäusen bereits früh vermehrt expremiert. Loricrin hingegen blieb hinter dem normalen Expressionsniveau zurück. Bei A-SMase defizienten Mäusen war nur die Loricri-nexpression verändert, die sich ungewöhnlicherweise auch auf tiefer gelegene Zellagen der Haut ausdehnte.

Zusammenfassend zeigten die vorliegenden Untersuchungen, daß die TNF α - und IL-1-Signaltransduktionen in der Wundheilung von Bedeutung sind. Die Signalwege der Zytokine überlappen sich teilweise, so daß erst durch eine Rezeptordoppeldefizienz alle Phasen der Wundheilung, einschließlich der N- und A-SMase Aktivität verringert waren. Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Mechanismen, werden als Grundlagen für die Entwicklung spezifischer Therapien bei einer gestörten Wundheilung dienen.

6 Abstract

The goal of the following work was to explain through mouse models the significance of TNF α - and IL-1 signal transduction pathways *in vivo* and *in situ* in the process of wound healing following serious skin injury. In particular, the function of neutral- and acid-sphingomyelinase, an important enzyme in the TNF α - and IL-1 signal cascades, was examined in keratinocyte regeneration and differentiation. In addition, the influence of permeable wound dressings on wound healing, wound contraction and tissue regeneration, as well as on cell migration, is examined through mouse models.

The complete healing of an injury to mouse skin was delayed through wound coverage with occlusive foil (latex) or a water vapor permeable bandage (Comfeel $\text{\textcircled{C}}$) in comparison to uncovered wounds. Both types of wound dressing promoted the regrowth of skin and reduced wound contraction. In addition, keratinocyte migration was supported by wound coverage, which demonstrated an increased STAT-3 phosphate expression. With the application of Comfeel $\text{\textcircled{C}}$ as well as latex bandages, no irritation occurred in the epithelial tissue surrounding the wound areas.

The examination of IL-1 and TNF α receptor deficient mice showed that a deficiency of IL-1 receptor-1 (IL-1-R1) and TNF α receptor-1 (TNF-R1) had a negative impact on wound healing. IL-1-R1 deficient mice demonstrated a significantly delayed wound healing, which, with increasing wound size and under the influence of a resulting sepsis, led to a cessation of the healing process. Despite the normal proliferation of keratinocytes in the basal layer of the epidermis, reepithelialization was reduced in IL-1-R1 deficient mice. In contrast, TNF-R1 deficient mice showed a significantly delayed wound healing only first with wounds of more than 20 mm diameter, demonstrated through significantly reduced wound contraction and similarly reduced tissue regeneration. In TNF-R1 deficient mice, proliferation was significantly reduced at the beginning of the wound healing process.

In the last phase of wound healing, the permeability layer of the skin is regenerated—a process in which the differentiation of keratinocytes is decisive. During this phase, specific proteins such as involucrin and loricrin are integrated into the „cornified envelope.“ Involucrin expression at wound peripheries in the process of wound healing showed only slight differences in IL-1-R1 deficient mice as compared to wild type controls. However, in TNF-R1 de-

ficient mice the same effect was seen even in later stages of the wound healing process. Also in the case of loricrin, both receptor deficient mouse models showed abnormal expression, which is a sign of disturbed epidermal differentiation.

The significance of proinflammatory cytokines was particularly shown in the TNF-R1/IL-1-R1 double deficient mice. Their wound healing was so highly compromised that, already with even minor skin injuries, the subject animals experienced a high mortality rate during the experiments. In case of a simple receptor deficiency, elements important for the signal transduction in wound healing can be compensated for through the remaining signal pathway. In TNF-R1/IL-1-R1 double deficient mice, proliferation was highly significantly reduced and differentiation was highly restricted. This shows that decisive steps in the wound healing process are regulated by TNF α and IL-1.

The role of neutral (N) and acid (A) sphingomyelinase (SMase) in the wound healing process was examined in receptor deficient mice as well as in hairless wild type mice, A-SMase- and FAN-deficient mice. FAN, an adapter protein of the TNF-R1 is shown to activate N-SMase by binding TNF α . Experiments on wild type mice clearly showed that both SMase enzymes are increasingly active at the end of the wound healing process. As a FAN deficiency leads only partially to a decreased activation of N-SMase, both enzymes were only significantly restricted in their activities in TNF-R1/IL-1-R1 double deficient mice.

Wound healing in FAN deficient mice progressed normally, while in A-SMase deficient animals, quicker healing resulted on account of the increased wound contraction. Proliferation in FAN deficient mice was partially reduced. In both mouse models, the differentiation process deviated from the wild type mouse. In FAN deficient mice, involucrin was already early increasingly expressed. In contrast, loricrin remained behind the normal expression level. Loricrin expression changed only in A-SMase deficient mice, where it was also seen in unusually low epidermal layers.

In summary, the performed experiments showed that TNF α - and IL-1-signal transduction are important in wound healing. As the signal pathways of cytokines are partially overlapped, all phases of wound healing, including N- and A-SMase activity, first show reduction with the presence of receptor double deficiency. The mechanisms shown in the following work serve as a basis for the development of specific therapies to address disturbed wound healing.

7 Literaturverzeichnis

- ADAM, D., WIEGMANN, K., ADAM-KLAGES, S., RUFF, A. & KRÖNKE, M. (1996). A novel cytoplasmic domain of the p55 Tumor Necrosis Factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J. Biol. Chem.* **271** (24): 14617-14622
- ADAM-KLAGES, S., SCHWANDNER, R., ADAM, D., KREDER, D., BERNADO, K. & KRÖNKE, M. (1998). Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *J. Leukocyte Biol.* **63** (6): 678-682
- ÅGREN, M. S. & EVERLAND, H. (1997). Two hydrocolloid dressings evaluated in experimental full-thickness wounds in the skin. *Acta Derm. Venereol.* **77**: 127-131
- ÅGREN, M. S., MERTZ, P. M. & FRANZÉN, L. (1997). A comparative study of three occlusive dressings in the treatment of full-thickness wounds in pigs. *J. Am. Acad. Dermatol.* **36**: 53-58
- AKASAKA, Y., ISHIKAWA, Y., ONO, I., FUJITA, K., MASUDA, T., ASUWA, N., INUZUKA, K., KIGUCHI, H. & ISHI, T. (2000). Enhanced expression of caspase-3 in hypertrophic scars and keloid: induction of caspase-3 and apoptosis in keloid fibroblasts in vitro. *Lab. Invest.* **80** (3): 345-357
- ANDRIEU N., SALVAYRE, R. & LEVADE T. (1994). Evidence against involvement of the acid lysosomal sphingomyelinase in the tumor-necrosis-factor- and interleukin-1-induced sphingomyelin cycle and cell proliferation in human fibroblasts. *Biochem J.* **303** (2): 341-345
- BEZOMBES, C., SÉGUI, B., CUVILLIER, O., BRUNO, A. P., URO-COSTE, E., GOUAZÉ, V., ANDRIEU-ABADIE, N., CARPENTIER, S., LAURENT, G., SALVAYRE, R., JAFFRÉZOU, J.-P. & LEVADE, T. (2000). Lysosomal sphingomyelinase is not solicited for apoptosis signaling. *FASEB J.* 10.1096/fj.00-0466fje.
- BOWSER, P. A. & GRAY, G. M. (1978). Sphingomyelinase in pig and human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **70** (6): 331-335
- BROWN, R. E., JARVIS, K. L. & HYLAND, K. J. (1989). Protein measurement using bicinchoninic acid: Elimination of interfering substances. *Anal. Chem.* **180**: 136-139
- CLARK, R. A. F. (1996). Wound repair. Overview and general consideration. In: *The molecular and cellular biology of wound repair.* (ed. Clark, R. A. F.) 2nd edition: 3-35 New York, Plenum Press
- COLLAWN, S. S. (2000). Occlusion following laser resurfacing promotes reepithelialization and wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* **105** (6): 2180-2189

- DE CONINCK, A., DRAYE, J.-P., VAN STRUBARQ, A., VANPÉE, E., KAUFMAN, L., DELAEY, B., VERBEKEN, G. & ROSEEUW, D. (1996). Healing of full-thickness wounds in pigs: effects of occlusive and non-occlusive dressings associated with gel vehicle. *J. Dermatol. Sci.* **13**: 202-211
- DEYERLE, K. L., SIMS, J. E., DOWER, S. K. & BOTHWELL, M. A. (1992). Pattern of IL-1 receptor gene expression suggests role in noninflammatory processes. *J. Immunol.* **149** (5): 1657-1665
- DINARELLO, C. A. (1991). Interleukin-1 and Interleukin-1 antagonism. *Blood* **77** (8): 1627-1652
- ECKERT, R. L., YAFFE, M. B., CRISH, J. F., MURTHY, S. RORKE, E. A. & WELTER, J. F. (1993). Involucrin - structure and role in envelope assembly. *J. Invest. Dermatol.* **100**: 613-617
- EHRlich, P. (1886). Hämatoxylin und Eosin. *Z. wiss. Mikr.* **3**: 150. In: *Farbatlas histologischer Färbemethoden.* (ed. Smith & Bruton) (1979): 128. Stuttgart, F.K. Schattauer Verlag
- FENSOME, A. C., RODRIGUES-LIMA, F., JOSEPHS, M., PATERSON, H. F. & KATAN, M. (2000). A neutral magnesium-dependent sphingomyelinase isoform associated with intracellular membranes and reversibly inhibited by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **275** (2): 1128-1136
- GERDES, J., SCHOLZEN, T., GERLACH, C., KUBBUTAT, M. H. G. & ZENTGRAF, H. (1997). Assessment of cell proliferation in murine tissues with a polyclonal antiserum against the murine Ki-67 protein. *Eur. J. Cell. Biol.* **72** (Suppl. 43): 88 (Abstract 263)
- GERLACH, C., SAKKAB, D. Y., SCHOLZEN, T., ALISON, M. R. & GERDES, J. (1997). The proliferation associated Ki-67 protein: Expression pattern during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Eur. J. Cell. Biol.* **72** (Suppl. 43): 88 (Abstract 264)
- GIORNO, R. (1984). A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn. Immunol.* **2** (3): 161-166
- GRAVES, D. T., NOOH, N., GILLEN, T., DAVEY, M., PATEL, S., COTTRELL, D. & AMAR S. (2001). IL-1 plays a critical role in oral, but not dermal, wound healing. *J. Immunol.* **167**: 5316-5320
- GREENHALGH, D. G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **30** (9): 1019-1030
- GROSS, J., FARINELLI, W., SADOW, P., ANDERSON, R. & BRUNS, R. (1995). On the mechanism of skin wound "contraction": A granulation tissue "knockout" with a normal phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 5982-5986

- GROVES, R. W., MIZUTANI, H., KIEFER, J. D. & KUPPER, T. S. (1995). Inflammatory skin disease in transgenic mice that express high levels of interleukin 1 α in basal epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 11874-11878
- GUAN, D. W., OSHIMA, T. & KONDO, T. (2000): Immunohistochemical study on Fas and Fas ligand in skin wound healing. *Histochem. J.* **32** (2): 85-91
- HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A., KOLESNICK, R. N. & FUKS, Z. (1997). Ceramide signaling in apoptosis. *Br. Med. Bull.* **53** (3): 539-553
- HILL, C. S. & TREISMAN, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity *Cell* **80**: 199-211
- HIRANO, T., ISHIHARA, K. & HIBI, M. (2000). Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* **19** (21): 2548-2556
- HOFMEISTER, R., WIEGMANN, K., KORHERR, C., BERNARDO,, K., KRÖNKE, K. & FALK, W. (1997). Activation of acid Sphingomyelinase by Interleukin-1 (IL-1) requires the IL-1 receptor accessory protein. *J. Biol. Chem.* **272** (44): 27730-27736
- HOHL, D., MEHREL, T., LICHTI, U., TURNER, M. L., ROOP, D. R. & STEINERT, P. M. (1991). Characterization of human loricerin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope protein. *J. Biol. Chem.* **266**: 6626-6636
- HOWARD, R. D., STASHAK, T. S. & BAXTER, G. M. (1993). Evaluation of occlusive dressings for management of full-thickness excisional wounds on the distal portion of the limbs of horses. *Am. J. Vet. Res.* **54** (12): 2150-2154
- HU, Y., BAUD, V., OGA, T. KIM, K. I., YOSHIDA, K. & KARIN, M. (2001). IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B. *Nature* **410**: 710-714
- HÜBNER, G., BRAUCHLE, M., SMOLA, H., MADLENER, M., FÄSSLER, R., WERNER, S. (1996). Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* **8**:548-556
- JENSEN, J.-M., KUPPER, T. S. & PROKSCH, E. (1998). IL-1/IL-1 receptor overexpression and knockout constructs in permeability barrier repair of transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* **110**: 449a (Abstract 161)
- JENSEN, J.-M., SCHÜTZE, S., FÖRL, M., KRÖNKE, M. & PROKSCH, E. (1999). Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *J. Clin. Invest.* **104**: 1761-1770
- KANITAKIS, J., ZAMBRUNO, G., VIAC, J. & THIVOLET, J. (1987). Involucrin expression in keratinization disorders of the skin - a preliminary study. *Br. J. Dermatol.* **117**: 479-480

- KIRA, M., SANO, S., TAKAGI, S., YOSHIKAWA, K., TAKEDA, J. & ITAMI, S. (2002). STAT3 deficiency in keratinocytes leads to compromised cell migration through hyperphosphorylation of gp130(cas). *J. Biol. Chem.* **277** (15): 12931-12936
- KIRCHNER, H., KRUSE, A., NEUSTOCK, P. & RINK, L. (1994). Cytokine und Interferone. Botenstoffe des Immunsystems. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag: 54-56
- KISHIMOTO, T., TAGA, T. & AKIRA, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell* **76**: 253-262
- KOLESNICK, R. & GOLDE, D. W. (1994). The sphingomyelin pathway in Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 signaling. *Cell* **77**: 325-328
- KOSCO-VILBOIS, M., ZENTGRAF, H., GERDES, J. & BONNEFOY, J. Y. (1997). To „B“ or not to „B“ a germinal center. *Immunol. Today* **18**: 225-230
- KRAUSS, G. (1997). Biochemie der Regulation der Signaltransduktion. Weinheim, Wiley VCH Verlagsgesellschaft GmbH
- KREDER, D., KRUT, O., ADAM-KLAGES, S., WIEGMANN, K., SCHERER, G., PLITZ, T., JENSEN, J.-M., PROKSCH, E., STEINMANN, J., PFEFFER, K. & KRÖNKE, M. (1999). Impaired neutral sphingomyelinase activation and cutaneous barrier repair in FAN-deficient mice. *EMBO J.* **18** (9): 2472-2479
- KRISTENSEN, M., CHU, C. Q., EEDY, D. J., FELDMANN, M., BRENNAN, F. M. & BREATHNACH, S. M. (1993). Localization of Tumour Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) and its receptors in normal and psoriatic skin: Epidermal cells express the 55-kD but not the 75-kD TNF receptor. *Clin. Exp. Immunol.* **94**: 354-362
- LÄMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- LAPLANTE, A. F., GERMAIN, L., AUGER, F. A. & MOULIN, V. (2001). Mechanism of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *The FASEB J.* **15**: 2377-2389
- LEE, S.-C., LEE, J.-B., KOOK, J.-P., SEO, J.-J., NAM, K.-I., PARK, S.-S. & KIM, Y. P. (1999). Expression of differentiation markers during fetal skin development in humans: immunohistochemical studies on the precursor proteins forming the cornified cell envelope. *J. Invest. Dermatol.* **112** (6): 882-886
- LEVINE, R., ÅGREN, M. S. & MERTZ, P. M. (1998). Effect of occlusion on cell proliferation during epidermal healing. *J. Cutan. Med. Surg.* **2** (4): 193-198
- LI, E. R., OWENS, D. M., DIJAN, P. & WATT, F. M. (2000). Expression of involucrin in normal, hyperproliferative and neoplastic mouse keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **9** (6): 431-438
- LIAO, J., XU, X. & WARGOVICH, M. J. (2000). Direct reprobing with anti- β -actin antibody as an internal control for western blotting analysis. *Biotechniques* **28**: 216-218

- LIU, B. & HANNUN, Y. A. (1997). Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J. Biol. Chem.* **272** (26): 16281-16287
- MAN, M. Q., WOOD, L., ELIAS, P. M. & FEINGOLD, K. R. (1999). Cutaneous barrier repair and pathophysiology following barrier disruption in IL-1 and TNF type 1 receptor deficient mice. *Exp. Dermatol.* **8** (4): 261-266
- MARTIN, P. (1997). Wound healing - Aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**: 75-81
- MATHIAS, S., PEÑA, L. A. & KOLESNICK, R. N. (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* **335**: 465-480
- MAZZALUPO, S., WAWERSIK, M. J. & COULOMBE, P. A. (2002). An ex vivo assay to assess the potential of skin keratinocytes for wound epithelialization. *J. Invest. Dermatol.* **118** (5): 866-870
- MEHREL, T., HOHL, D. & ROTHNAGEL, J. A. (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell* **61**: 1103-1112
- MERRILL JR., A. H. & JONES, D. D. (1990). An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1044**: 1-12
- MOHR, V. D., SPELTER, H., SCHMIDT, J. & ZIRNGIBL, H. (1999). Wound dressings in chronic wounds. *Zentralbl. Chir.* **124** Suppl. 1: 56-64
- MORETTI, S., MASSOBRIO, R., BROGELLI, L., NOVELLI, M., GIANNOTTI, B. & BERNENGO, M. G. (1990). Ki67 antigen expression correlates with tumor progression and HLA-DR antigen expression in melanocytic lesions. *J. Invest. Dermatol.* **95** (3): 320-324
- MORGAN, P. W., BINNINGTON, A. G., MILLER, C. W., SMITH, D. A., VALLIANT, A. & PRESCOTT, J. F. (1994). The effect of occlusive and semi-occlusive dressings on the healing of acute full-thickness skin wounds on the forelimbs of dogs. *Vet. Surg.* **23** (6): 494-502
- MORI, R., KONDO, T., OSHIMA, T., ISHIDA, Y. & MUKAIDA, N. (2002). Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *FASEB J.* **16**: 963-974
- NEUBERGER, Y., SHOGOMORI, H., LEVY, Z., FAINZILBER, M. & FUTERMAN, A. H. (2000). A lyso-platelet activating factor phospholipase C, originally suggested to be a neutral-sphingomyelinase, is located in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **469**: 44-46
- OTTERBACH, B. & STOFFEL, W. (1995). Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick Disease). *Cell* **81**: 1053-1061

- PALADINI, R. D., TAKAHASHI, K., BRAVO, N. S. & COULOMBE, P. A. (1996). Onset of re-epithelialization after skin injury correlated with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J. Cell Biol.* **132**: 381-397
- PAUL, W. E. & SEDER, R. A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**: 241-251
- PERRY, D. K. & HANNUN, Y. A. (1998). The role of ceramide in cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**: 233-243
- PLANAS, A. M., BERRUEZO, M., JUSTICIA, C., BARRÓN, S. & FERRER, I. (1997). STAT3 is present in the developing and adult rat cerebellum and participates in the formation of transcription complexes binding DNA at the sis-inducible element. *J. Neurochem.* **68**: 1345-1351
- QUINTERN, L. E. & SANDHOFF, K. (1991). Human acid sphingomyelinase from human urine. *Methods Enzymol.* **197**: 536-540
- RÉTHY, L. A., KÁLMÁNCHEY, R., KLUJBER, V., KOÓS, R. & FEKETE, G. (2000). Acid sphingomyelinase deficiency in Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Pathol. Oncol. Res.* **6** (4): 295-297
- RICE, R. H. & GREEN, H. (1979). Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell* **18**: 681-694
- ROBINSON, N. A., LACELLE, P. T. & ECKERT, R. L. (1996). Involucrin is a covalently crosslinked constituent of highly purified epidermal corneocytes: Evidence for a common pattern of Involucrin crosslinking in vivo and in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **107**: 101-107
- ROOP, D. R., CHENG, C. K., TITTERINGTON, L., MEYERS, C. A., STANLEY, J. R., STEINERT, P. M. & YUSPA, S. H. (1984). Synthetic peptides corresponding to keratin subunits elicit highly specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **259**: 8037-8040
- ROSIEN, F. (2001). Saure Sphingomyelinase-Signaltransduktion durch Cathepsin D reguliert die epidermale Proliferation und Differenzierung in der Reparatur der Permeabilitätsbarriere der Haut. (Dissertation) Medizinische Fakultät des Uniklinikums der Universität Kiel
- SANO, S., ITAMI, S., TAKEDA, K., TARUTANI, M., YAMAGUCHI, Y., MIURA, H., YOSHIKAWA, K., AKIRA, S. & TAKEDA, J. (1999). Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J.* **18** (17): 4657-4668
- SAUDER, D. N. (1990). The role of epidermal cytokines in inflammatory skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* **95**: 27S-28S

- SCHMUTH, M., MAN, M.-Q., WEBER, F., GAO, W., FEINGOLD, K. R., FRITSCH, P., ELIAS, P. M. & HOLLERAN, W. M. (2000). Permeability barrier disorder in Niemann-Pick disease: sphingomyelin-ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *J. Inv. Dermatol.* **115** (3):459-466
- SCHÜTZE, S., POTTHOFF, K., MACHLEIDT, T., BERKOVIC, D., WIEGMANN, K. & KRÖNKE, M. (1992). TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine-specific Phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* **71**: 765-776
- SÉGUI, B., CUVILLIER, O., ADAM-KLAGES, S., GARCIA, V., MALAGARIE-CAZENAVE, S., LÉVÊQUE, S., CASPAR-BAUGUIL, S., COUDERT, J., SALVAYRE, R., KRÖNKE, M. & LEVADE, T. (2001). Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J. Clin. Invest.* **108** (1): 143-151
- SINGER, A. J. & CLARK, R. A. F. (1999). Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* **341** (10): 738-746
- SMITH, C. A., DAVIS, T., ANDERSON, D., SOLAM, L., BECKMANN, M. P., JERZY, R. & DOWER, S. K. (1990). A receptor for Tumor Necrosis Factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* **248**: 1019-1023
- STEINERT, P. M. & MAREKOV, L. N. (1997). Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked of the keratinocyte cornified envelope. *J. Biol. Chem.* **272**: 2021-2030
- STERNBERGER, L. A. (1979). The unlabeled antibody (PAP) method. Hormone receptor, Golgi-like and dual color immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **27** (12): 1657-1659
- STOCUM, D. L. (1997). New tissues from old. *Science* **276**: 15
- TANIGUCHI, T. (1994). Cytokine signalling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* **268**: 251-255
- THIEL, M. J. (1998). Molekulare Mechanismen der Wundheilung. 96. Jahrestagung der DOG **R329**: (Abstract 98)
- TOMIC-CANIC, M., KOMINE, M., FREEDBERG, I. M. & BLUMENBERG, M. (1998). Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* **17** (3): 167-181
- TOWBIN, H. T. M., STAHELIN, T. M. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354
- TREFZER, U., BROCKHAUS, M., LOETSCHER, H., PARLOW, F., KAPP, A., SCHÖPF, E. & KRUTMANN, J. (1991). 55-kD Tumor Necrosis Factor receptor is expressed by human keratinocytes and plays a pivotal role in regulation of human keratinocyte ICAM-1 expression. *J. Invest. Derm.* **97** (5): 911-916

- TSAI, J. C., FEINGOLD, K. R., CRUMRINE, D., WOOD, L. C., GRUNFELD, C. & ELIAS, P. M. (1994). Permeability barrier disruption alters the localization and expression of TNF α /protein in the epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* **286**: 242-248
- VAN DE KERKHOFF, P.C.M., DE MARE, S., ARNOLD, W. P. & VAN ERP, P. E. J. (1995). Epidermal regeneration and occlusion. *Acta Derm. Venereol.* **75**: 6-8
- VAN ROSSUM, M. M., MOMMERS, J. M., VAN DE KERKHOFF P. C. M., DE JONGH, G. J., VAN HOOIJDONK, C. A. & VAN ERP, P. E. (1998). Multi parameter flow cytometric assessment of regenerative epidermis with special reference to the antiproliferative effect of occlusion. *Anal. Cell. Pathol.* **17** (3): 157-165
- WATT, F. M. (1983). Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **81**: 100s-103s
- WHITEHEAD, T. P., KRICKA, L. J., CARTER, T. J. & THORPE, G. H. (1979). Analytical luminescence: Its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* **25**: 1531-1546
- WIEGMANN, K., SCHÜTZE, S., MACHLEIDT, T., WITTE, D. & KRÖNKE, M. (1994). Functional dichotomy of neutral and acid sphingomyelinases in Tumor Necrosis Factor signaling. *Cell* **78**: 1005-1015
- WOOD, L. C., ELIAS, P. M., SEQUEIRA-MARTIN, S. M., GRUNFELD, C. & FEINGOLD, K. R. (1994). Occlusion lowers cytokine mRNA levels in essential fatty acid-deficient mice and normal mouse epidermis, but not after barrier disruption. *J. Invest. Dermatol.* **103** (6): 834-838
- WOOD, L. C., STALDER, A. K., LIU, A., CAMPBELL, I. L., GRUNFELD, C., ELIAS, P. M. & FEINGOLD, K. R. (1997). Barrier disruption increases gene expression of cytokines and the 55 kD TNF receptor in murine skin. *Exp. Dermatol.* **6**: 98-104
- YUSPA, S. H., KILKENNY, A. E., STEINERT, P. M. & ROOP, D. R. (1989). Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in-vitro. *J. Cell. Biol.* **109**: 1207-1217
- ZUMBANSEN, M. (2001). Biochemische und molekularbiologische Studien zur Charakterisierung der murinen neutralen Sphingomyelinase *in vitro* und *in vivo*. (Dissertation) Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln
- ZUMBANSEN, M. & STOFFEL, W. (2002). Neutral sphingomyelinase 1 deficiency in the mouse causes no lipid storage disease. *Mol. Cell. Biol.* **22** (11): 3633-3638

Danksagung

Die richtigen Worte des Dankes zu finden und dabei jedem gerecht zu werden, ist nie ganz einfach. Deshalb danke ich zunächst allen lieben Menschen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. All diejenigen, die ich hier namentlich zu nennen unbeabsichtigt vergessen habe, mögen mir dies bitte verzeihen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau, Isa, die mir nach der Diplomarbeit ein weiteres Mal einen Eremitenstatus zugestand, damit ich in Ruhe meine Dissertation niederschreiben konnte. Gleiches gilt auch für meine lieben Freunde Martina Blümel und Heiko Trautmann, die mir zudem bei Computerproblemen hilfreich waren.

Herrn Prof. Dr. Dr. Proksch danke ich für die Vergabe des Themas und dafür, daß ich meine Versuche so selbständig planen und durchführen durfte. Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Wünnenberg, der sich spontan bereit erklärte, meine Doktorarbeit zu betreuen. Herrn Prof. Dr. Braune danke ich ganz besonders für die positiven Anregungen am Ende meiner Promotion.

Frau Claudia Neumann danke ich für ihre Unterstützung bei den nicht immer angenehmen Maus-Versuchen und die hervorragende Einführung in die Geheimnisse der Immunhistochemie. Heidi Pönicke und Dagmar Blankenburg bin ich für ihre Hilfe beim Erstellen der digitalen Bilder meiner Mausstudien zu Dank verpflichtet. Ich möchte auch meine Kollegen Michael Förl und Christiane Sandberg nicht unerwähnt lassen, die mir die Arbeit im Isotopenlabor näher brachten. Unserem chinesischen Gastwissenschaftler Xuping Wang verdanke ich neben fruchtbaren Diskussionen über meine Versuche vor allem das Wissen um die Potenz der „Alt“-Taste des Computers, was für mich die Gestaltung der schriftlichen Arbeit revolutioniert hat.

Außerdem sei allen Kollegen aus der Immunologie, wie Andrea Hethke, Michael Heinrich, Stefan Schütze, Marc Wickel, Sandra Ussat, Silke Lüschen, Sabine Adam-Klages, Dieter Adam und allen anderen gedankt, die bei Fragen immer ein offenes Ohr für mich hatten. Gleiches gilt natürlich auch für alle Kollegen aus der Dermatologie.

Zuletzt möchte ich meinem Kollegen Jens-Michael Jensen und seiner Freundin Kate van Houghten für die Korrektur der englischen Zusammenfassung meiner Dissertation danken und Frau Herden aus dem Prüfungsamt, die mir in meiner Promotion so unbürokratisch half.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, einschließlich Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie, abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Michael Schunck

Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit:

- SCHUNCK, M., NEUMANN, C., JENSEN, J.-M., SCHÜTZE, S., KUPPER, T. S. & PROKSCH, E. (2001). Severely delayed wound healing in TNF-Receptor p55 and IL-1-Receptor 1 deficient/double deficient mouse models. Kongreß der Society of investigative dermatology, Washington D. C., USA (Poster)
- SCHUNCK, M., JENSEN, J.-M., NEUMANN, C., SCHÜTZE, S. & PROKSCH, E. (2001). TNF- and IL-1 signal transduction pathways are crucially involved in wound healing. Kongreß der European society of dermatological research, Stockholm, Schweden (Vortrag). *J. Invest. Dermatol.* **117** (3): 772 (Abstract 40)
- SCHUNCK, M., JENSEN, J.-M., NEUMANN, C. & PROKSCH, E. (2003). Effects of occlusive and semi-occlusive foils on wound healing. Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung, Frankfurt am Main (als Poster angenommen)

Weitere Publikationen:

- SCHUNCK, M. & BRAUNE, H. P. (2002). Behavioral and physiological adaptations to cold-resistance of the Chrysomelid beetle, *Agelastica alni*. Tagung der Deutschen zoologischen Gesellschaft, Leipzig (Poster)
- JENSEN, J.-M., WINOTO-MORBACH, S., SCHUNCK, M., NEUMANN, C., FÖRL, M., SCHÜTZE, S. & PROKSCH, E. (2003). Epidermal ceramide metabolism in aged skin. Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung, Frankfurt am Main (als Poster angenommen)
- SADOWSKI, T., DIETRICH, S., SCHUNCK, M., PROKSCH, E. & SEDLACEK, R. (eingereicht). MMP-19 expression in normal and diseased skin: Regulation by epidermal proliferation and differentiation.

Lebenslauf

Name: Michael Schunck, geb. Fuhrmann

Geburtsdatum: 17. Dezember 1968

Geburtsort: Kiel

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Joachim Fuhrmann
Brigitte Riemer

Familienstand: verheiratet

Ehefrau: Christiane-Isabel Schunck

Schulbildung: August 1975 – Juni 1979
Grundschule am Heidenberger Teich, Kiel

August 1979 – Mai 1989
Gymnasium am Bildungszentrum Mettenhof, Kiel

Wehrdienst: Oktober 1989 – September 1990

Berufsausbildung: Oktober 1990 – Juni 1992
Landwirtschaftlich-technischer Assistent
Berufsbildende Schulen III, Lüneburg

Berufstätigkeit: September 1992 – Oktober 1993
Technischer Angestellter im Geochemischen Labor
des geologischen Landesamtes Schleswig-Holstein

Studium: Oktober 1993 – Februar 1999
Biologie an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Christian-Albrechts-Universität, Kiel
Abschluß: 17. Februar 1999 mit dem Diplom

Promotionsstudium: März 1999 – Juli 2002
Sonderforschungsbereich 415
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Medizinische Fakultät des Universitätsklinikums
Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Wissenschaftliche Tätigkeit: August 2002 –
Sonderforschungsbereich 617
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Medizinische Fakultät des Universitätsklinikums
Christian-Albrechts-Universität, Kiel