

# **Chemokine als Mediatoren der kutanen Wundheilung**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Dipl. Biol. Erich Bünemann**

aus Hagen a.T.W.

Düsseldorf

April 2007

Aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf – Hautklinik

Der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Bernhard Homey

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2007

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. Bernhard Homey betreut.

Die experimentellen Arbeiten wurden im Dermato-Immunologischen und Onkologischen Labor in der Hautklinik des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Herr Prof. Dr. Bernhard Homey hat mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die Möglichkeit zur Promotion gegeben. Ganz besonders bin ich ihm für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und seine engagierte Betreuung dankbar.

Ich danke herzlich Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau und meinen Kindern für ihre unendliche Geduld mit dieser Arbeit.

Ich danke außerdem:

Attila Antal, Egon und Ursula Bünemann, Arne Gerber, Robert Kubitzka, Anke van Lierop, Stephan Meller, Norbert Neumann, Juliane Rieker, A. Treiber, Andrea Wiesenborn, Ulrike Wiesner, Albert Zlotnik

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
1.1	Die Funktion der Haut	9
1.2	Der Aufbau humaner Haut	10
1.2.1	<i>Epidermis</i>	11
1.2.2	<i>Dermis</i>	12
1.3	Aufbau der murinen Haut	13
1.4	Biologie der Wundheilung	14
1.4.1	<i>Entzündungsreaktion</i>	17
1.4.2	<i>Proliferation - Bildung des Granulationsgewebes</i>	19
1.4.3	<i>Remodellierung</i>	20
1.5	Chemokine	21
1.5.1	<i>Chemokine und ihre Rezeptoren</i>	25
1.6	Fragestellung	30
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>32</b>
2.1	Material	32
2.1.1	<i>Chemikalien, Lösungen und Puffer</i>	32
2.1.2	<i>Medien</i>	33
2.1.3	<i>Proteine</i>	33
2.1.4	<i>Toxine und Inhibitoren</i>	34
2.1.5	<i>Geräte und Verbrauchsmaterial</i>	34
2.1.6	<i>Antikörper für die FACS-Analyse</i>	35
2.1.7	<i>Antikörper für die Immunhistochemie</i>	36
2.2	Methoden	38
2.2.1	<i>Kutanes Wundheilungsmodell</i>	38
2.2.2	<i>Kultur primärer Zellen</i>	39
2.2.3	<i>Analytische Durchflußzytometrie (FACS)</i>	39
2.2.4	<i>In vitro-Wound Repair Assay</i>	40
2.2.5	<i>Immunohistochemie</i>	41
2.2.6	<i>Nukleinsäuren-Analyse</i>	42

---

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
3.1	Mediatoren des dynamischem Wundheilungsprozesses	46
3.1.1	<i>Globale Regulationsmuster</i>	47
3.1.2	<i>Absolute Regulationsmuster ausgewählter Chemokine</i>	54
3.2	Chemokinrezeptorprofil humaner struktureller Zellen	56
3.3	Regulation relevanter Chemokinliganden in strukturellen Zellen	60
3.4	Das Chemokin-Netzwerk in der kutanen Wundheilung	64
3.5	Chemokine vermitteln Wundheilung von strukturellen Zellen <i>in vitro</i>	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>78</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>100</b>
9.1	Artikel:	100
9.2	Poster	101
9.3	Vorträge:	102
9.4	Preise:	103

## Abkürzungsverzeichnis

### A

Ab	Antibody, Antikörper
Akt	Protein Kinase B

### B

bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserum-Albumin

### C

°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre DNA
CCL	C-Chemokin Ligand
CCR	C-Chemokin Rezeptor
CXCL	CX-Chemokin-Ligand
CXCR	CX-Chemokin-Rezeptor

### D

Da	Dalton
DAG	Diazylglyzerol
DC	Dendritic cell, Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxy-Ribonucleic-Acid (s. DNS)
DNase	Desoxyribonuclease
DNS	Desoxy-Ribonucleinsäure

### E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor, epidermaler Wachstumsfaktor
EZM	Extrazelluläre Matrix

### F

Fab	Antigen-binding fragment, antigenbindendes Fragment
FACS	Fluorescence activated cell sorter / Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	Fetal bovine serum / fötales Rinderserum
FCS	Fetal calf serum / fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat

### G

g	Gramm
GAG	Glukosaminoglykane
GPCR	G-Protein coupled receptor, G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen

**H**

h	Stunde
HB-EGF	Heparin binding Epidermal Growth Factor, heparin gebundener epidermaler Wachstumsfaktor
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRP	Horseradish-Peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell / humane Nabelschnur Endothelzelle

**IFN**

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
ICH	Immunohistochemie
IGF-1	Insulin like Growth Factor, insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat

**J**

JaK	Janus-Kinase
-----	--------------

**K**

kg	Kilogramm
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

**M**

m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mAb	monoclonal Antibody, Monoklonaler Antikörper
MEM	Minimal essential medium
min	Minute
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger-RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

**N**

n.d.	Not determined / nicht bestimmt
nm	Nanometer

**O**

OD	Optische Dichte
----	-----------------

**P**

p	Probability / Wahrscheinlichkeit
pAb	Polyclonal Antibody, polyklonaler Antikörper
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell, Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphate buffered saline, Salzlösung, phosphatgepuffert
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor, von Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor
PI3K	Phosphatidylinositol3-Kinase
PKC	Proteinkinase-C
PLC	Phospholipase-C
PTX	Pertussis-Toxin

**R**

RNA	Ribonucleic-Acid (s. RNS)
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RPM	Rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute

**S**

s	Sekunde
SD	Standard deviation, Standardabweichung

**T**

TNF	Tumor necrosis factor, Tumor Nekrosefaktor
TGF	Transforming Growth Factor, transformierender Wachstumsfaktor

**V**

VCAM	Vascular cell adhesion molecule, vaskuläres Zell-Adhäsions Molekül
VEGF	Vascular Endothelial Cell Growth Factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

# 1 Einleitung

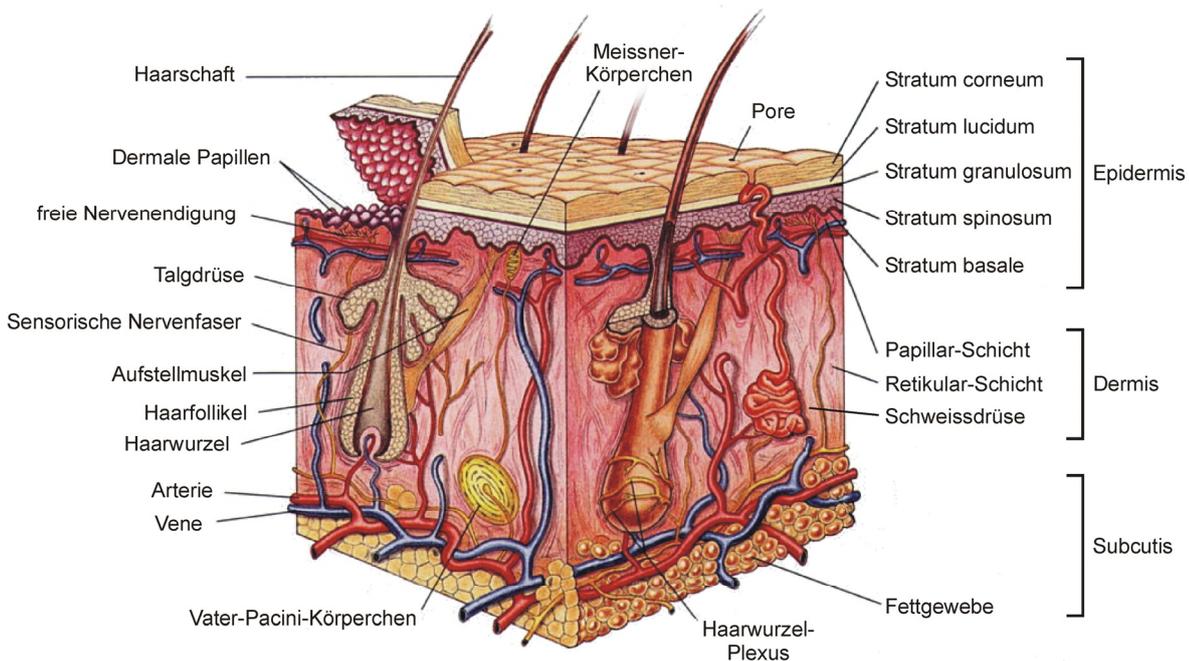
## 1.1 Die Funktion der Haut

Die Haut bildet die äußere Grenzschicht zwischen dem Menschen und seiner Umwelt. Mit einer Oberfläche von etwa 2 m<sup>2</sup> und einem Anteil von 7-8% an der Gesamtkörpermasse ist sie das größte Organ des Körpers. Sie fungiert als Barriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen, schützt vor physikalischem Stress und chemischen Noxen, ist an der Regulation der Körpertemperatur und des Wasserhaushaltes beteiligt und besitzt die Fähigkeit zur Resorption und Sekretion von Stoffen. Durch ihre hohe mechanische Belastbarkeit schützt sie die inneren Organe vor Schaden durch äußere Einflüsse.

Als umfassendes Sinnesorgan ermöglicht die Haut durch das Vorhandensein von freien Nervenendigungen und speziellen Rezeptoren die Wahrnehmung und Lokalisation einer Vielzahl von Reizen wie Druck, Berührung, Vibration, Temperatur und Schmerz.

## 1.2 Der Aufbau humaner Haut

Die humane Haut setzt sich aus zwei unterschiedlichen Schichten zusammen. Es wird zwischen der Epidermis (Oberhaut), die die äußere Schicht der Haut bildet, sowie der unter ihr liegenden dickeren Dermis (Lederhaut oder Corium) unterschieden. Die beiden Kompartimente sind durch eine dünne widerstandsfähige Schicht extrazellulärer Matrix, der Basalmembran (*Stratum basale*), getrennt. Unter der Dermis bildet die Subkutis (Unterhaut), mit ihrem subkutanen Fettgewebe den Übergang zwischen der Haut und den darunterliegenden Sehnen und Muskeln <sup>1, 2, 3</sup>.



**Abb. 1:** Schematischer Hautschnitt. (Abbildung modifiziert nach [www.cosmetique.ch](http://www.cosmetique.ch))

### 1.2.1 Epidermis

Die humane Epidermis ist ein gefäßloses, zum Teil verhorntes (keratinisiertes) Plattenepithel von 0,03 bis 1,3 mm Dicke, das aus fünf Schichten aufgebaut ist: dem Stratum corneum (Hornschicht), dem Stratum lucidum (Glanzschicht), dem Stratum granulosum (Körnerzellschicht), dem Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und dem Stratum basale (Basalzellschicht). Die Versorgung der Epidermis geschieht durch Diffusion von Nährstoffen aus dem Kapillarnetz der Dermis. Dominierender Zelltyp der Epidermis sind die Keratinozyten. Ausgehend vom proliferativ aktiven Stratum basale durchläuft der Keratinozyt im Zuge der Differenzierung die einzelnen Schichten der Epidermis, bis er schließlich als kernloser und keratinreicher Korneozyt in der äußersten Schicht, dem Stratum corneum endet. Daneben befinden sich in der Haut pigmentproduzierende Melanozyten, immunologisch aktive Langerhanszellen und Merkelzellen, die zusammen jedoch weniger als 5 % der Gesamtzellzahl der Epidermis ausmachen.

Zu ihrem Erhalt und zur Aufrechterhaltung der Schutzfunktion für den Körper, darf die Epidermis bei gewöhnlicher Belastung nicht übermäßig abgenutzt werden und muss zudem die Fähigkeit besitzen, sich zu erneuern. Sie muss auch elastisch genug sein, um die Bewegungen des Körpers nicht zu hemmen. Diese Anforderungen erfüllt das *Stratum corneum* (Hornschicht), eine aus vollständig verhornten Zellen bestehende Deckschicht der Epidermis, die je nach Region zwischen 12 und 200 Zellschichten dick sein kann. Das abschilfernde Hornmaterial des *Stratum corneum* wird während der normalen Homöostase der Haut stets erneuert. Hierfür unterliegen die Keratinozyten einem ständigen Proliferations- und Differenzierungsprozess

(Keratinisierung), der die Epidermis in distinkte Schichten unterteilt: Nach der Zellteilung von Basalzellen im wellenförmigen *Stratum basale* (Basalschicht), das die unterste Schicht der Epidermis bildet, durchlaufen die Keratinozyten in *Stratum spinosum* (Stachelschicht) und *Stratum granulosum* (Körnerschicht) ansteigende Reifegrade, bis sie terminal differenziert im *Stratum corneum* eingelagert und schließlich außen als tote Zellen abgestoßen werden. Unter physiologischen Verhältnissen nimmt die Erneuerung der Epidermis von der Zellteilung bis zur Abstoßung der verhornten Zellen etwa 30 Tage in Anspruch<sup>4, 5</sup>.

### 1.2.2 Dermis

Unterhalb der Basalmembran der Epidermis findet sich die Dermis, auch *Corium* oder Lederhaut genannt. Sie ist ein stützendes gefäß- und nervenreiches Bindegewebe von 0,6 bis 3 mm Dicke und dient der Verankerung und Versorgung der gefäßfreien Epidermis. Histologisch gliedert sich die Dermis in das *Stratum papillare* (Papillarschicht) und das *Stratum reticulare* (Netzschicht), die nicht streng voneinander abgegrenzt sind, sondern sich in der Dichte und der Anordnung ihrer Bindegewebsfasern unterscheiden (Abb.1). Kollagenfasern, die etwa 70% der Dermis ausmachen und für Straffheit und Halt sorgen, liegen neben Elastinfasern, die für die Elastizität zuständig sind, vor.

Der dominierende Zelltyp in der Dermis sind Fibroblasten die Kollagen, Elastin und andere Bindegewebsbestandteile bilden. Neben den Fibroblasten befinden sich in der Dermis auch Immunzellen wie Makrophagen und Mastzellen, Blutkapillaren und Nervenendigungen<sup>1, 6</sup>.

Die an die Dermis anschließende Subkutis enthält locker gebautes Bindegewebe,

welches in der Regel von vielen Fettzellen durchsetzt ist. Dieses Fettgewebe dient vor allem als Kälteschutz und Energiespeicher und hat eine modellierende Funktion. An die Subkutis grenzt eine Schicht aus Sehnen und Muskeln.

### **1.3 Aufbau der murinen Haut**

In Aufbau und Struktur unterscheidet sich eine Maushaut von einer menschlichen Haut nur geringfügig. Die Epidermis der Maushaut ist zwar dünner als ihr menschliches Homolog, die Differenzierung der Keratinozyten folgt jedoch demselben Prinzip.

Die Epidermis der neugeborenen Maus ist in vier histologisch deutlich unterscheidbare Zellschichten unterteilt. Zu diesem Zeitpunkt hat die Maushaut die meisten Gemeinsamkeiten mit der humanen Haut. In den Wachstumsperioden nach der ersten postnatalen Woche nimmt die Dicke der murinen Epidermis deutlich ab<sup>7</sup>. Allgemein gilt bei der murinen Haut, dass die Epidermis in dicht behaarten Bereichen sehr dünn, in wenig oder dünn behaarten Regionen deutlich dicker ausgebildet ist. In der humanen Bauchhaut werden 5-12 Zellschichten registriert, während die murine Rückenhaut nur 3-4 Zellschichten aufweist.

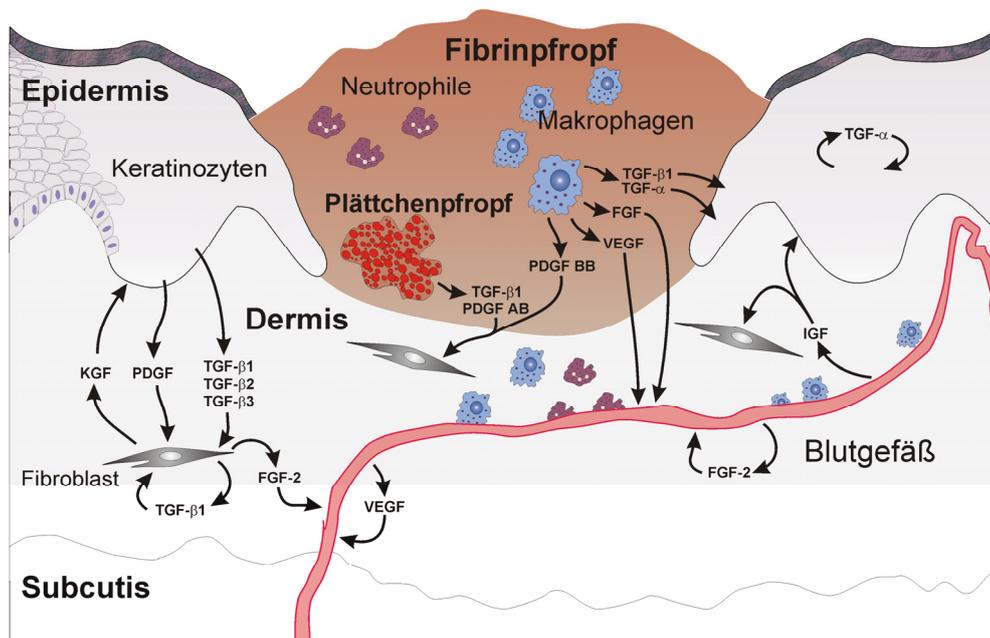
Bei der humanen Haut ist der Übergang von der Epidermis zur Dermis durch leisten- oder kegelförmige basale Epidermisvorsprünge mit dazwischenragenden Dermisfortsätzen gekennzeichnet. Diese Papillenbildung fördert die Versorgung einer dicken Epidermis durch Diffusion von Stoffen aus dem Blutkreislauf. Je dünner die Epidermis ist, desto einfacher und flacher fallen die Papillen aus. In der dünnhäutigen Epidermis der murinen Haut fehlen die Papillen völlig.

Vergleichende Untersuchungen an muriner und humaner Haut haben gezeigt, dass sich die in muriner Haut gewonnenen Erkenntnisse größtenteils auf die humane Haut übertragen lassen.

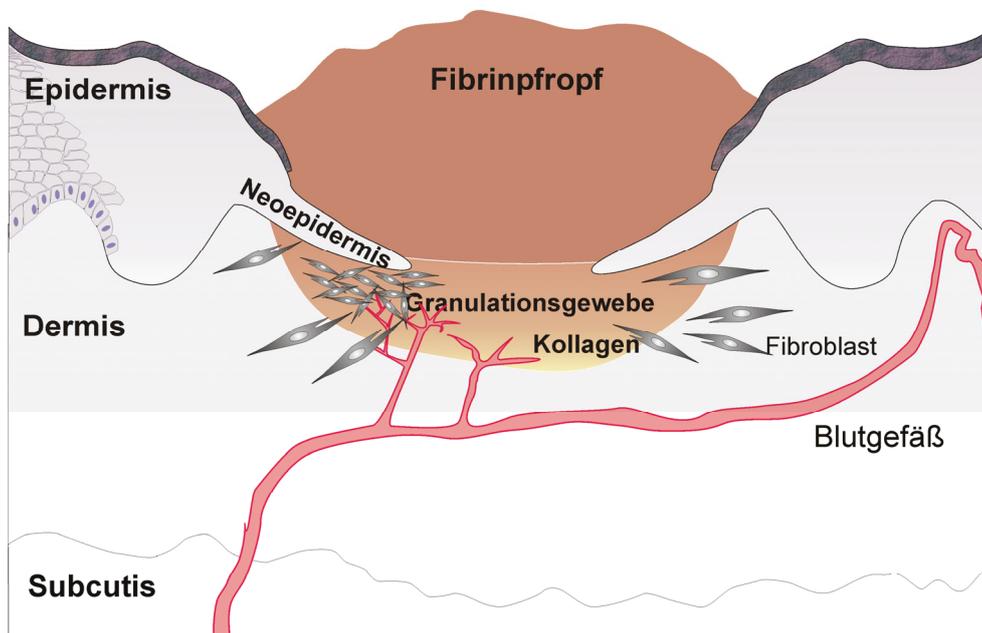
### 1.4 Biologie der Wundheilung

Die wichtigste Aufgabe der Haut ist es, den Körper gegen die ihn umgebende Umwelt zu schützen. Da der Verlust, auch nur von Teilen, der Haut, zu Krankheit oder Tod führen kann, versucht der Organismus, Wunden möglichst schnell und vollständig zu beseitigen und die Funktion des Gewebes wiederherzustellen. Dabei kann zwischen der Regeneration und der Reparatur des betroffenen Gewebes unterschieden werden. Sind nur die obersten Hautschichten (Epidermis) betroffen, kann eine vollständige Regeneration eintreten, die das geschädigte Gewebe völlig gleichwertig wiederherstellt. Ist jedoch auch das Stratum basale, als proliferative Schicht, von der Verletzung betroffen, so ist eine Regeneration nicht mehr möglich. In diesem Fall, spricht man von einer Reparatur, denn das verlorene Gewebe wird vom Körper nicht exakt nachgebildet, sondern der Defekt wird mit unspezifischem Gewebe ersetzt. Das dabei entstehende Narbengewebe weicht deutlich von der vorherigen gesunden Struktur des Gewebes ab<sup>8</sup>.

Die kutane Wundheilung ist ein komplexer biologischer Reparaturvorgang, bei dem eine Vielzahl von Zelltypen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix zusammenwirken<sup>8,9</sup> (Abb. 2A; 2B).



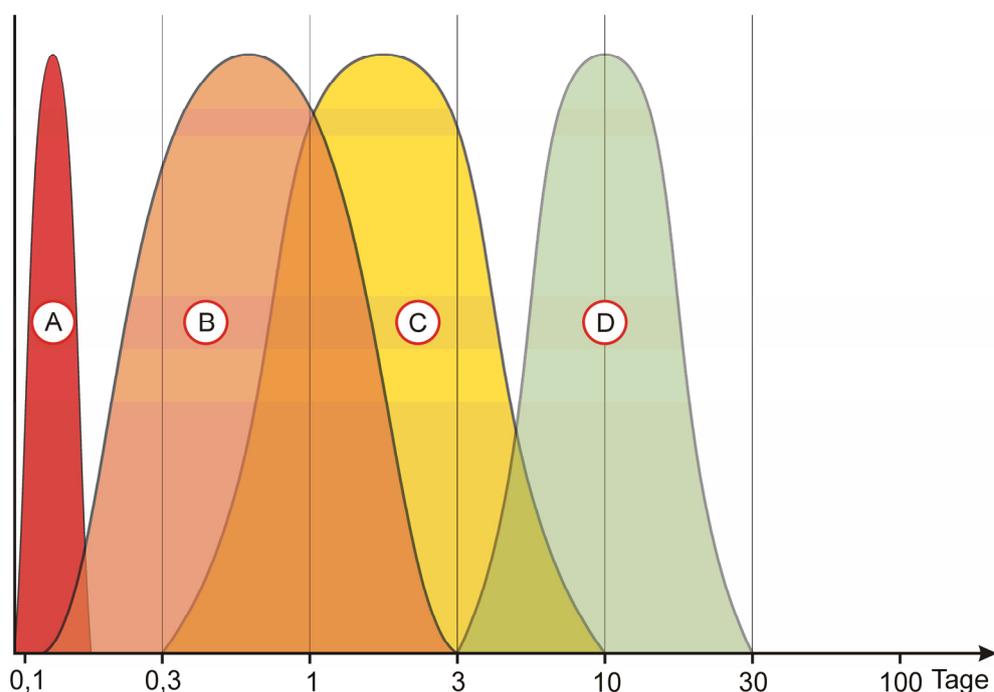
**Abb. 2A:** Schematische Darstellung des Wundheilungsprozesses der Haut. Frühe Phase der Wundheilung: Bildung eines Fibrinpfropfes infolge eines Traumas. Von Thrombozyten produzierte Wachstumsfaktoren und Zytokine locken inflammatorische Zellen (Makrophagen, Neutrophile) in die Wunde. Diese wiederum produzieren zusätzliche Wachstumsfaktoren, die für den weiteren Verlauf der Wundheilung essentiell sind. Keratinozyten am Wundrand beginnen in das Wundbett einzuwandern.



**Abb. 2B:** Spätere Phase der Wundheilung: Durch Wachstumsfaktoren und Zytokine, die zu Beginn der Wundheilung vor allem von Makrophagen produziert wurden, sind Fibroblasten und neue Blutgefäße in die Wunde migriert und bilden nun das Granulationsgewebe. Keratinozyten wandern als Neoepidermis so lange zwischen Fibrinpfropf und Granulationsgewebe ein, bis die offene Wundfläche mit einer Schicht Keratinozyten bedeckt ist (modifiziert nach Singer and Clark, 1999).

Die meisten Erkenntnisse diesbezüglich wurden durch Wundheilungsexperimente an der Maus gewonnen. Da diese Erkenntnisse weitgehend mit Analysen von histologischen Schnitten humaner Wunden korrelieren, sind die folgenden Beschreibungen nicht nur auf den murinen, sondern auch auf den humanen Wundheilungsprozess anwendbar.

Unabhängig von der Art der Verletzung und vom Ausmaß des Gewebeerlustes verläuft der Wundheilungsprozess nach der Haemostase (Abb. 3A) in drei dynamischen Phasen. Diese Phasen überlappen zeitlich und lassen sich nicht streng voneinander abgrenzen. Entsprechend den morphologischen Veränderungen, die im Laufe des Heilungsprozesses auftreten, werden die Phasen Entzündungsreaktion (Abb. 3B), Proliferation (Abb. 3C) und Remodellierung (Abb. 3D) unterschieden<sup>8,9</sup>.



**Abb. 3:** Die Phasen der Wundheilung. **(A)** Haemostase (Bildung des Fibrinpropfes); **(B)** Entzündungsreaktion; **(C)** Proliferation; **(D)**: Remodellierung

### 1.4.1 Entzündungsreaktion

Direkt nach dem Trauma setzt neben der Haemostase und der Bildung des Fibrinpfropfes eine akute Entzündungsreaktion ein (Abb. 3 A, B). Die Bildung des Fibrinpfropfes dient in erster Linie dazu, die Blutung, die durch die Verletzung von Blutgefäßen auftritt, zu stoppen und die offene Wundfläche vor Verunreinigungen aus der Umwelt zu schützen<sup>9</sup>. Der Fibrinpfropf besteht hauptsächlich aus Thrombozyten (Blutplättchen), die in ein Netz aus Fibrinfasern eingebettet sind. Die Fibrinfasern sind dabei aus Spaltung von Fibrinogen durch Thrombin entstanden, das von den aktivierten Thrombozyten sezerniert wurde. Der Fibrinpfropf bildet eine provisorische Matrix für die Migration von Zellen während der Wundheilung<sup>8, 9</sup>. Die Freigabe der Wachstumsfaktoren durch die Thrombozyten stellt den auslösenden Impuls für die folgenden Vorgänge der Wundheilung dar<sup>8, 9</sup>.

Polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten (Neutrophile) und Monozyten/Makrophagen werden nicht nur durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, die von Thrombozyten ausgeschüttet werden, in den Wundbereich gelockt, sondern auch durch Proteolyseprodukte des Fibrins und anderer Matrixkomponenten. Neutrophile machen einen Tag nach dem Trauma etwa 50% aller im Wundbereich vorhandener Zellen aus<sup>10</sup>. Sie beseitigen die Wunde verunreinigende Bakterien und sind eine Quelle für primäre pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) und Interleukine wie IL-1 $\beta$ , die als sehr frühes Signal für die Aktivierung von Keratinozyten und Fibroblasten dienen. Unter physiologischen Wundheilungsbedingungen wird die Einwanderung der Neutrophilen von Monozyten/Makrophagen begleitet. Nachdem sich wenige Tage nach dem Trauma

die Zahl der Neutrophilen im Wundbereich verringert hat, stellen Monozyten/Makrophagen die größte Gruppe unter den Leukozyten<sup>10</sup>. Wegen ihrer Fähigkeit, primäre inflammatorische Zytokine und eine Reihe von Wachstumsfaktoren zu sezernieren gelten Makrophagen als ein zentrales Element während des Wundheilungsprozesses<sup>11, 10</sup>. So zeigen Studien an Tieren mit verminderter Makrophagenzahl, bei diesen eine mangelhafte Wundheilung<sup>12</sup>. Lymphozyten werden in fast der gleichen Menge wie Makrophagen in den Wundbereich angezogen und bilden nach 14 Tagen die dominierende Leukozyten-Zellpopulation. Da Lymphozyten nicht nur Effektorzellen des Antigen präsentierenden Teils des Immunsystems sind, sondern auch eine ganze Reihe an Wachstumsfaktoren sezernieren können<sup>13</sup>, könnten sie einen wichtigen Beitrag zur späteren Remodellierung beitragen.

### 1.4.2 Proliferation - Bildung des Granulationsgewebes

Die Reepithelisierung von Wunden beginnt innerhalb weniger Stunden nach der Verletzung. In der Zellproliferation, mit dem Ziel neues Gewebe –Granulationsgewebe – aufzubauen, liegt der Schwerpunkt dieser Phase der Wundheilung (Abb. 3C). Das Granulationsgewebe beginnt etwa drei Tage nach dem Trauma, vom Wundrand in den Wundraum einzuwandern. Gleichzeitig mit Makrophagen und Fibroblasten wandern einsprossende Blutgefäße in den Wundraum ein<sup>14</sup>. Vor allem die Wachstumsfaktoren PDGF und TGF- $\beta$ 1 stimulieren Fibroblasten am Wundrand zur Teilung und zur Einwanderung in die Wunde<sup>8, 9</sup>. Die Aufgabe der in den Wundbereich eingewanderten Fibroblasten besteht hauptsächlich darin, Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Kollagen Typ I für den Aufbau des Granulationsgewebes zu produzieren. Zusammen mit neu in die Wunde einsprossenden Blutgefäßen und den Makrophagen bilden die Fibroblasten das Granulationsgewebe<sup>8, 9</sup>. Das Einsprossen neuer Blutgefäße in die Wunde wird vor allem durch die Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF induziert, die von Makrophagen und von den Endothelzellen der Blutgefäße selbst ausgeschüttet werden<sup>11</sup>. Die einsprossenden Blutgefäße gewährleisten eine Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen.

Um die offene Wundfläche mit einem neuen Epithel zu bedecken, beginnen die Keratinozyten, die sich am Wundrand befinden, in die Wunde einzuwandern. Eine Neopidermis entsteht an der Grenzfläche zwischen dem Granulationsgewebe und dem Fibrinpfropf. Sobald die Wundoberfläche mit einer neuen Schicht an Keratinozyten bedeckt ist, beenden diese die Migration und bauen ein neues

mehrschichtiges Epithel auf. Wichtige bekannte Regulatoren in diesem Prozess sind die Wachstumsfaktoren EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF und KGF<sup>8, 9</sup>. Proliferativ aktive Keratinozyten vom Wundrand liefern den Nachschub für die Zellen, die in die Wunde einwandern<sup>8, 9</sup>. Über das „Stoppsignal“, das die Keratinozyten dazu veranlasst, die Migration zu beenden und ein neues mehrschichtiges Epithel aufzubauen, ist bisher noch nichts bekannt.

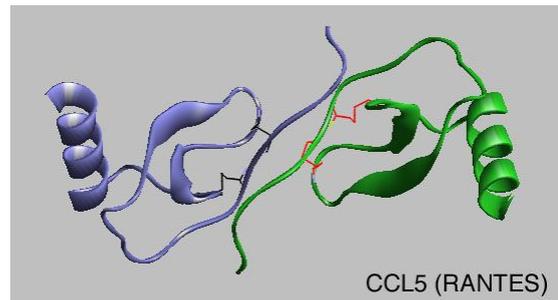
### 1.4.3 Remodellierung

Nach dem Wundverschluss transformieren einige Fibroblasten zu Myofibroblasten, die durch die Expression von  $\alpha$ -Aktin ( $\alpha$ -smooth muscle actin) charakterisiert werden<sup>15</sup>.  $\alpha$ -Aktin verleiht den Myofibroblasten die Fähigkeit, sich und damit die Wunde zu kontrahieren<sup>15</sup>. Im weiteren Verlauf der Wundheilung verringert sich die Zahl der Fibroblasten durch Apoptose und eine Vielzahl von Blutgefäßen bildet sich zurück. Das so entstandene Narbengewebe ist dadurch gekennzeichnet, dass Kollagen in dichten parallelen Bündeln angeordnet ist. Die Umstrukturierung des Kollagens während des Übergangs vom Granulationsgewebe zum Narbengewebe hängt sowohl von einer kontinuierlichen Kollagensynthese als auch vom Kollagenabbau ab. Der Abbau der Kollagenfasern wird größtenteils von MMPs durchgeführt, die von Makrophagen, epidermalen Zellen, Fibroblasten und Endothelzellen produziert werden.

## 1.5 Chemokine

Die Bezeichnung Chemokine (ein Neologismus aus *Chemotaxis* und *Zytokin*) umfasst eine komplexe Gruppe von 46 strukturell verwandten Molekülen<sup>16</sup>. Sie konnten als erste Protein-Superfamilie auf molekularer Ebene vollständig identifiziert und charakterisiert werden und wurden erstmals wegen ihrer Fähigkeit, Leukozytenmigration hervorzurufen, beschrieben<sup>17, 18</sup>. Ihre biologische Rolle geht jedoch über die Funktion eines reinen chemischen Lockstoffs weit hinaus. Es konnte gezeigt werden, dass sie in viele andere biologische Prozesse wie Wachstumsregulation<sup>19</sup>, T-Zell-Aktivierung<sup>20</sup>, Angiogenese<sup>21</sup> Entzündungsprozesse<sup>22</sup> und während der Metastasierung<sup>23</sup> involviert sind.

Chemokine sind kleine, lösliche Proteine mit vier konservierten Cysteinen<sup>17, 18</sup> (Abb. 4). Sie bestehen aus etwa 70 bis 130 Aminosäuren inklusive 4 konservierter Cysteine und erreichen damit ein Molekulargewicht von 7 bis 15 kDa<sup>17, 18</sup>.

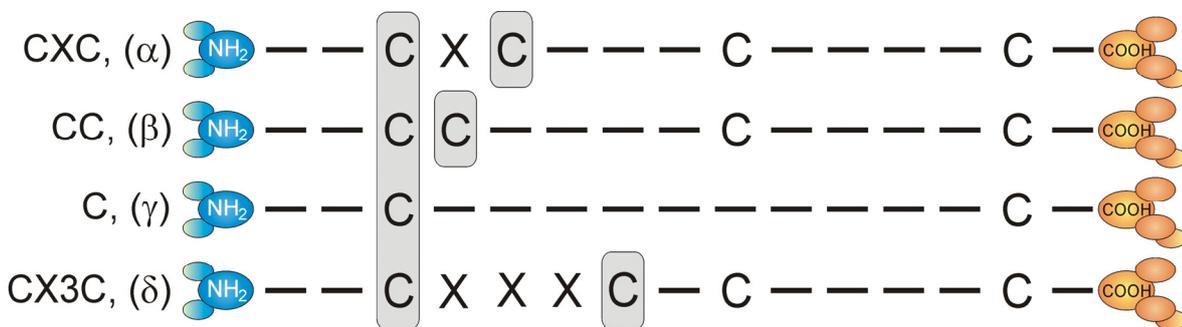


**Abb. 4:** Proteinmodell des Chemokines CCL5

Die Superfamilie der Chemokine umfasst vier Unterfamilien. Die Unterfamilien der CXC- und CC- Chemokine (auch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Chemokine genannt) stellen zusammen über 90% der Chemokine. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Position der ersten zwei Cysteine, die entweder durch eine Nicht-Cystein-Aminosäure getrennt (CXC) werden oder die benachbart angeordnet sind (CC) (Abb. 5)<sup>17, 18</sup>. Die Cysteine bilden Disulfidbrücken, die das Chemokin in ihrer charakteristischen dreidimensionalen Konformation halten. Die spezielle Raumstruktur ist für eine Bindung an den

Rezeptor und dessen Aktivierung nötig<sup>24, 25</sup>.

Neben diesen beiden Unterfamilien existieren zwei weitere Chemokin-Unterfamilien, die nicht in das oben beschriebene Muster passen: die XCL-Chemokine ( $\gamma$ -Chemokin) mit zwei statt vier konservierten Cysteinen<sup>26, 27</sup> und CX3CL1, membrangebunden, mit einer N-terminalen chemokin-ähnlichen Domäne mit drei Aminosäuren zwischen den ersten zwei Cysteinen ( $\delta$ -Chemokin) (Abb. 5)<sup>28, 29</sup>.



**Abb. 5:** Struktur der Chemokin-Superfamilie. Unterscheidung der vier Chemokin-Unterfamilien (CC-, CXC-, C- und CX3C-Familie) durch die Abfolge der ersten beiden konservierten Cystein-Aminosäuren

Während einer Phase stürmischer Entdeckungen neuer Chemokine in den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts kam es verschiedentlich vor, dass innerhalb weniger Monate unterschiedliche Forschungsgruppen die Entdeckung identischer „neuer“ Chemokine unter verschiedenen Namen veröffentlichten. So entstand binnen kürzester Zeit eine unübersichtliche Anzahl an Bezeichnungen für ein und dasselbe Molekül. Um eine einheitliche Grundlage für eine wissenschaftliche Diskussion zu schaffen, wurde 1999 auf der Keystone Conference eine einheitliche Nomenklatur vereinbart<sup>30, 31</sup>. 2001 erlangte die systematische Nomenklatur für Chemokine durch die IUIS/WHO Gültigkeit<sup>32</sup>. Analog zu der Systematik der Chemokinrezeptoren wurden hier alle Chemokinliganden mit ihren systematischen Namen als CCL1 bis

CCL28, CXCL1 bis CXCL17, CX3CL1, XCL1 und XCL2 bezeichnet (Tabelle 1). Zurzeit sind 28 humane CC- und 17 humane CXC-Chemokine bekannt. Darüber hinaus sind zwei Vertreter der Familie der XC- und ein Vertreter der CX3C-Chemokine mit ihren Rezeptoren XCR1 und CX3CR1 identifiziert<sup>32, 16</sup> (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Systematische Nomenklatur für Chemokine (nach IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature, 2001 und Zlotnik et al., 2006)<sup>32, 16</sup>.

**CXC Chemokin/Rezeptor Familie**

Systematischer Name	Synonym(e)	Funktion	Ligand (murin)	Synonym(e) (murin)	Chemokin-Rezeptor(en)
CXCL1	Gro $\alpha$	I	Cxcl1	GRO/ KC	CXCR2>CXCR1
CXCL2	Gro $\beta$	I	Cxcl2	MIP-2	CXCR2
CXCL3	Gro $\gamma$	I	GM1690	Dcip-1	CXCR2
CXCL4	PF4	U	Cxcl4	PF4	CXCR3B*
CXCL4VI		U			
CXCL5	ENA-78	I	Cxcl5	LIX	CXCR2
CXCL6	GCP-2	I			CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	I	Cxcl7	Ppbb	unbekannt
CXCL8	IL-8	I			CXCR1, CXCR2
CXCL9	MIG	I	Cxcl9	MIG	CXCR3, CXCR3B
CXCL10	IP-10	I	Cxcl10	IP-10	CXCR3, CXCR3B
CXCL11	I-TAC	I	Cxcl11	I-TAC	CXCR3, CXCR3B
CXCL12	SDF-1 $\alpha/\beta$	H	Cxcl12	SDF-1 $\alpha/\beta$	CXCR4, CXCR7
CXCL13	BLC, BCA-1	H	Cxcl13	BLC, BCA-1	unbekannt
CXCL14	BRAK, Bolekine	I	Cxcl14	BRAK	unbekannt
unbekannt			Cxcl15	Lungkine/WECHÉ	unbekannt
CXCL 16		I	Cxcl16	Cxcl16	CXCR6
CXCL17	DMC	U	Cxcl17	DMC	unbekannt

### CC Chemokin/Rezeptor Familie

Systematischer Name	Synonym(e)	Funktion	Ligand (murin)	Synonym(e) (murin)	Chemokin-Rezeptor(en)
CCL1	I-309	I	Ccl1	TCA-3	CCR8
CCL2	MCP-1	I	Ccl2	JE	CCR2
CCL3	Mip-1 $\alpha$ , LD78 $\alpha$	I	Ccl3	MIP-1 $\alpha$	CCR1, CCR5
CCL3L1	LD78 $\beta$	I			
CCL3L3	LD78 $\beta$	I			
CCL4	MIP-1 $\beta$	I	Ccl4	MIP-1 $\beta$	CCR5
CCL4L1	AT744.2	I			
CCL4L2		I			
CCL5	RANTES	I	Ccl5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL7	MCP-3	I	Ccl7	MARC	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	I	Ccl8, Ccl12	MCP-2, MCP-5	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
CCL11	Eotaxin	I	Ccl11	Eotaxin	CCR3
CCL13	MCP-4	I	unbekannt		CCR1, CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1	H	unbekannt		CCR1
CCL15	HCC-2	H	Ccl9	MMRP-2, MIP-1 $\gamma$	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4	H	Pseudogene		CCR1, CCR2, CCR5
CCL17	TARC	D	Ccl17	TARC	CCR4
CCL18	DC-CK1, PARC	H	Pseudogene		unbekannt
CCL19	MIP-3 $\beta$ , ELC	H	Ccl19	MIP-3 $\beta$	CCR7
CCL20	MIP-3 $\alpha$ , LARC	D	Ccl20	MIP-3 $\alpha$ , LARC	CCR6
CCL21	SLC, 6Ckine	D	Ccl21a, Ccl21b, Ccl21c	SLC	CCR7
CCL22	MDC, STCP-1	D	Ccl22	ABCD-1	CCR4
CCL23	MPIF-1	I	Ccl6	C10	CCR1
CCL24	Eotaxin-2	I	Ccl24	Eotaxin-2	CCR3
CCL25	TECK	H	Ccl25	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxin-3	I	Ccl26l	Eotaxin-3 like	CCR3
CCL27	CTACK/ILC	H	Ccl27a, b	CTACK, ILC	CCR10
CCL28	MEC	U	Ccl28	MEC	CCR10S

**C Chemokin/Rezeptor Familie**

Systematischer Name	Synonym(e)	Funktion	Ligand (murin)	Synonym(e) (murin)	Chemokin-Rezeptor(en)
XCL1	Lymphotactin, SCM-1 $\alpha$	D	Xcl1	Lymphotactin	XCR1
XCL2	SCM-1 $\beta$	D	Ccl6		

**CX3C Chemokin/Rezeptor Familie**

Systematischer Name	Synonym(e)	Funktion	Ligand (murin)	Synonym(e) (murin)	Chemokin-Rezeptor(en)
CX3CL1	Fractalkine	I	Cx3cl1	Fractalkine	CX3CR1

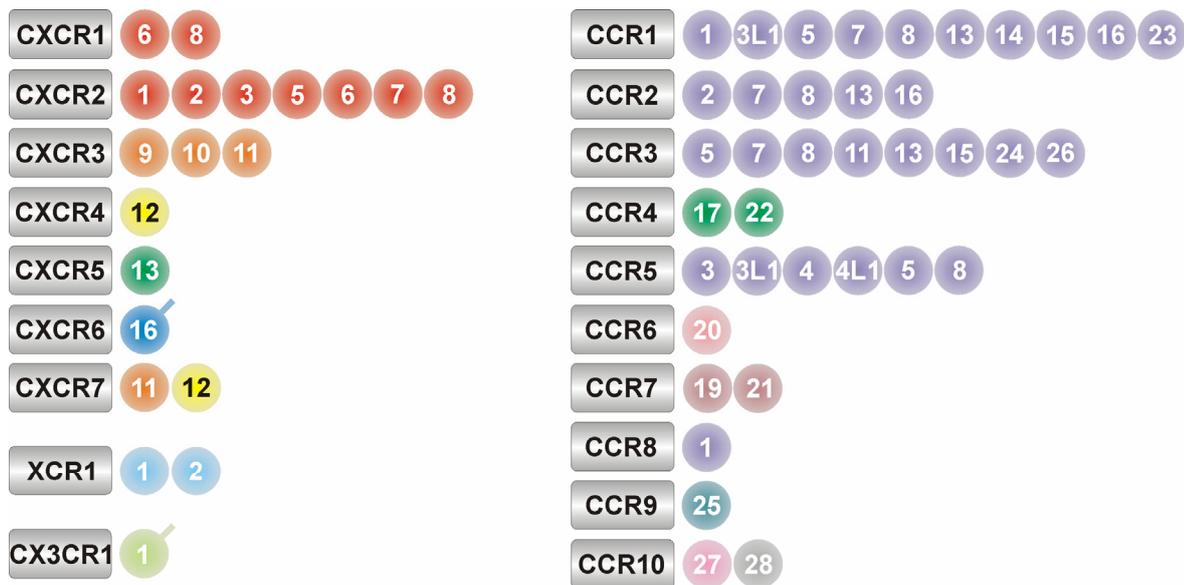
Funktion: I, inflammatorisch; H, homeostatisch, D, dual (homeostatisch und inflammatorisch); U, unbekannt. \*, Es konnte gezeigt werden, dass eine alternative Splicevariante von CXCR3 den Liganden CXCL4, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 die Möglichkeit gibt, Angiogenese zu kontrollieren.

### 1.5.1 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokinrezeptoren werden auf einer Vielzahl verschiedener Zelltypen exprimiert. Die ersten Chemokinrezeptoren, zwei heptahelikale Proteine mit hoher Affinität für CXCL8 oder Interleukin (IL)-8, wurden 1991 zeitgleich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben und kloniert<sup>33, 34</sup>. Bis heute sind insgesamt 19 humane Chemokinrezeptoren beschrieben: zehn Rezeptoren für humane CC-Chemokine, sieben für humane CXC-Chemokine je ein Rezeptor für die C- und die CX3C-Chemokine<sup>32, 16</sup>.

Die Chemokinsuperfamilie zeigt innerhalb ihrer Unterfamilien eine gewisse funktionelle Redundanz durch Promiskuität. So verwenden einige Liganden denselben Rezeptor für die Vermittlung ihrer biologischen Funktionen<sup>32, 16</sup> (Tabelle 1). Sortiert man Chemokinliganden nach ihrer chromosomalen Lage und ihrem

Rezeptorbindungsverhalten, so fällt auf, dass sogenannte „Cluster“-Chemokine existieren, die auf demselben Chromosom lokalisiert sind und identische Rezeptoren binden<sup>32, 16</sup> (Tabelle 1; Abb. 6). Eine kleinere Anzahl von Chemokinen, die sogenannten „Micro-Cluster“-Chemokine, binden häufig einen spezifischen Rezeptor und haben eine individuelle chromosomale Lokalisation<sup>31, 16</sup> (Tabelle 1; Abb. 6).



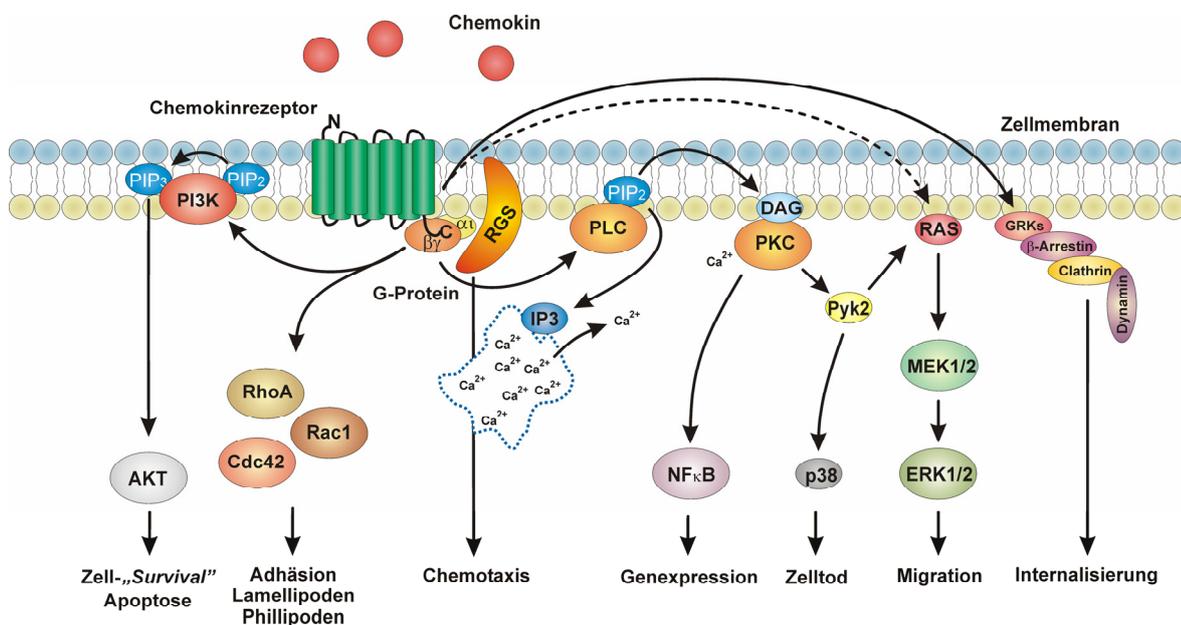
**Abb. 6:** „Cluster“- versus „Micro-Cluster“-Chemokine. Das vereinfachte Schema stellt die Rezeptor-Liganden-Interaktionen sowie die chromosomale Lokalisation von Chemokinen dar. Es können Liganden, die die identische chromosomale Lage aufweisen („Cluster“) und Liganden in spezifischer chromosomaler Lokalisation („Micro-Cluster“) unterschieden werden. Chemokine werden durch ihre Ligandennummer dargestellt und der Rezeptorname gibt an, ob es sich um einen CC, CXC, C oder CX3C-Liganden handelt. Die Farben repräsentieren die chromosomale Lokalisation der Liganden; die Gene, die gleichfarbige Liganden codieren, haben die gleiche chromosomale Lokalisation und neigen an den gleichen Rezeptor zur Binden. Die Linien bei CXCL16 und CX3CL1 deuten den transmembranären Charakter dieser Proteine an.

Chemokine übermitteln ihre biologischen Effekte durch Interaktion mit speziellen siebentransmembranären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR= *G-protein-coupled receptors*) in der Membran der Zielzelle<sup>35, 36</sup>. Die meisten Rezeptoren erkennen mehr als ein Chemokin und einige Chemokine binden an verschiedene

Rezeptoren<sup>31, 16</sup>. Eine basische Matrix-Domäne, die sich am C-Terminus der Chemokine befindet, ermöglicht ihnen die Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix. Für CXC- und CC-Chemokine werden zwei funktionelle Domänen beschrieben, die in Chemokin/Chemokinrezeptor-Interaktionen involviert sind. Eine sogenannte *loop*-Region im Chemokinmolekül, auch *docking domain* genannt, nahe am zweiten konservierten Cystein, ist für die Bindung des Chemokins an den Rezeptor verantwortlich. Diese Interaktionen schränken die Mobilität des Chemokins etwas ein und erleichtern wahrscheinlich die richtige Orientierung der N-terminalen Signalisierungs-Domäne, der *triggering*-Domäne. Alle Chemokine aktivieren  $G\alpha_i$ -gekoppelte Rezeptoren, die *B. pertussis* Toxin sensitiv sind<sup>37</sup>. Innerhalb von Geweben binden Chemokine an Glykoaminoglykane auf der Oberfläche von Zellen und in der extrazellulären Matrix über ionische Wechselwirkungen<sup>38, 39</sup>. Gebundene Chemokine behalten ihre volle chemo-taktische Aktivität bei, sind aber auf den Bereich beschränkt, an dem sie produziert und sezerniert wurden<sup>40, 41</sup>. Daher können Chemokine eine lang anhaltende, lokal fokussierte Wirkung entfalten.

Über den G-Protein-Komplex interagieren Chemokinrezeptoren mit unterschiedlichen Signalwegen. Verschiedene RGS-Proteine (Regulators of G-Protein signalling) regulieren Chemotaxis von Lymphozyten durch die Rezeptoren CXCR2, CXCR4, CXCR5 oder CCR3<sup>42, 43, 44</sup>. Eine chemotaktische Antwort benötigt ein sehr komplexes Zusammenspiel einer ganzen Reihe motiler Faktoren, wie z.B. Änderung der Zellform, Aktin-Polymerisation/Depolymerisation und Zelladhäsion<sup>45, 46</sup>. Die Stimulation durch Chemokine führt zu einer Aktivierung der GTP-bindenden Proteine Rho, Rac und Cdc42, die an der Regulation der lokalen Adhäsion und der

Ausbildung von Lamellipodien und/oder Filopodien beteiligt sind<sup>47, 48, 49, 50</sup>. Das genaue Zusammenspiel zwischen diesen Proteinen und den Chemokinrezeptoren ist bis heute noch unklar. Die PI3K-Aktivität wird durch Chemoattraktantien stark stimuliert. Ihre Rolle für die Chemotaxis ist jedoch stark vom jeweiligen Zelltyp abhängig<sup>51, 50</sup>. Wird die PI3K durch Stimulation des GPCR aktiviert, aktiviert dieses die nachgelagerten Effektoren PKB, PKC oder AKT und den Ras-Signalweg<sup>52, 53, 54</sup>. Außerdem spielt die aktivierte PI3K eine zentrale Rolle für die Haftfähigkeit von Integrinen, bei der Zellmigration und bei der Zellpolarisation<sup>51, 50</sup>.



**Abbildung 7: Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren.** Chemokinrezeptoren besitzen sieben Transmembran-Domänen und sind G-Protein gekoppelt. Sie vermitteln verschiedene biologische Funktionen, darunter Genexpression, Chemotaxis, Adhäsion, Apoptose, Integrinaktivierung und Rezeptorinternalisierung.

Nach weiteren Chemokinrezeptoren wird zurzeit intensiv geforscht, wobei verwaiste („orphan“) GPRCs im Mittelpunkt der Forschung stehen. Da die den Chemokinen und ihren Rezeptoren zu Grunde liegende genetische Information hoch konserviert ist,

hat der Vergleich von Strukturhomologien innerhalb der Chemokinsuperfamilie in Kombination mit der Verfügbarkeit von neuen bioinformatischen Methoden sowie der Zugriff auf umfassende „Expressed Sequence Tags“ (EST)-Datenbanken dazu geführt, dass diese humane Proteinsuperfamilie als eine der ersten in ihrer Gesamtheit kloniert und kartiert werden konnte<sup>31</sup>.

Damit sind erstmalig die umfassende Identifizierung der bei der Wundheilung involvierten Chemokine und eine Beobachtung ihres Zusammenspiels während des Wundheilungsprozesses möglich.

## 1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob und in welchem Masse Chemokine und ihre Rezeptoren Mediatoren der kutanen Wundheilung sind.

Die am Prozess der kutanen Wundheilung hauptsächlich beteiligten Zelltypen reichen von hämatopoitischen Zellen wie Blutplättchen, Effektorzellen des Immunsystems wie Neutrophile, T-Zellen und Makrophagen bis hin zu strukturellen Zellen wie Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen. Der gesamte Prozess der Wundheilung wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen reguliert. Er beruht auf der Produktion von extrazellulärer Matrix, mitogener Aktivität und der Migration von Leukozyten und strukturellen Zellen.

Chemokine sind bekannt dafür, dass sie Leukozyten zusammen mit Adhäsionsmolekülen eine "feste Adhäsion" an Endothelzellen vermitteln, sie transendothelial sowie durch extrazelluläre Matrix wandern lassen und die spezifische Lokalisierung distinkter Leukozytensubpopulationen in peripheren Geweben bestimmen<sup>30, 55, 56, 31, 23, 22</sup>.

Im Gegensatz dazu, ist nur sehr wenig über eine Rolle von Chemokinen und ihrer Rezeptoren bei Migrationsvorgängen struktureller Zellen bekannt. Bis heute gibt es nur einige wenige Studien, die dabei eine mögliche Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren erwägen. Diese Studien sind aber auf einzelne Moleküle oder einzelne Ligand-Rezeptor Kombinationen beschränkt.

In dieser Arbeit soll zum ersten Mal ein umfassender Blick auf die Rolle der

Chemokine und ihrer Rezeptoren während der kutanen Wundheilung zu ermöglicht werden.

Dabei stellen sich die folgenden Fragenkomplexe:

- Werden während der kutanen Wundheilung Chemokine exprimiert, wie werden sie reguliert, wo ist ihr zellulärer Ursprung?
- Exprimieren strukturelle Zellen Chemokinrezeptoren und wenn ja, welche?
- Gibt es Kommunikationswege zwischen Chemokinen und strukturellen Zellen während des Verlaufes der kutanen Wundheilung?
- Sind die Chemokinerezeptoren auf strukturellen Zellen funktionell aktiv?
- Lässt sich der Verlauf der kutanen Wundheilung durch Chemokine beeinflussen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Aceton	Merk, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merk, Darmstadt, Deutschland
CrytalMount	Biomed, Foster City, CA, USA
DEPC-Wasser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNase I	Roche, Mannheim, Deutschland
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FACS-Puffer	PBS supplementiert mit 1% BSA oder FCS und 0,01% Natriumazid
Formalin-Lsg. (4%)	Fischer, Saarbrücken, Deutschland
genspezifische TaqMan <sup>®</sup> Sonde	MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany
genspezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer	MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany
Glykogen	Roche, Basel, Schweiz
Haematoxylin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Merk, Darmstadt, Deutschland
Lithium-Carbonat-Lsg. (gesättigt)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MACS-Puffer	PBS supplementiert mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA
Mounting Medium für AEC	Immunotech, Marseille, Frankreich
Oligo-dT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd-Lsg. (2%ig)	Merk, Darmstadt, Deutschland
PBS-Puffer (unsteril 1x):	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 0,15 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,2-7,4
PBS-Puffer (steril 1x)	Serag Wiessner, Neila, Deutschland
Primer, humane Chemokine	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Primer, murine Chemokine	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Random Hexamer	Promega, Mannheim, Deutschland
RNase-Inhibitor	RNasin, Roche, Mannheim, Deutschland

<b>RNAseZAP</b>	Ambion, Huntingdon, UK
<b>RT-Puffer</b>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Superskript II</b>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>TaqMan<sup>®</sup> 18SRNA spezifische Sonde</b>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<b>TaqMan<sup>®</sup> 18SRNA spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer</b>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<b>TaqMan<sup>®</sup> SYBR-green Master Mix</b>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<b>TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix</b>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<b>TRIZOL</b>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Trypsin</b>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>VECTOR AEC-Kit</b>	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
<b>VECTOR Blocking Kit, Avidin/Biotin</b>	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
<b>Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%ig)</b>	Merk, Darmstadt, Deutschland

## 2.1.2 Medien

<b>EGM-2MV</b>	Clonetics; Cambrex, Verviers, Belgien
<b>FGM-2</b>	Clonetics; Cambrex, Verviers, Belgien
<b>KGM-2</b>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<b>Serum, human</b>	Eigengewinnung aus Zentrifugationsüberstand

## 2.1.3 Proteine

<b>hr-CCL1</b>	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
<b>hr-CCL3</b>	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
<b>hr-CCL11</b>	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
<b>hr-CCL20</b>	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
<b>hr-CCL27</b>	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
<b>hr-CXCL8</b>	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
<b>hr-CXCL9</b>	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
<b>hr-CXCL10</b>	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
<b>hr-CXCL12</b>	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA

hr-IL-1 $\beta$	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
hr-TNF- $\alpha$	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA

### 2.1.4 Toxine und Inhibitoren

Chelertin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Colzemid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cyclohexemid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ly294002	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Pertussis-Toxin	aus <i>Bordellata pertussis</i> , Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
$\alpha$ -Amanitin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 2.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterial

FACScalibur	Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA
FACScan	Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA
FACS-Röhrchen	BD Falcon Labware Europe, Meylan Cedex. Frankreich
FACS-Zentrifuge	Hettich 1302 mit Rotor #1323, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Kamerasystem, digital	Olympus Camedia C-4040, Olympus, Hamburg, Deutschland
Kryomikrotom	FrigoCut 2700, Reichert & Jung, Deutschland
Kulturplatte (24-well)	BD Falcon Labware Europe, Meylan Cedex. Frankreich
Mikrodismembrator Model U	B.Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Mikroskop/Histologie	Leitz Orthoplan mit digitalem Kamerasystem (s.o.), Leitz, Deutschland
Objekträger, Superfrost plus	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Spektralphotometer	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
ABI Prism 7000	Quantitatives real-time PCR Gerät, ABIPrism7000, Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermocycler	Biometra TRIO-Thermoblock / Biometra Heated Lid, Biometra, Göttingen, Deutschland
Time lapse Video-Mikroskopie-System	Inverses Leitz-Mikroskop mit Zellkulturausstattung, Zeiss AxioCam HRC mit AxioVision 4.1 Software, Zeiss, Oberkochen, Deutschland oder Zeiss CellObserver <sup>®</sup>
Ultrazentrifuge	Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge / Sorvall SA-600 Rotor, Sorvall

## 2.1.6 Antikörper für die FACS-Analyse

Antikörper	Konjugat	Isotype	Klon	Hersteller
anti h-CCR1	PE	mslgG2b	53504.111	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR2	PE	mslgG2b	48607.211	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR3	PE	ratlgG2a	61828.111	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR4	PE	mslgG1	1G1.1	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR5	PE	mslgG2a	2D7/CCR5	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR6	PE	mslgG1	11A9	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR7	PE	mslgG2a	150503	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR8	--	goatlgG	polyclonal	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
anti h-CCR9	PE	mslgG2a	112509	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR10	--	mslgG1	1908	DNAX Research, Palo Alto, CA, USA
anti h-CXCR1	PE	mslgG2b	5A12	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CXCR2	PE	mslgG1	6C6	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CXCR3	PE	mslgG1	1C6/CXCR3	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CXCR4	PE	mslgG2b	12G5	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CXCR5	PE	mslgG2b	51505	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CXCR6	PE	mslgG2b	56811	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CX3CR1	PE	ratlgG	2A9-1	MBL, Woburn, MA, USA
Swine-antigoat	PE	IgG	polyclonal	Caltag Laboratories, Hamburg, Deutschland
<b>Kontrollen:</b>				
mslgG1	PE	--		Pharmingen, San Diego, CA
mslgG2a	PE	--		R&D Systems
ratlgG2a	PE	--		Pharmingen, San Diego, CA
mslgG2b	PE	--		Pharmingen, San Diego, CA
goatlgG	--	--	polyclonal	Jackson Immuno.

## 2.1.7 Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Isotype	Klon	Hersteller
anti h-CD3	rabbit IgG	polyclonal	DakoCytomation
anti h-CD68	mrlgG1	KP1	DakoCytomation
anti h-Ki67	mrlgG1	MIP 1	DakoCytomation
anti h-CCR1	mrlgG2b	53504.111	R&D Systems
anti h-CCR2a	goat IgG	polyclonal	Santa Cruz Biotech.
anti h-CCR2b	goat IgG	polyclonal	Santa Cruz Biotech.
anti h-CCR3	mrlgG2a	61828.111	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR4	rabbit IgG	polyclonal	Santa Cruz Biotech.
anti h-CCR5	mrlgG2b	45549.111	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR6	mrlgG2b	53103.111	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR7	mrlgG2a	150503	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR8	goatIgG	polyclonal	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
anti h-CCR9	mrlgG2a	112509	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCR10	mrlgG	1908	DNAX Research, Palo Alto, CA, USA
CXCR1	mrlgG2a	42705.111	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
CXCR2	mrlgG2a	48311.211	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
CXCR3	mrlgG1	49801.111	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
CXCR4	mrlgG2b	44716.111	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
CX3CR1	rabbit IgG	polyclonal	eBioscience
anti h-CCL11/I-309	goat IgG	polyclonal	Santa Cruz Biotech.
anti h-CCL2/MCP 1	goat IgG	polyclonal	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCL3/MIP 1 $\alpha$	goat IgG	polyclonal	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCL4/MIP 1 $\beta$	goat IgG	polyclonal	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCL5/RANTES	goat IgG	polyclonal	Santa Cruz Biotech.
anti h-CCL11/eotaxin	goat IgG	polyclonal	Santa Cruz Biotech.
anti h-CCL17/TARC	goat IgG	polyclonal	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCL18/PARC	goat IgG	polyclonal	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCL20/MIP 3 $\alpha$	goat IgG	polyclonal	Santa Cruz Biotech.
anti h-CCL21/6Ckine	goat IgG	polyclonal	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CCL22/MDC	goat IgG	polyclonal	Santa Cruz Biotech.
anti h-CCL24/eotaxin-2	goat IgG	G-17	Santa Cruz Biotech.

Antikörper	Isotype	Klon	Hersteller
anti h-CCL26/ <i>eotaxin-3</i>	goat IgG	polyclonal	Santa Cruz Biotech.
anti h-CXCL8//IL 8	msIgG1	B-K8	DIACLONE Res.
anti h-CXCL9// <i>MIG</i>	goat IgG	polyclonal	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CXCL10// <i>IP-10</i>	goat IgG	polyclonal	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CXCL11// <i>TAC</i>	goat IgG	polyclonal	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
anti h-CXCL12// <i>SDF-1<math>\alpha</math></i>	msIgG1	K15C	Eigenprodukt
anti h-CX3CL1// <i>Fractalkine</i>	goat IgG	polyclonal	R&D Systems
Kontrollen			
rat IgG2a		A95-1	BD PharMingen
rat IgG2b		polyclonal	BD PharMingen
mouse IgG1		11711.11	R&D Systems, Mineapolis, MN, USA
mouse IgG1		DAK-G01	DakoCytomation
mouse IgG2a		C1.18.4	BD PharMingen
mouse IgG2b		polyclonal	BD PharMingen
goat IgG		polyclonal	Jackson ImmunoRes.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kutanes Wundheilungsmodell

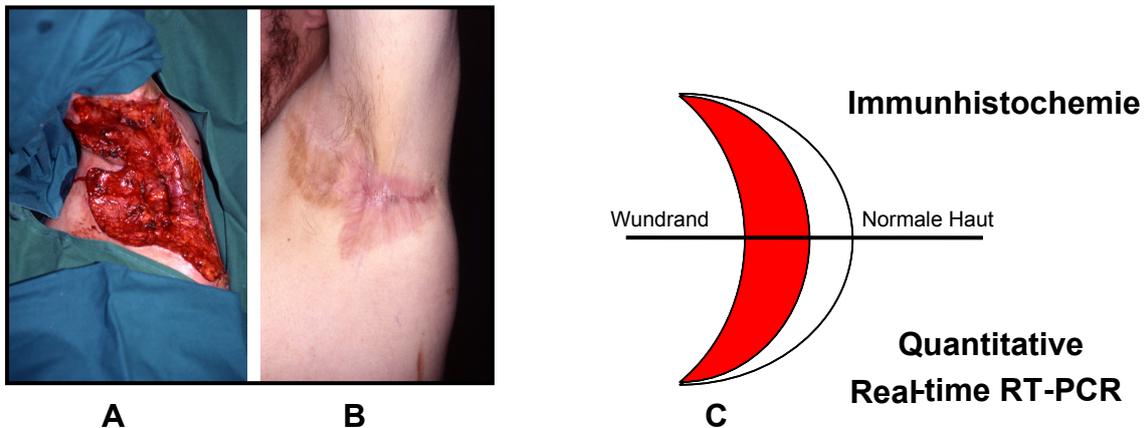
#### **Murines Wundheilungsmodell**

Weibliche BALB/c Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin<sup>®</sup> und Rompun<sup>®</sup> betäubt. Die Dorsalregion der Maus wurde rasiert und der Eingriffsbereich wurde mit Betadin<sup>®</sup> und Isopropanol desinfiziert. Mit einem Skalpell wurde ein 2 cm langer Schnitt durch die Epidermis und die Dermis gesetzt, ohne jedoch die subkutane Muskelschicht zu verwunden. Die Wunde wurde mit einer einzelnen chirurgischen Klammer (Typ 5W) geschlossen. Die Mäuse wurden 6, 12, 18 Stunden bzw. 1, 2, 3, 5, 7, 10 Tage nach dem Eingriff durch CO<sub>2</sub>-Inhalation schmerzfrei getötet. Bei der sofort anschließenden Probenentnahme wurde der die Eingriffsstelle umgebende Pelz entfernt und diese mit einer Ovalfläche umgebender, normalen Haut entnommen. Die Probe wurde sofort quer zum Schnitt geteilt. Eine Hälfte wurde für Paraffineinbettung in 10%iger Formalinlösung aufbewahrt, während die andere Hälfte für eine RNA-Extraktion schockgefroren wurde. Jede Versuchsgruppe bestand aus 3 Tieren und der Versuch wurde zweifach durchgeführt.

#### **Humanes Wundheilungsmodell**

Die Studie erfolgte mit Zustimmung der zuständigen Ethikkommissionen. Nach ausführlicher Information und mit dem schriftlichen Einverständnis der Probanden wurden bei gesunden Personen und Patienten, die an Acne inversa litten, Hautproben entnommen. Bei einem chirurgischen Eingriff zur Ausräumung eines Acne inversa Herdes und am 2., 5., 7 und 12. postoperativen Tag wurden Biopsien aus dem Bereich der Wundränder entnommen. Die Proben wurden sofort schockgefroren

und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abb. 8:** Typisches Operationsfeld (Abb. 8A) einer Acne inversa Operation und Narbe der Operation (Abb. 8B) und schematische Darstellung der Probenentnahme aus dem Operationsfeld und aus dem sekundär heilenden Wundbereich (Abb. 8C)

### 2.2.2 Kultur primärer Zellen

Humane primäre epidermale Keratinozyten, dermale Fibroblasten und dermale Endothelzellen wurden von Clonetics (San Diego, CA) bezogen und mit spezifischen Wachstumsmedien für Keratinozyten (KGM-2), Fibroblasten (FGM-2) und Endothelzellen (EGM-2 MV) nach Protokollen des Herstellers kultiviert. Die Zellen wurden entweder mit  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/ml) /  $\text{IL-1}\beta$  (5 ng/ml) behandelt oder blieben unbehandelt.

### 2.2.3 Analytische Durchflußzytometrie (FACS)

Um die Expression von humanen Chemokinrezeptoren (CCR1 bis CCR10 und CXCR1 bis CXCR6) zu untersuchen, wurden kultivierte humane primäre epidermale Keratinozyten, dermale Fibroblasten und dermale Endothelzellen von verschiedenen

Donoren mit monoklonalen PE-konjugierten Antikörpern (mAb) oder einer geeigneten Isotypkontrolle gefärbt (Ausnahme CCR8 und CCR10 mit indirektem Labeling). Die Zellen wurden nach kurzem Waschen mit kaltem PBS mit Trypsin (10x) abgelöst und einmal gewaschen (10 min., 1200 rpm, 4°C). Danach wurden die Zellen zu  $1 \times 10^6$  Zellen in FACS-Röhrchen aliquotiert und zweimal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (10 min., 1200 rpm, 4°C). Anschließend erfolgte die Färbung mit den primären Antikörpern und, gefolgt von zwei Waschschritten, für CCR8 und CCR10 die Färbung mit den sekundären Antikörpern. Alle verwendeten Antikörper finden sich unter Punkt 2.1.6.. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in 150  $\mu$ l PBS/2% Paraformaldehyd fixiert. Zu jeder Färbung wurde eine Isotypkontrolle mit gleicher Konzentration und gleichen Färbebedingungen durchgeführt. Die Fluoreszenzanalyse erfolgte mit einem Durchflusszytometer vom Typ FACScan oder FACScalibur (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der CellQuest Software der Firma Becton Dickinson.

#### 2.2.4 In vitro-Wound Repair Assay

Humane primäre epidermale Keratinozyten, dermale Fibroblasten und dermale endotheliale Zellen wurden in 24-Well Platten bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert (siehe 2.2.3). Das Medium wurde entfernt und eine einzelne definierte Wunde wurde mit einer sterilen Pipettenspitze in den intakten Zellfilm gesetzt. Um den Einfluss von Chemokinen auf die *in vitro* Wundheilungsreaktion zu untersuchen, wurde Medium ohne bzw. mit CCL1, CCL11, CCL17, CCL20, CXCL8, CXCL9, CXCL10 oder CXCL12 für Keratinozyten, CCL1, CCL3, CCL11, CCL17 oder CCL27 für Fibroblasten und CCL1, CCL11, CCL17, CCL20, CCL27, CXCL8, CXCL9 oder

CXCL10 für dermale Endothelzellen zu jedem Well hinzugefügt. Um die Beteiligung eines  $G_{(i)}\alpha$ -Protein gekoppelten Rezeptorsignalweges bei der Chemokin induzierten Wundheilung struktureller Zellen zu bestätigen, wurden die Zellen 10 bis 12 Stunden vor der Verwundung und Chemokinstimulation mit oder ohne Pertussis-Toxin (100 ng/ml) vorinkubiert.

Außerdem wurden in Wound-Repair-Assays mit Keratinozyten die Effekte von Ly294002 (50  $\mu$ M), Cheleritrin (0,25  $\mu$ g/ml), Colzemid (0,4  $\mu$ g/ml),  $\alpha$ -Amanitin (5  $\mu$ g/ml) und Cycloheximid (50 ng/ml) auf den Wundheilungsprozess untersucht. Der Zustand der Wunden wurde sofort und 8 bis 18 Stunden nach der Wundsetzung mit Hilfe eines digitalen Kamerasystems oder eines digitalen Time-Lapse-Videosystems dokumentiert. Die Auswertung der End-Point-Assays erfolgte durch Vergleich des Wundschlusses der Kontrollgruppe mit dem der Gruppe der Chemokin induzierten Wundheilungsantwort.

### 2.2.5 Immunohistochemie

Für immunohistochemische Analysen wurden tiefgefrorene, auf einem Kryomikrotom auf eine Dicke von 8  $\mu$ m geschnittene Hautproben verwendet. Die Präparate wurden in Aceton fixiert und mit  $H_2O_2$  vorbehandelt, um die vorhandene Peroxidase-Aktivität zu beseitigen. Anschließend folgte eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit einem Avidin/Biotin Blocking Kit (VECTOR Blocking Kit). Zur Färbung wurden jeweils spezifische Antikörper gegen das nachzuweisende Protein benutzt. Zusätzlich wurde eine Isotypkontrolle durchgeführt, welche der gleichen Spezies angehörte wie der Erstantikörper der Färbung. Als Zweitantikörper wurden streptavidingekoppelte Zweitantikörper gegen den jeweils verwendeten Immunglobulintyp des

Erstantikörper aus Vectastain ABC-Kits oder Vector Elite Kits verwendet. Die Entwicklung der Färbung erfolgte mit einem AEC-Kit. Nach einer Gegenfärbung mit Haematoxylin (20 sec) wurde mit gesättigter Lithiumcarbonat-Lösung kontrastiert. Abschließend wurden die Schnitte mit AEC-erhaltendem Eindeckelmedium (Mounting Medium für AEC) eingedeckelt oder mit eindeckelfreiem Medium (Crystal/Mount™) abgedeckt. Alle Bilder wurden an einem Leitz Orthoplan-Mikroskop mit einer Olympus Camedia C-4040 Digitalkamera aufgenommen. Um Schwankungen zu kompensieren und um einen einheitlichen Bildhintergrund und eine gute Vergleichbarkeit der Bilder zu gewährleisten, wurde eine manuelle Tonwertkorrektur durchgeführt.

### 2.2.6 Nukleinsäuren-Analyse

#### *Gewebe-Homogenisierung*

Zur Zerkleinerung und späteren RNA-Extraktion wurden humane Hautproben mit einer Stahlkugel in ein geeignetes Teflongefäß gegeben, 1 min in Flüssigstickstoff tiefgefroren und 1 min lang bei 2000 rpm im Mikrodismembrator zerkleinert. Die Zerkleinerung mit Tiefkühlen wurde mindestens dreimal bis zur vollständigen Pulverisierung der Probe wiederholt. Die zerkleinerten Proben wurden anschließend in 5 ml TRIZOL aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

#### *RNA-Extraktion*

Die Extraktion von Gesamt-RNA wurde mit TRIZOL, einem Ein-Phasen-Gemisch aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, durchgeführt. Dazu wurden Zellen (nach Entfernen des Kulturüberstandes) oder homogenisiertes Gewebe in 1 ml bzw. 5 ml TRIZOL aufgenommen. Nach Zugabe von 1/5 Volumen Chloroform wurden die

Proben 20 min lang bei 10000 rpm, 4°C (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge mit Sorvall SA-600 Rotor) zentrifugiert. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde in ein sauberes Gefäß übernommen, die Interphase mit genomischer DNA und die proteinhaltige, rötliche Phenolphase wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde mit auf –20°C vorgekühltem Isopropanol versetzt und durch mehrfaches Invertieren vermischt. Bei Proben mit wenig Ausgangsmaterial wurde 1 µl Glykogen zugegeben, um ein besser sichtbares Pellet zu erhalten. Die RNA wurde über Nacht bei –20°C gefällt und 30 min bei 10000 rpm, 4°C pelletiert. Die Lage des Pellets im Röhrchen wurde markiert, der Überstand abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

#### *Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung*

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch Messung der Absorption (A) in den Bereichen von 260 nm, 280 nm und 320 nm mit einem Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 Spektralphotometer (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die  $A_{260}$  bei 260nm dient als Referenzwert, die  $A_{280}$  Absorption bei 280 nm gibt den Proteingehalt der Lösung, die  $A_{320}$  Absorption bei 320 nm dagegen die Streuung der Messung an. Durch Erstellen des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  erhält man einen Wert für die Reinheit der Nukleinsäureproben; dieser liegt für saubere Aufarbeitungen bei  $\geq 1,8$ . Der Messwert  $A_{320}$  der Absorption bei 320 nm wird von den Messwerten  $A_{260}$  bei 260 nm bzw.  $A_{280}$  bei 280 nm abgezogen. Die Konzentration und Reinheit wurde nach Sambrook *et al.* berechnet. Für hochmolekulare DNA entspricht eine Absorption  $A_{260}$  von 1 50 µg DNA/ml, für RNA 40 µg RNA/ml.

#### *Reverse-Transkription-PCR*

Zur reversen Transkription von Gesamt-RNA zu cDNA wurden 4 µg RNA in einer Mischung von 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O mit 1 µl DNaseI, 1,5 µl 5x RT-Buffer, 1 µl RNase-Inhibitor (RNasin) und 2,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O für 20 min bei 37°C und weitere 10 min bei 70°C im Thermocycler behandelt. Nach Zugabe von 3,6 µl Oligo dT und 0,4 µl Random Hexamer folgten 10 min Inkubation bei 70°C im Thermocycler, das Annealing erfolgte auf Eis. Nach Zugabe von 4,5 µl 5x-Puffer, 1,5 µl dNTP, 1 µl DTT und 1 µl RNasin erfolgte eine Inkubation im Thermocycler für 2 min bei 42°C. Die eigentliche reverse Transkription erfolgte nach Zugabe von 2 µl Superscript II für 50 min bei 42°C und weiter 10 min bei 70°C im Thermocycler. Abschließend wurde, basierend auf der RNA-Konzentrationsmessung, vor der RT-PCR eine Konzentration von 10 ng/µl RNA eingestellt.

### *Quantitative real-time PCR*

Quantitative real-time PCR wurde, wie zuvor beschrieben, mit einem ABIPrism7000 durchgeführt. In Anwesenheit von 12,5 µl TaqMan<sup>®</sup> Universal Master, 0,625 µl genspezifischer TaqMan<sup>®</sup> Probe, 0,5 µl genspezifischer Vorwärts- und Rückwärts-Primer und 0,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O wurden 25 ng cDNA amplifiziert. Zur internen Positivkontrolle wurden je 0,125 µl 18S RNA-spezifische Sonde und Primer eingesetzt. Als genspezifische Sonden wurden FAM-markierte Oligonukleotide eingesetzt. Alternativ wurden 25 ng cDNA mit genspezifischen Primerpaaren und SYBR-green Mastermix amplifiziert, wobei 2,5 µl eines 2 µM Primermix und 12,5 µl SYBR-green Mastermix zusammen mit 25 ng cDNA in 10 µl H<sub>2</sub>O verwendet wurden. Folgende Reaktionstemperaturen wurden gewählt: 50°C für 2 Minuten, 95°C für 10 Minuten und 40 Wiederholungen 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 Minute. Die

Expression des Zielgens wurde nach der Expression der 18S RNA normalisiert, um die einzelnen Proben vergleichen zu können. Chemokinspezifische Primer wurden von Applied Biosystems kommerziell erworben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Mediatoren des dynamischem Wundheilungsprozesses

Um einen globalen Überblick über die beim Wundheilungsprozess regulierten Gene zu bekommen, wurde ein murines Wundheilungsmodell eingesetzt. Dazu wurde bei Mäusen (BALB/c) ein 2 cm langer Schnitt durch die Epidermis und Dermis gesetzt und die Wunde verschlossen. Die Mäuse wurden nach 6, 12, 18 Std. bzw. 1, 2, 3, 5, 7, 10 Tagen schmerzfrei getötet, um aus dem Wundbereich eine Probe zu entnehmen. Jede Gruppe bestand aus drei Tieren und jeder Versuch wurde zweifach durchgeführt. Eine Hälfte dieser Proben durchlief dann, zusammen mit Kontrollproben unverletzter Haut, eine RNA-Extraktion, eine RT-PCR und eine quantitative Real-Time PCR. Dabei wurde ein Pool von 101 Genen aus den am Wundheilungsprozess beteiligten Bereichen Chemokine (Abb. 9A und Abb. 10a-v), Zytokine und Wachstumsfaktoren (Abb. 9B), Metallo-Matrixproteine (Abb. 9C) sowie Adhäsionsmoleküle (Abb. 9D) analysiert. Ziel dieses Ansatzes war es, einen ersten Einblick in die dynamischen Verhältnisse der an der kutanen Wundheilung beteiligten Mediatoren zu bekommen. Dabei stellten die Gene aus der Chemokin-Superfamilie die am höchsten regulierten Gene aus dem untersuchten Genpool (Abb 9A und Abb. 10a-v).

### 3.1.1 Globale Regulationsmuster

Verglichen mit Werten aus unverletzter Haut wurde *MIP-2* - das mutmaßliche funktionale Maus/Ratten CXCL8//L-8 Homolog- mehr als 1000-fach hochreguliert. Die CC-Chemokine CCL3 und CCL4 zeigten ebenfalls eine hohe Regulation (Abb. 9A)

Neben dem signifikanten Anstieg der Ligandentranskripte konnte analog ein Anstieg der Transkripte der entsprechenden Rezeptoren (CXCR2, CCR1, CCR5) beobachtet werden (Abb. 9A). Die Expressionsmuster der Liganden über die Zeit korrelierten mit den Expressionsmustern der Rezeptoren im entsprechenden Zeitraum (Abb. 9A).

Unter den analysierten Chemokinen konnten drei klar von einander unterscheidbare zeitliche Expressionsmuster beobachtet werden:

Als erstes die Chemokine, die ihre maximale Regulation innerhalb von Stunden nach der Verletzung erreichen (Phase der Entzündungsreaktion) und im Laufe der folgenden Tage auf ihre Normalwerte zurückfallen. Zu diesen Chemokinen zählen *MIP-2*, CCL3, CCL4, CCL9, CCL2, CCL7, CCL11, CXCL10, XCL1, CCR1, CXCR2 (Abb. 9A und Abb. 10o, a, h, c, f, e, r, b und q).

Als zweites eine Gruppe von Chemokinen, die eine frühe Regulation zeigen, die ihr Maximum aber erst in den Tagen 3 bis 5 nach der Verletzung erreichen (Phase der Proliferation). Hierzu zählen CCL5, CXCL9 CXCL12, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3 und CXCR4. (Abb. 9A und Abb. 10i, s, u, d, g, k, t und v).

Eine dritte Gruppe wird während der Phase der Remodellierung überexprimiert, d.h. nach Tag 5 nach der Verletzung. Hier sind CCR6 und CX3CR1 zu nennen (Abb. 9A).

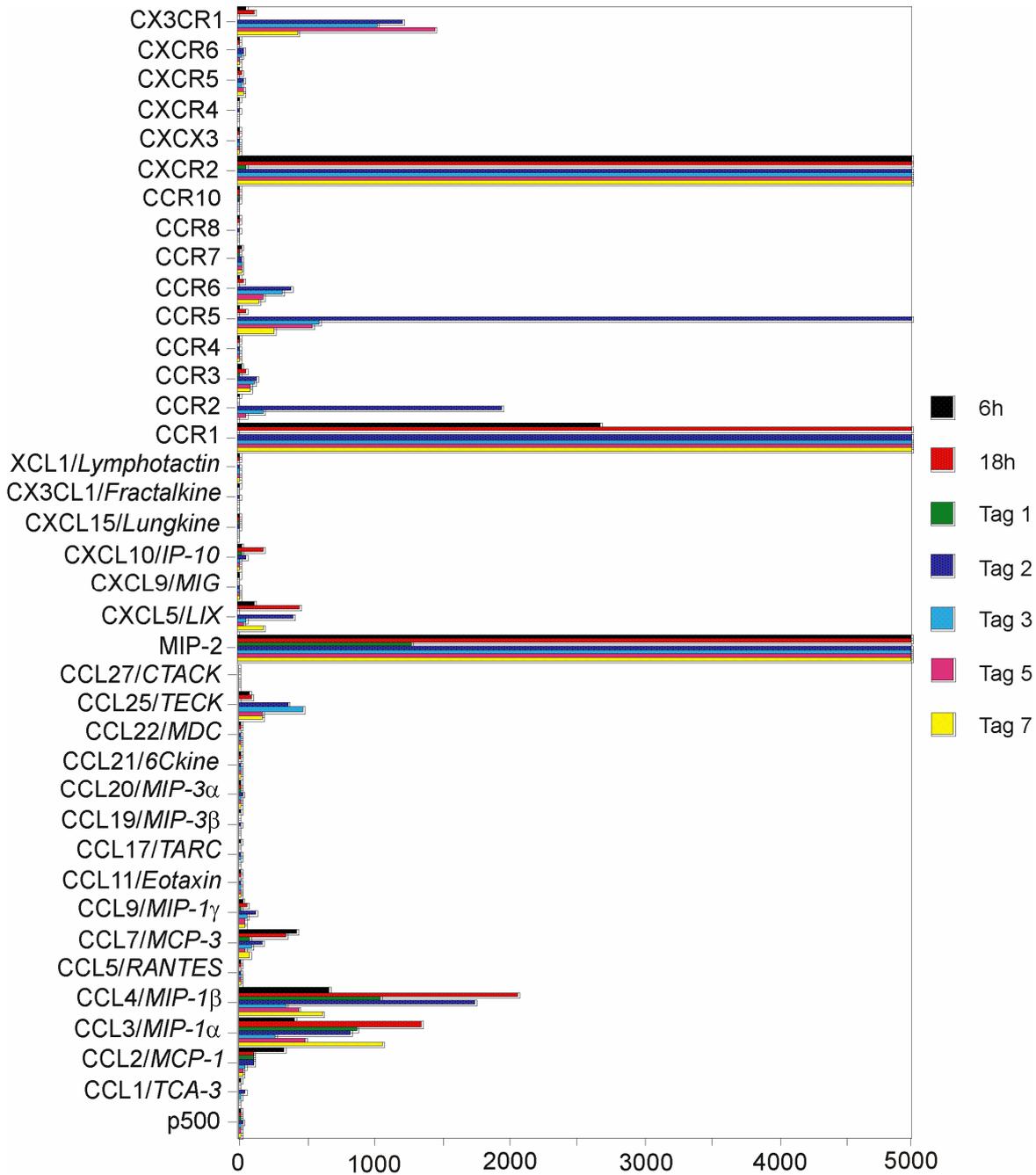
Besonders auffallend ist, dass die Expression der Chemokinrezeptoren eng der der entsprechenden Liganden folgt. Sich überlappende Expressionsmuster verschiedener Liganden eines Rezeptors konnten oft beobachtet werden (Abb 9A und Abb. 10) So zeigte CXCL10 (Abb. 10r) eine Hochregulation innerhalb von Stunden nach der Verletzung und einen kontinuierlichen Abfall in der Zeit danach. CXCL9 (Abb. 10e) zeigt hingegen einen wellenförmigen Verlauf der Regulation. Das zeitliche Expressionsprofil ihres gemeinsamem Rezeptors CXCR3 spiegelt dies wieder und ist zusammengesetzt aus einen frühen Anstieg und einer Hochregulation bis zum Tag 10 nach der Verletzung (Abb. 10t). Ähnliche Muster wurden für CCL2 (Abb. 10c), CCL5 (Abb. 10i) und CCL11 (Abb. 10e) und ihren gemeinsamen Rezeptoren CCR5 (Abb. 10k) und CCR3 (Abb. 10g) beobachtet.

Bei den untersuchten Zytokinen zeigten, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zusammen mit IL-6 die höchste Regulation nach einem Trauma (Abb. 9B). IL-6 zeigte zusammen mit TNF- $\alpha$  schon kurz nach dem Trauma (6 oder 18 Stunden) eine Hochregulation (Phase der Entzündungsreaktion), während IFN- $\gamma$ , IL-7 und IL-11 ihre Maxima an Tag 2 oder 3 zeigen (Proliferation; Abb. 9B).

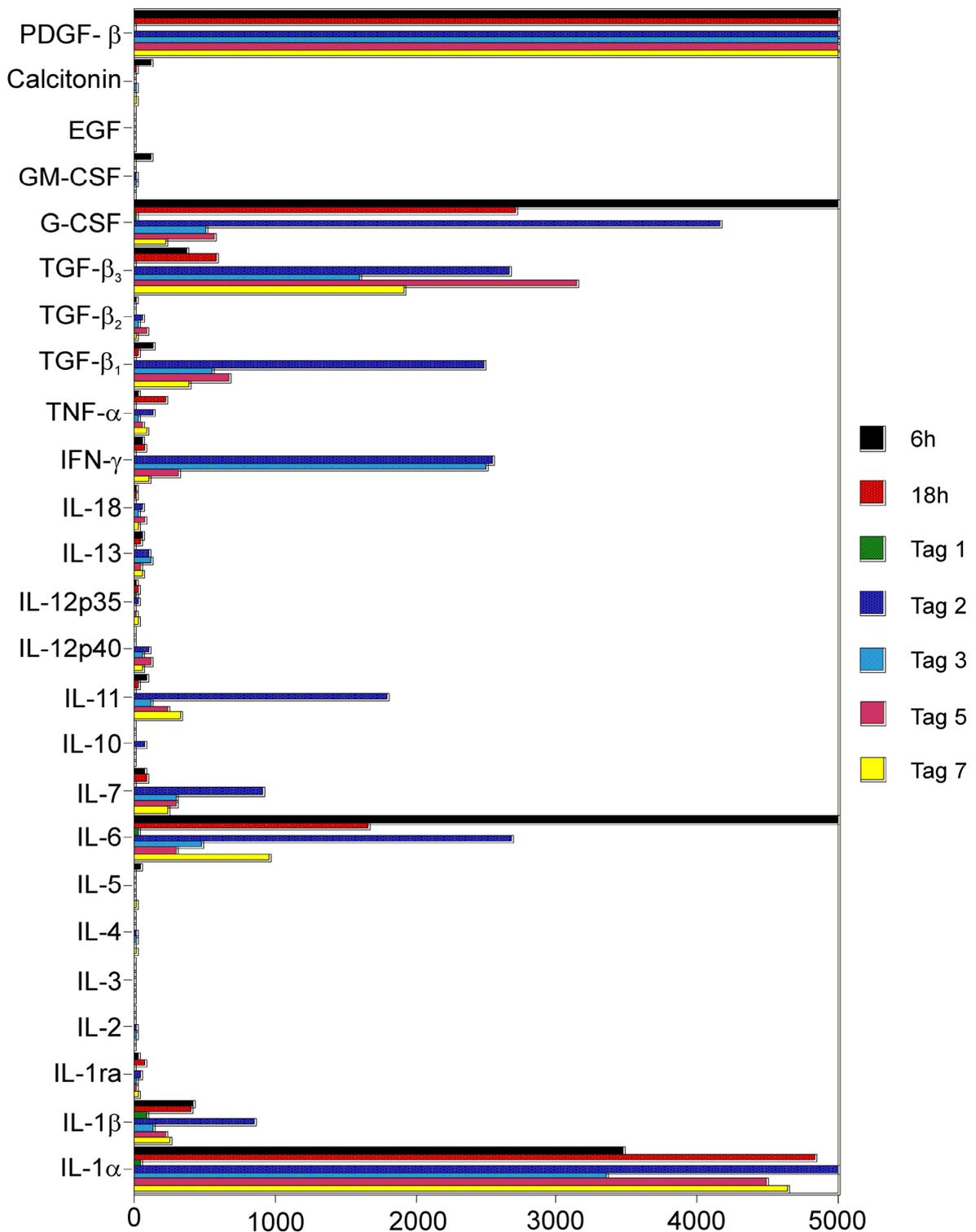
PDGF- $\beta$ , TGF- $\beta$  und G-CSF zeigten in der Gruppe der Wachstumsfaktoren die höchsten Expressionswerte (Abb. 9B). Diese hohen Expressionswerte konnten beim Übergang von der Phase der Entzündungsreaktion zur Phase der Proliferation beobachtet werden (Tag 2 bis 5 nach der Verletzung).

In der untersuchten Gruppe der Matrixmetalloproteinasen zeigten MT1-MMP, MMP10 (Stromelysin-2), Lactoferrin, MMP-9 und MMP-8 die prominenteste Hochregulation (Abb. 9C).

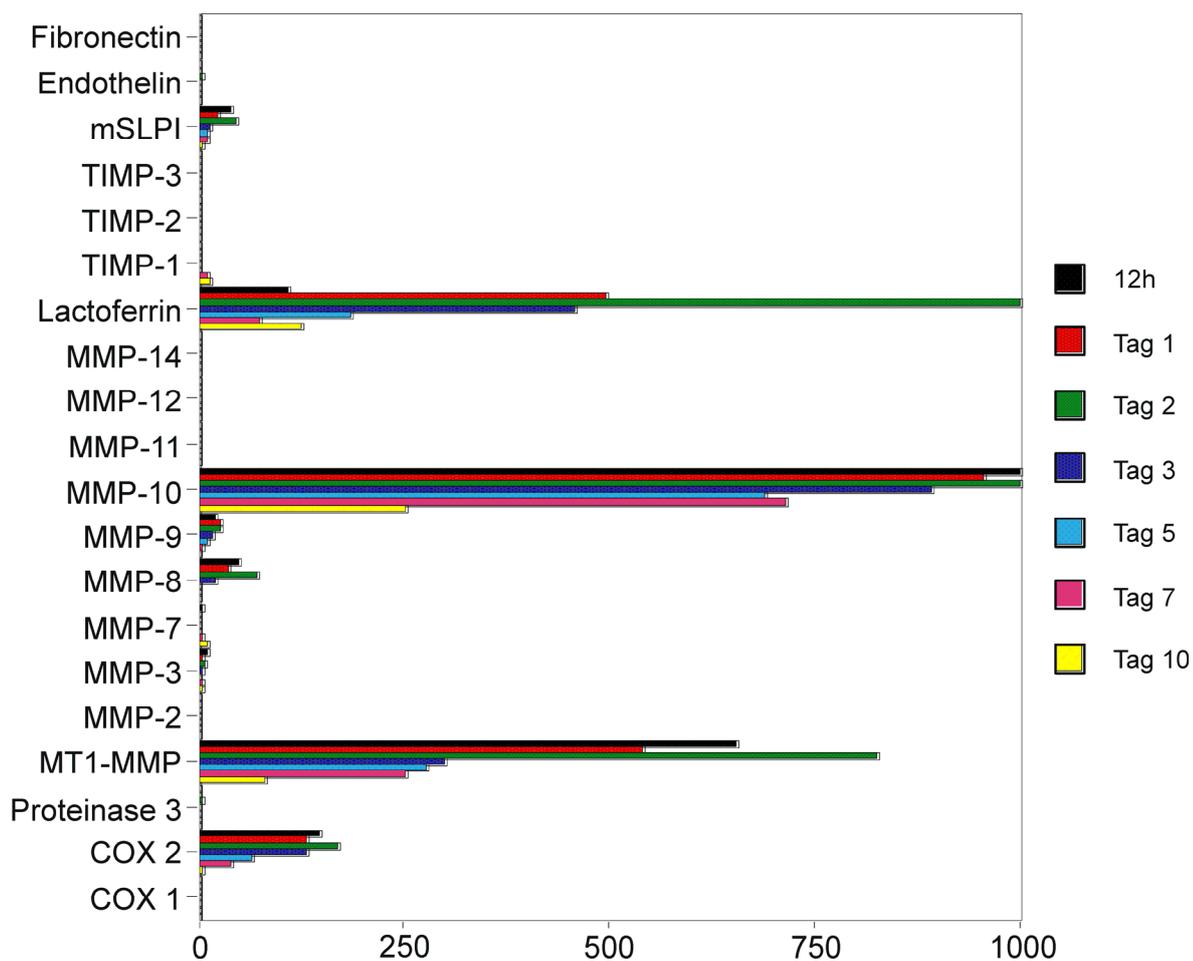
Eine ganze Reihe von Integrinen und Adhäsionsmolekülen wurden nach dem Trauma hochreguliert, wobei die  $\alpha_4$ - und  $\beta_7$ -Integrine die stärkste Regulation aufwiesen. Dennoch können diese Werte zu falschen Interpretationen führen, da einige Mitglieder der Integrin-Superfamilie, wie etwa  $\beta_1$ -Integrin eine signifikante homeostatische Expression in der Haut aufweisen, was zu einer geringeren Hochregulation nach einer Verletzung führt.



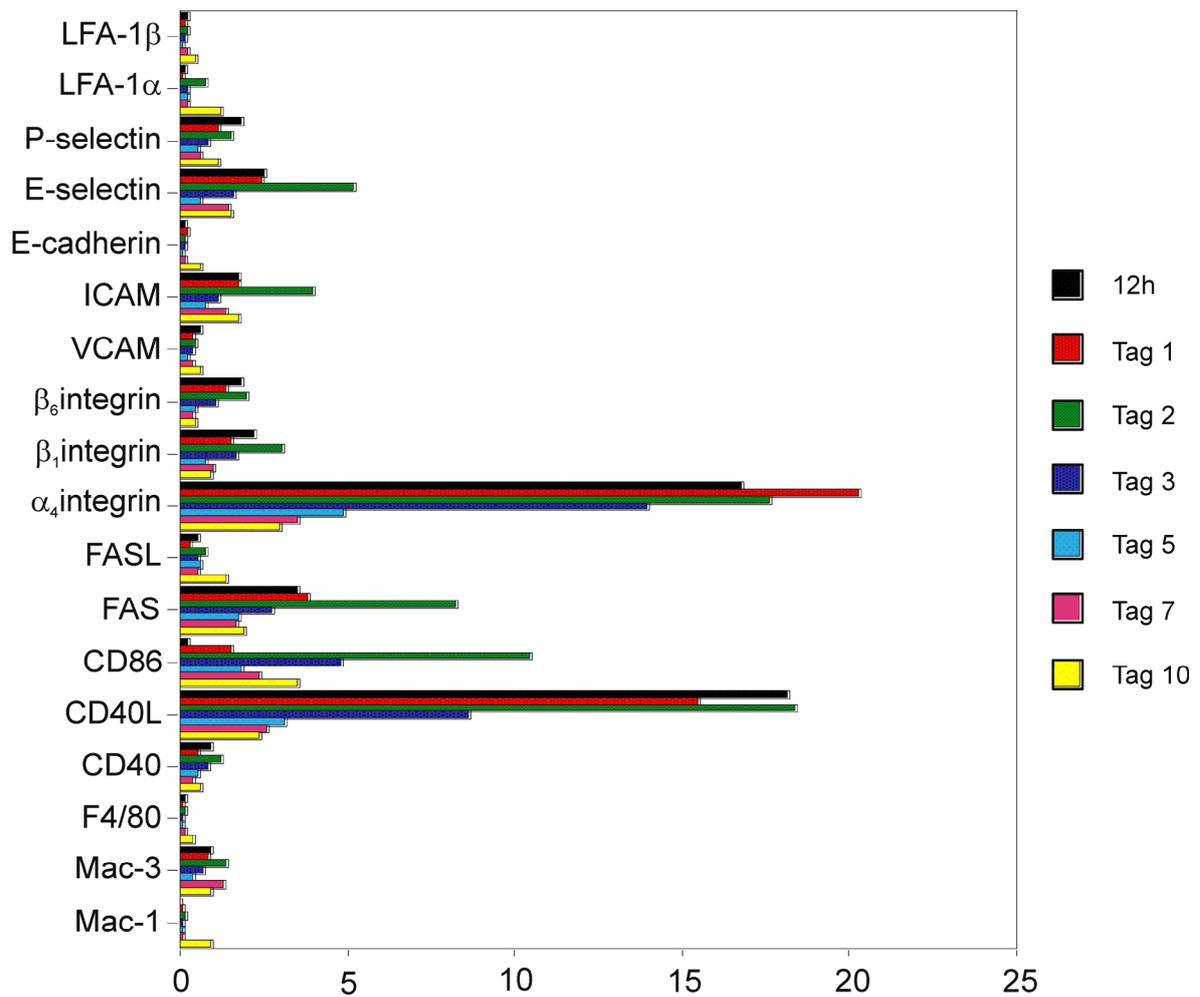
**Abb. 9A:** Quantitative real-time RT-PCR Analyse der Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren während der kutanen Wundheilung. Hautproben von BALB/c Mäusen wurden vor dem Trauma und nach 6, 18 Stunden bzw. 1, 2, 3, 5 und 7 Tage nach dem Trauma gewonnen. Die Expression der Zielgene ist als Vervielfachung verglichen mit den Werten aus gesunder Haut angegeben.



**Abb. 9B:** Quantitative real-time RT-PCR Analyse der Expression von Zytokinen während der kutanen Wundheilung. Hautproben von BALB/c Mäusen wurden vor dem Trauma und nach 6, 18 Stunden bzw. 1, 2, 3, 5 und 7 Tage nach dem Trauma gewonnen. Die Expression der Zielgene ist als Vervielfachung verglichen mit den Werten aus gesunder Haut angegeben.



**Abb. 9C:** Quantitative real-time RT-PCR Analyse der Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) während der kutanen Wundheilung. Hautproben von BALB/c Mäusen wurden vor dem Trauma und nach 12 Stunden bzw. 1, 2, 3, 5, 7 und 10 Tage nach dem Trauma gewonnen. Die Expression der Zielgene ist als Vervielfachung verglichen mit den Werten aus gesunder Haut angegeben.



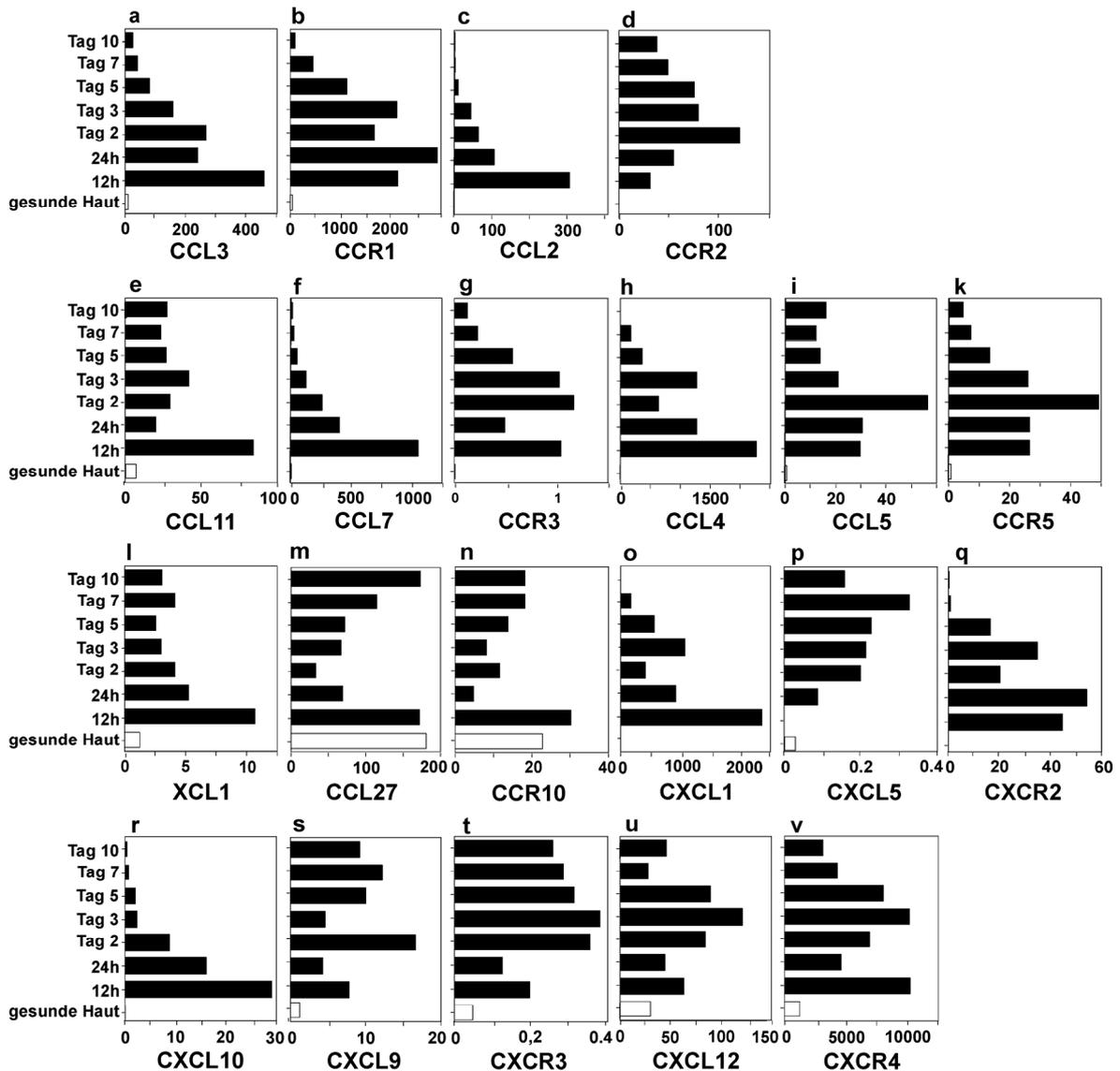
**Abb. 9D:** Quantitative real-time RT-PCR Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen während der kutanen Wundheilung. Hautproben von BALB/c Mäusen wurden vor dem Trauma und nach 12 Stunden bzw. 1, 2, 3, 5, 7 und 10 Tage nach dem Trauma gewonnen. Die Expression der Zielgene ist als Vervielfachung verglichen mit den Werten aus gesunder Haut angegeben.

### 3.1.2 Absolute Regulationsmuster ausgewählter Chemokine

Da die Vervielfachungsdifferenz der Expression kein Indiz für eine Vielzahl von Transkripten an einer bestimmten Stelle ist, wurden von ausgesuchten Chemokinliganden und Chemokinrezeptoren zusätzlich die absoluten Expressionslevel bestimmt. Es wurden real-time PCR-Analysen mit Standardkurven dieser Zielgene durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass neben MIP-2, CCR3 und CCR4 nicht nur die am stärksten regulierten Chemokine während des Wundheilungsprozesses sind, sondern auch, dass sie die höchste Anzahl an Transkripten während der Phase der Entzündungsreaktion bilden (Abb. 10a, h). Auch hier wird die Expression der Liganden von der Expression der Rezeptoren gespiegelt (Abb. 10b, k). Neben diesen sehr hoch regulierten Chemokinen zeigten auch andere Ligand-Rezeptor-Kombinationen auffällige Regulationsmuster. Für CXCR3 (Abb. 10t) konnte eine Hochregulation innerhalb von Stunden nach der Verletzung mit einem Maximum an Tag 2 bis 3 und einer durchgehenden Hochregulation bis Tag 10 beobachtet werden. Während der CXCR3-Ligand CXCL10 (Abb. 9r) eine frühe und starke Hochregulation innerhalb von Stunden nach der Verletzung zeigte, konnte für einen anderen Liganden, CXCL9 (Abb. 10s), eine verzögerte Induktion und eine durchgehende Hochregulation während des ganzen Wundheilungsprozesses beobachtet werden.

Ähnliche Muster konnten für CCR2 (Abb. 10d), CCR3 (Abb. 10g) und CCR5 (Abb. 10k) und die ihrer Liganden gezeigt werden (Abb. 10c, e, f, h und i). Für CCL2 (Abb. 10c) konnte ein Maximum der Regulation 12 Stunden nach der Verletzung gezeigt werden, das Maximum der CCR2-Expression wurde jedoch erst an Tag 2 erreicht (Abb. 10d). Das Paar CXCL12 (Abb. 10u) mit seinem Rezeptor CXCR4 (Abb.

10v) bildet eine weitere interessante Liganden-Rezeptor-Kombination, da beide eine signifikante homeostatische Expression in der Haut zeigen, die nach der Verletzung im gleichen Masse hochreguliert wird und ihr Maximum an Tag 3 erreicht.



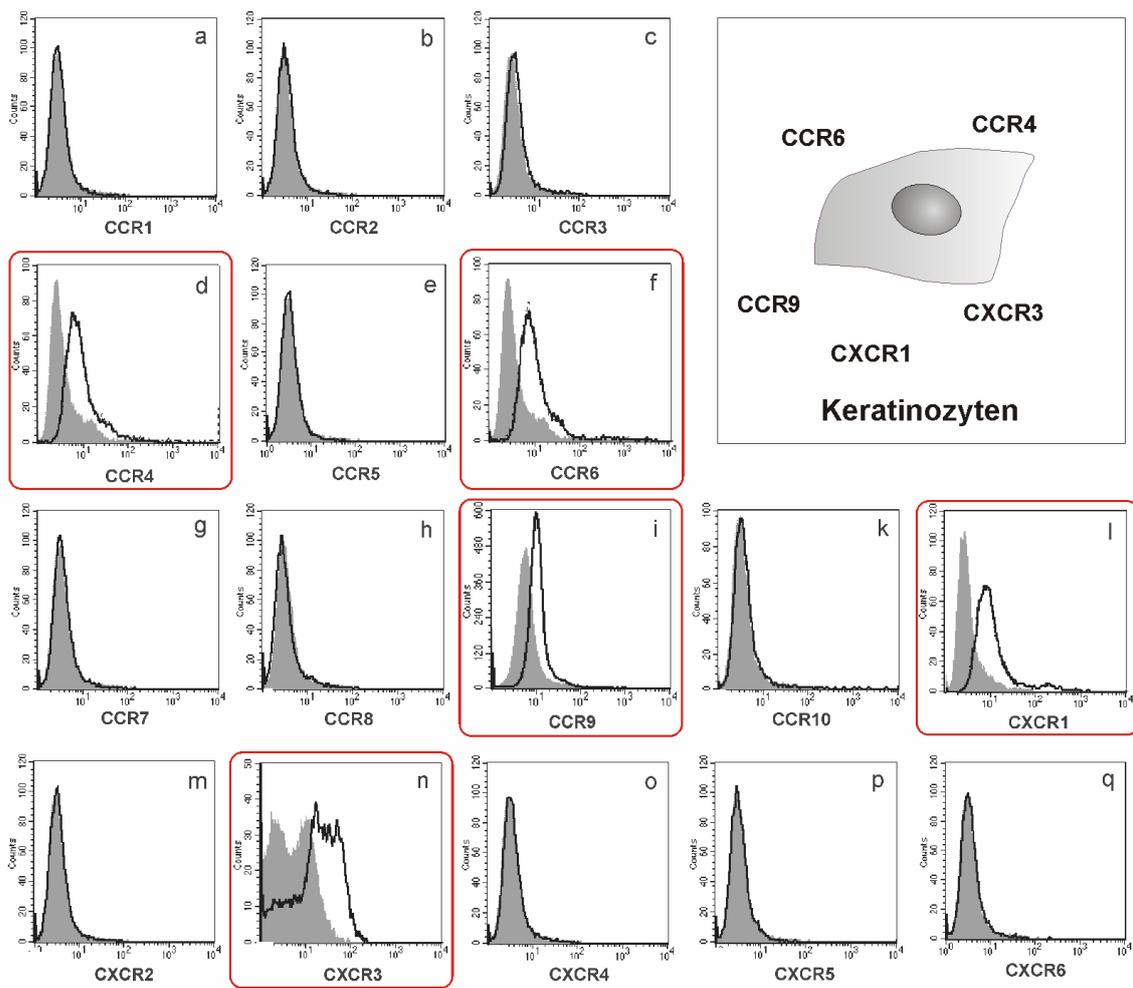
**Abb. 10:** Absolute Level der Expression von Chemokinen während der kutanen Wundheilung (a-v) mit Hilfe der quantitativen real-time PCR Analyse. Hautproben von BALB/c Mäusen wurden vor und nach 6, 12, 18 Stunden und 1, 2, 3, 5, 7, und 10 Tage nach der Verletzung gewonnen. Die absoluten Werte der Expression der Zielgene sind als fg pro 25 ng der totalen cDNA angegeben.

### 3.2 Chemokinrezeptorprofil humaner struktureller Zellen

Der Wundheilungsprozess ist geprägt von umfangreichen Migrationsprozessen. Neben den Wanderungen der Leukozyten liegt ein weiterer Schwerpunkt auf der Wanderung struktureller Zellen. Bisher konnte für strukturelle Zellen gezeigt werden, dass sie Chemokine und ihre Rezeptoren in großer Menge exprimieren und dass diese Expression stark reguliert ist (Kap. 3.1). Über die spezielle Rezeptorausstattung von primären Keratinozyten, dermalen Fibroblasten und dermalen Endothelzellen im Einzelnen und ihre daraus folgende potentielle Reaktion auf Chemokine sagt dies nichts aus. Um die von strukturellen Zellen exprimierten Chemokinrezeptoren (CCR1 bis CCR10 und CXCR1 bis CXCR6) zu identifizieren, wurden kultivierte humane primäre epidermale Keratinozyten, dermale Fibroblasten und dermale Endothelzellen von wenigstens zwei Donoren mit monoklonalen PE-konjugierten Antikörpern (mAb) oder einer geeigneten Isotypkontrolle gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet.

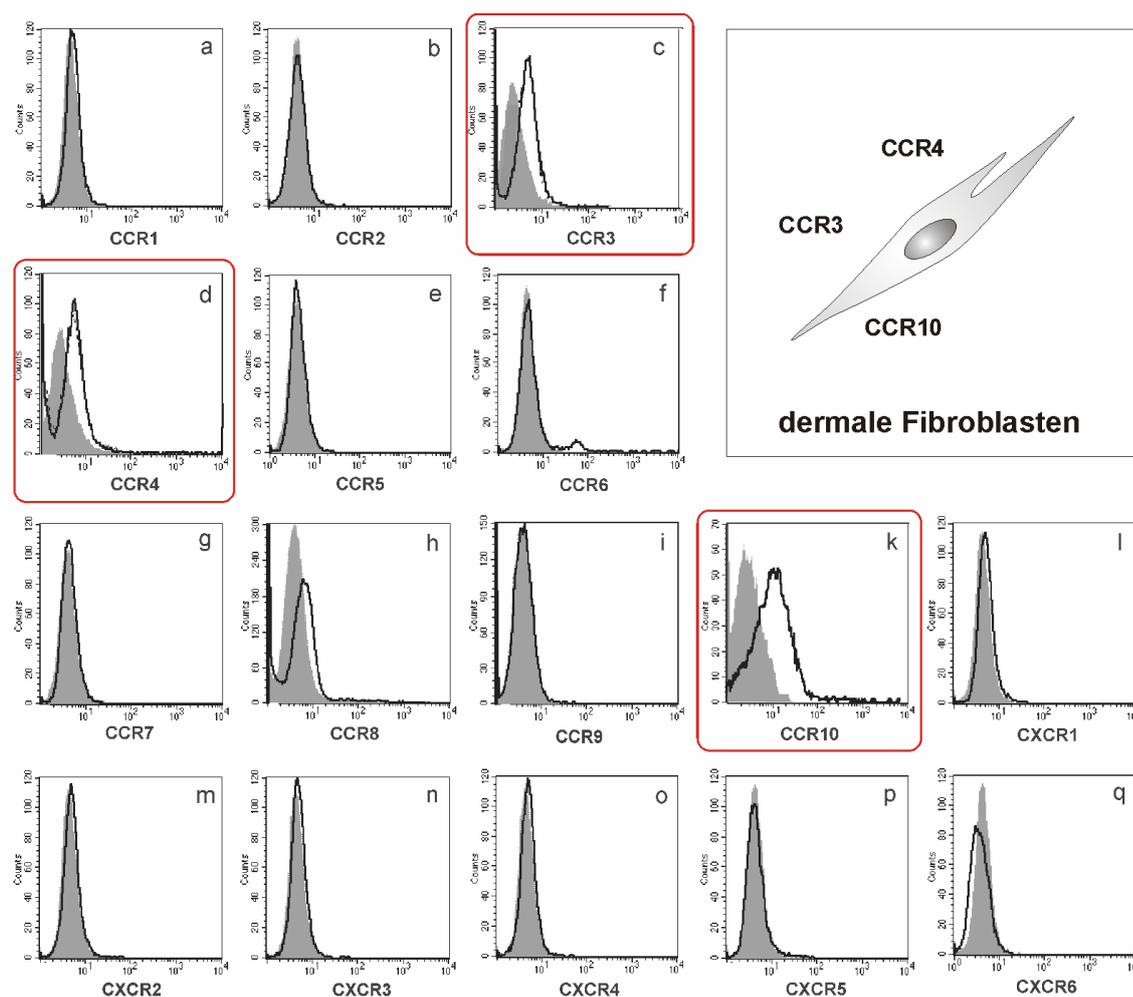
Um die Verhältnisse in den frühen Stadien des Wundheilungsprozesses zu simulieren, wurde ein Cocktail aus den primären proinflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  benutzt, um die Zellen zu aktivieren, da Zytokine wie Mitglieder der IL-1 Familie und wie TNF- $\alpha$  während des Wundheilungsprozesses induziert werden.

Kultivierte humane primäre Keratinozyten (ruhend und IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  aktiviert) zeigten in der durchflusszytometrischen Untersuchung eine deutliche Expression von CCR4, CCR6, CCR9, CXCR1 und CXCR3. Keine Expression konnte für die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CCR8 und CCR10 sowie für CXCR2 und CXCR4 bis CXCR6 beobachtet werden (Abb. 11).



**Abb. 11:** Durchflusszytometrische Auswertung des Chemokinrezeptorprofils ruhender humaner primärer Keratinozyten. Repräsentative Darstellung für drei unterschiedliche Donoren.

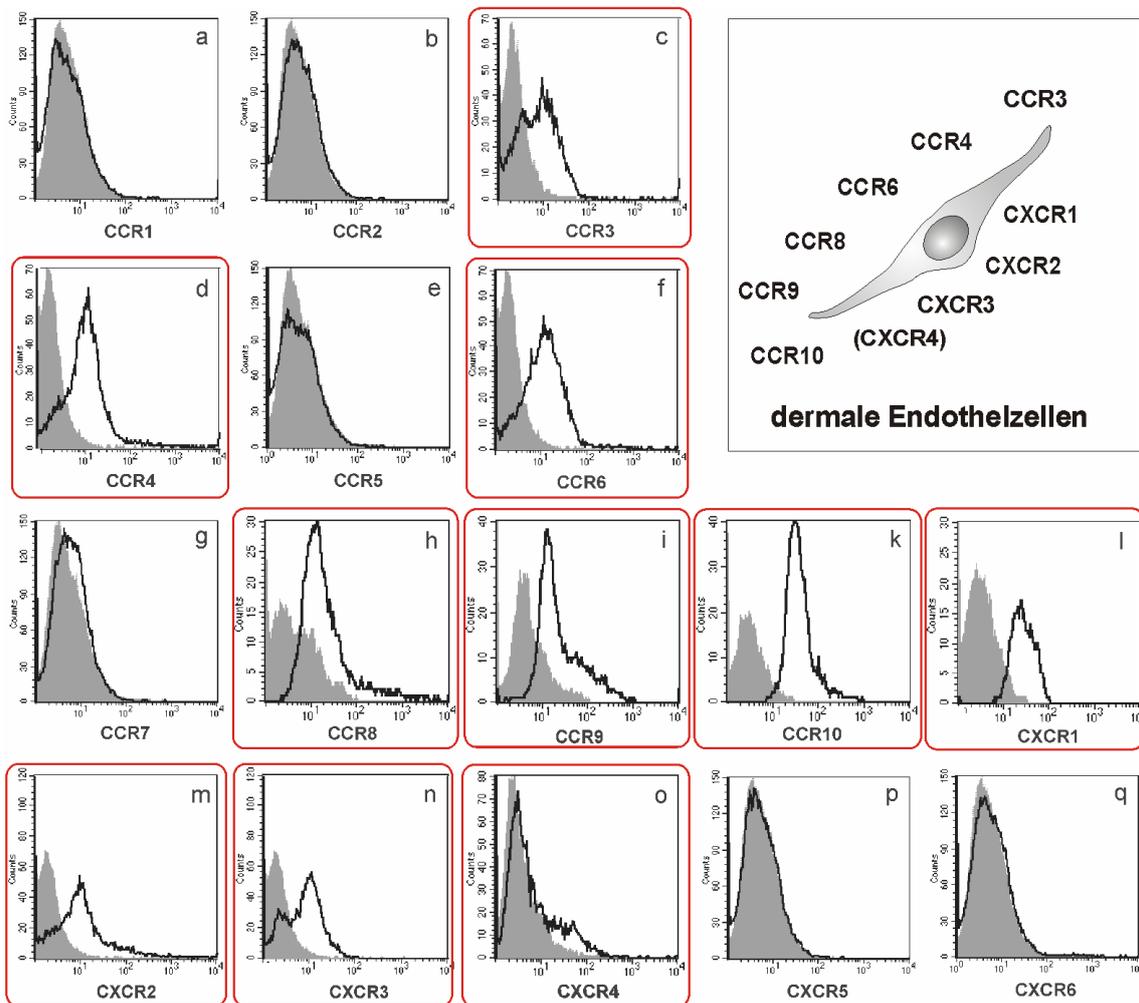
Dermale Fibroblasten zeigten mit CCR3, CCR4 und CCR10 eine Expression von nur drei verschiedenen Chemokinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, während alle anderen untersuchten Rezeptoren sich negativ darstellten (Abb. 12).



**Abb. 12:** Durchflusszytometrische Auswertung des Chemokinrezeptorprofils ruhender humaner dermaler Fibroblasten. Repräsentative Darstellung für drei unterschiedliche Donoren.

Das umfangreichste Rezeptorexpressionsmuster zeigten kultivierte primäre humane dermale Endothelzellen mit CCR3, CCR4, CCR6, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2 und CXCR3 auf der Zelloberfläche. Lediglich die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5 und CCR7 sowie CXCR5 und CXCR6 stellten sich negativ dar.

(Abb. 13)



**Abb. 13:** Durchflusszytometrische Auswertung des Chemokinrezeptorprofils ruhender humaner dermaler Endothelzellen. Repräsentative Darstellung für drei unterschiedliche Donoren.

Innerhalb der Versuchszeitraumes (12-24 Stunden) konnte bei den kultivierten strukturellen Zellen (primäre Keratinozyten, dermale Fibroblasten und dermaler Endothelzellen) kein signifikanter Unterschied der Rezeptorexpressionen zwischen den ruhenden Zellen und den IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  aktivierten Zellen festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch eine große donorabhängige Variabilität in der Ausprägung der Chemokinrezeptorexpression. Die relative Konfluenz der verwendeten Kulturen trug ebenfalls zur Variabilität bei. Die Grundaussage der Rezeptorexpression war davon jedoch nicht betroffen.

### 3.3 Regulation relevanter Chemokinliganden in strukturellen Zellen

Während der kutanen Wundheilung konnte ein aufeinander abgestimmtes Expressionsmuster bestimmter Chemokine und ihrer Rezeptoren beobachtet werden. Dies führte zur Suche nach dem zellulären Ursprung der Chemokinexpression und zu der Analyse des Regulationsmusters.

Um die möglichen Kommunikationswege aufzudecken, wurde eine systematische quantitative real-time PCR Analyse humaner primärer Keratinozyten, dermaler Fibroblasten und dermaler Endothelzellen durchgeführt. Zur Simulation der Verhältnisse in den frühen Stadien des Wundheilungsprozesses, wurde hier ein Cocktail aus den primären proinflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  als „Danger Signals“ benutzt, um die Zellen zu aktivieren, da Zytokine wie Mitglieder der IL-1 Familie und TNF- $\alpha$  während des Wundheilungsprozesses induziert werden.

Hierbei zeigte sich, dass aktivierte primäre Keratinozyten, dermale Fibroblasten und dermale Endothelzellen jeweils in großen Mengen Chemokine produzieren. Ebenfalls konnte für eine ganze Reihe von Chemokinen in ruhenden strukturellen Zellen eine homeostatische Expression dargestellt werden.

So werden z.B. CCL20 und CCL27 in Keratinozyten (Abb. 14f), CCL26 in dermalen Fibroblasten (Abb. 14c) und CCL1, CCL24 und CXCL11 (Abb. 14a, c, d) in dermalen Endothelzellen homeostatisch exprimiert.

Die hohe konstitutive Produktion von CCL20- und CCL27-Transkripten in Keratinozyten war durch primäre proinflammatorische Zytokine hoch induzierbar

(Abb. 14f). Während CCL20 nach der Induktion in allen Zelltypen stark exprimiert wurde, war die postinduktive Expression von CCL27 auf Keratinozyten allein beschränkt (Abb. 14f). So könnten die CCL27 produzierenden primären Keratinozyten über einen parakrinen Loop mit dermalen Fibroblasten und dermalen Endothelzellen kommunizieren, die beide den korrespondierenden Rezeptor CCR10 exprimieren (Abb. 14f).

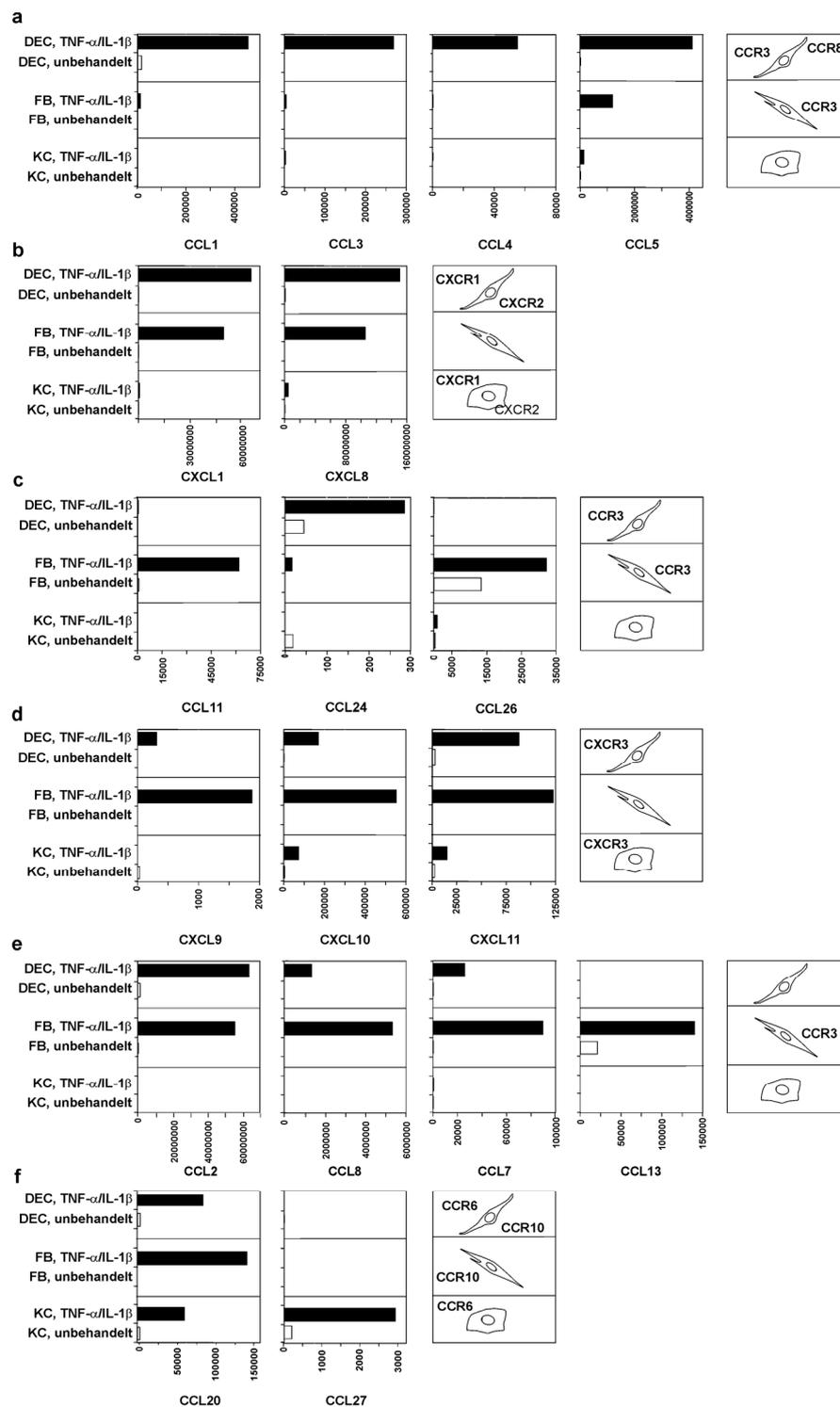
Dermale Endothelzellen zeigten postinduktiv eine starke Expression von CCL1, CCL3, CCL4 und CCL5 (Abb. 14a), wobei die Induktion von CCL1, CCL3 und CCL4 auf dermale Endothelzellen beschränkt war und nur von CCL5 eine relevante Induktion auch für Fibroblasten beobachtet werden konnte. Dies legt einen möglichen autokrinen Kommunikationsweg der dermalen Endothelzellen über CCL1 nahe und weiterhin sowohl para- als auch autokrine Kommunikationswege für alle Zelltypen über CCL5.

Als ebenfalls stark induzierbare Chemokine bei dermalen Endothelzellen stellten sich CXCL1 und CXCL8 (Abb. 14b) dar. Der Vergleich der gewonnenen Expressionsdaten struktureller Hautzellen zeigt eine nur auf dermale Fibroblasten beschränkte Expression von CCL13. (Abb. 14e). CXCL8 zeigte keine dominante Expression in kultivierten Keratinozyten (Abb. 14b).

Dermale Fibroblasten zeigten *in vitro* postinduktiv eine signifikante Hochregulation von Mitgliedern der MCP-Familie wie CCL2, CCL7, CCL8 und CCL13 (Abb. 14e) aber auch von CCL11 und CCL26 (Abb. 14c).

Eine signifikante Hochregulation der CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 bei Endothelzellen, Fibroblasten und - in einem geringeren Maße - bei

Keratinocyten konnte *in vitro* nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  beobachtet werden (Abb. 14d), die sich als ein eher schwacher bis moderater Auslöser für CXCR3 Liganden in strukturellen Zellen zeigt, wie vergleichende Studien mit IFN- $\gamma$  offenbaren.



**Abb. 14:** Analyse der absoluten Level der Expression von Chemokinen von ruhenden und aktivierten (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ ) humanen primären Keratinozyten (KC), dermalen Fibroblasten (FB) und dermalen Endothelzellen (DEC) mit Hilfe der quantitativen real-time RT-PCR Analyse. Die absoluten Werte der Expression der Zielgene sind als fg pro 25 ng der totalen cDNA angegeben. Die schematischen Bilder zeigen die korrespondierenden Chemokinrezeptoren auf den Zielzellen und geben einen Einblick in die komplexen auto- und parakinen chemokinvermittelten Aktivierungswege zwischen den strukturellen Zellen der Haut.

### 3.4 Das Chemokin-Netzwerk in der kutanen Wundheilung

Der nächste Schritt war die Verifikation der im Mausmodell und *in vitro* gewonnenen Ergebnisse an humanen strukturellen Zellen. Als humanes *in vivo* Modell diente die humane sekundäre Wundheilung (Abb. 15; Tabelle 2). Die immunhistochemische Analyse der Expression von Chemokinliganden und Chemokinrezeptoren während des Wundheilungsprozesses wurde an Hautbiopsien durchgeführt, die während des Wundheilungsprozesses (an Tag 0, 2, 5, 9 bzw. 12) aus dem Wundrandbereich genommen wurden (siehe 2.2.2).

Sie zeigte, dass sowohl in der frischen Wunde als auch während des Verlaufes der sekundären Wundheilung Chemokine von strukturellen Zellen wie auch von den einwandernden Leukozyten in signifikanten Mengen produziert werden. Ebenso wie die ansässigen und die in die Haut einwandernden Leukozyten exprimieren und regulieren die strukturellen Zellen während des Heilungsprozesses ihre Chemokinrezeptoren (Abb. 15; Tabelle 2).

#### **Chemokinliganden und –rezeptorenmuster der gesunden Haut**

Um den zellulären Ursprung der Chemokinliganden und Chemokinrezeptorexpression zu identifizieren, wurden serielle histologische Schnitte herangezogen. Die in den Schnitten vorhandenen Lymphozyten wurden mit anti-CD3 identifiziert, Monozyten/Macrophagen und dendritische Zellen mit anti-CD68 oder Endothelzellen mit anti-CD31. Keratinozyten und Fibroblasten sowie die von ihnen exprimierten Chemokinliganden und Chemokinrezeptoren konnten durch ihren charakteristischen Phänotyp und die anatomische Lage identifiziert werden.

Das dominierende Chemokin in der normalen Haut ist das von basalen Keratinozyten

der Epidermis exprimierte CCL27. Andere ebenfalls homeostatische Chemokine (aber mit deutlich schwächerer Expression durch primäre Keratinozyten), sind CCL1 und CXCL10 auf basalen Keratinozyten und CCL17, CCL18 und CXCL8 auf suprabasalen Keratinozyten (Tabelle 2). Bemerkenswerterweise zeigte CCL1 die stärkste Expression an den Haarfollikeln.

Primäre Keratinozyten konnten durch die immunhistochemische Analyse als eine Quelle der konstitutiven Chemokinrezeptorexpression identifiziert werden. Es konnte eine deutliche Expression von CXCR3 durch basale Keratinozyten der normalen Haut beobachtet werden (Abb. 15e). Im Laufe ihrer Differenzierung scheinen die Keratinozyten CXCR3 zu verlieren und stattdessen CXCR4 zu exprimieren. Endpunkt dieser Entwicklung sind die CXCR3<sup>-</sup>/CXCR4<sup>+</sup> suprabasalen Keratinozyten in der gesunden Haut (Abb. 15q). Desweiteren wird CCR6 in hohem Maße von Keratinozyten der gesunden Haut exprimiert (Tabelle 2).

Andere Chemokinrezeptoren, die von Keratinozyten normaler Haut auf niedrigerem Level gebildet werden, sind: CCR3 auf basalen und suprabasalen Keratinozyten sowie CCR4 und CXCR1 auf suprabasalen Keratinozyten (Tabelle 2).

Neben den Keratinozyten zeigten auch dermale Endothelzellen mit CCL1, CCL17, CCL24 und CXCL12 und den Rezeptoren CCR2a, CCR3, CCR4, CCR8, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3 ein klares homeostatisches Chemokinliganden- und Chemokinrezeptorenmuster, dass mit dem vorher erhobenen *in vitro*-Daten übereinstimmt. (Tabelle 2; Abb. 11-13).

### **Chemokinliganden und –rezeptorenmuster nach dem Trauma**

Nach dem Trauma infiltrieren Monozyten die Haut, werden aktiviert und differenzieren zu Makrophagen und dendritischen Zellen. Diese exprimieren CCR1, CCR2b (Abb. 15k), CCR6, CCR8 und CXCR4 (Abb. 15q; Tabelle 2). CD3-positive Lymphozyten, die ab Tag 2 nach Verletzung auftreten, werden in perivaskulären Taschen angetroffen, wo sie das Wundbett demarkieren. Sie exprimieren eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren wie CCR3, CCR4, CCR6, CCR8, CCR10, CXCR3 und CXCR4 (Abb. 15; Tabelle 2).

Am Tag zwei nach der Verletzung beginnt die Formation der so genannten „Neo“-Epidermis durch Migration der Keratinozyten des Wundrandes in das Wundbett (Abb. 15a). Die basalen Keratinozyten der „Neo“-Epidermis sind während der gesamten Periode der Re-Epitelisation eine starke Quelle von CCL27 (Tabelle 2). Eine schwächere Expression konnte für das von basalen Keratinozyten gebildete CCL1 beobachtet werden (Abb. 15l, n). CXCL10 wurde von Keratinozyten des Wundrandes und der weiteren Umgebung um die Wunde nur schwach exprimiert (Tabelle 2). Die Keratinozyten wandern während der Wundschließung als Kollektiv, bei dem die basalen Zellen den Weg leiten (Abb. 16). Genau in diesem Subset von migrierenden basalen Keratinozyten werden CCR6 und CXCR3 hoch exprimiert (Tabelle 2). Die suprabasalen Keratinozyten der Neo-Epidermis waren eine ergiebige Quelle von CCL18, CCL20 und CXCL8 und exprimierten geringe Mengen von CCR3, CCR4 und CXCR1 auf ihrer Oberfläche (Tabelle 2).

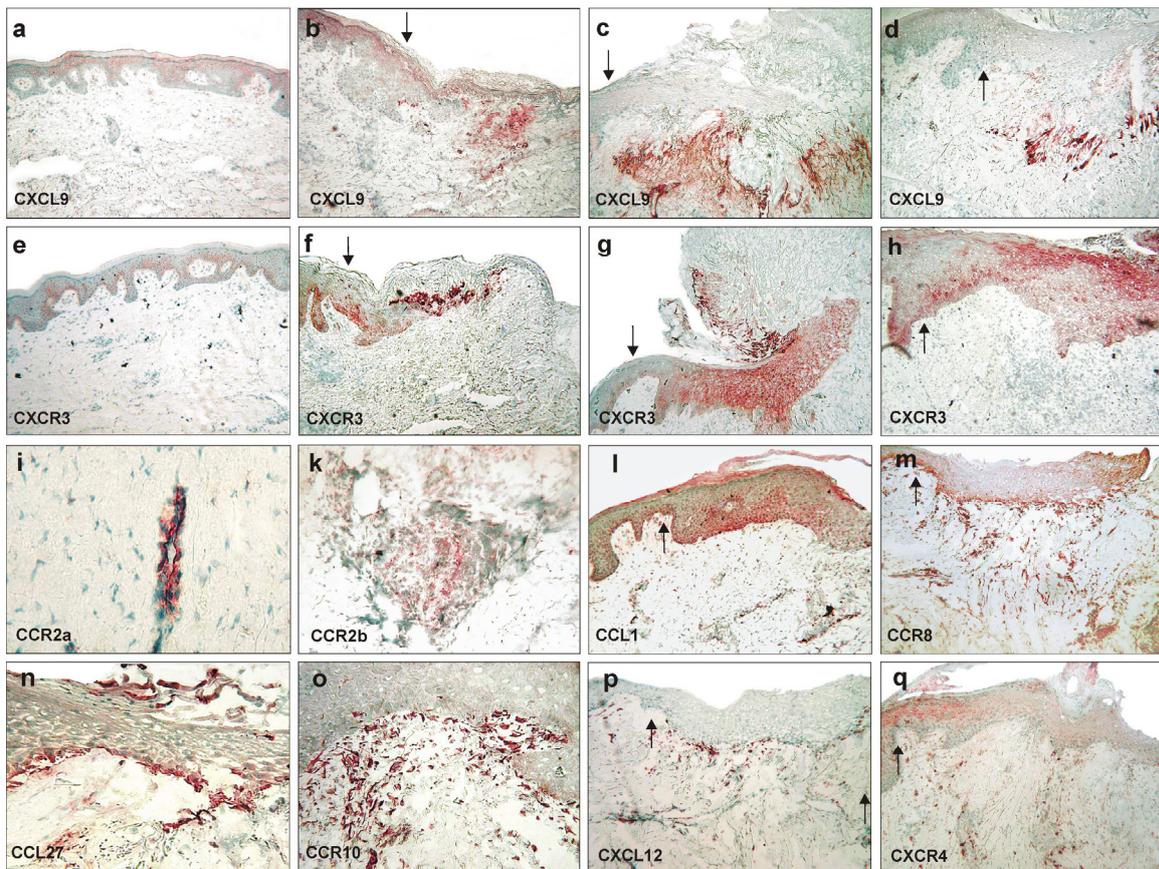
Die Reorganisation der Neo-Epidermis beginnt nach Tag 10, in der Phase der Geweberemodellierung (Abb. 15c). Sie ist durch den Aufbau eines geschichteten

Rezeptormusters gekennzeichnet, bei dem CXCR3 auf basalen Keratinozyten und CXCR4 stark auf sich differenzierenden suprabasalen Keratinozyten exprimiert werden (Abb. 15e-h; Tabelle 2). CD68-positive-(CD68<sup>+</sup>)-Leukozyten wurden in perivaskulären Taschen beobachtet, wo sie das Wundbett begrenzen, und in enger Nähe zur sich entwickelnden Neo-Epidermis. Die Population der die Haut infiltrierenden Monozyten, aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen waren eine Quelle von CCL18, CXCL9 (Abb. 15a-d) und CXCL12 (Abb. 15p; Tabelle 2). Beginnend mit Tag 4 nach der Verletzung konnten Endothelzellen beobachtet werden, die, einer provisorischen extrazellulären Matrix folgend, das Wundbett infiltrieren. Diese infiltrierenden Endothelzellen zeigten ein weites Spektrum an Chemokinrezeptoren mit CCR3, CCR4, CCR6, CCR8, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, and CXCR4 (Abb. 15; Tabelle 2). An Tag 12 nach dem Trauma war CCR6 der dominante Chemokinrezeptor der von Endothelzellen exprimiert wurde (Tabelle 2). In die Wunde einwandernde Endothelzellen und die Endothelzellen des Wundrandes produzierten ebenfalls eine Vielzahl von Chemokinliganden wie CXCL8, CXCL10, CXCL12 und CCL24 (Tabelle 2). Obwohl kultivierte Endothelzellen keine signifikanten Mengen an CCR2 *in vitro* zeigten, zeigten Antikörper, die gegen die Splice-Variante CCR2a gerichtet sind, eine starke Expression von CCR2 auf Endotelzellen (Abb. 15i; Tabelle 2). Ein Antikörper, der gegen die andere Isoform CCR2b gerichtet wurde, zeigte in vollkommen anderes Färbemuster mit einer dominanten Immunreaktivität auf CD68<sup>+</sup>-Leukozyten (Abb. 15k; Tabelle 2).

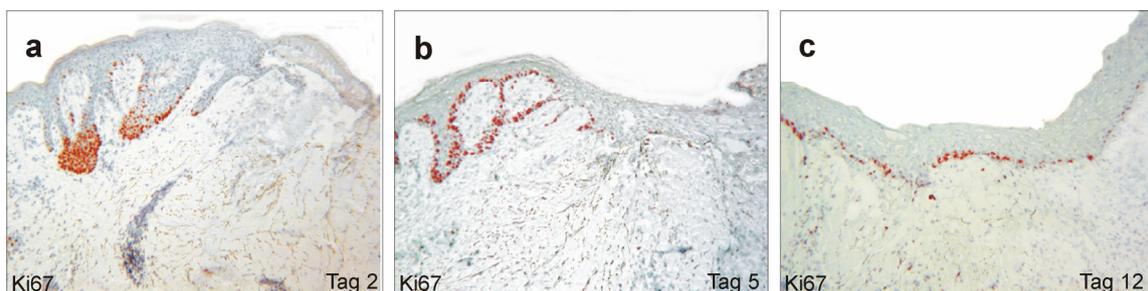
CCL17, ein Chemokin, von dem bekannt ist, dass es auf Endothelzellen exprimiert wird, wird in humanen sekundären Wunden auch von Keratinozyten und ab Tag 5

nach der Verletzung auch von Endothelzellen exprimiert (Tabelle 2). Der zugehörige Rezeptor CCR4 wird homeostatisch auf suprabasalen Keratinozyten sowohl in gesunder wie auch in verletzter Haut exprimiert (Tabelle 2). Weiterhin wurde CCR4 auf Endothelzellen im Wundbett nachgewiesen werden, was *in vitro* Ergebnisse mit kultivierten Endothelzellen bestätigt.

Zusammenfassend bestätigen unsere Ergebnisse zur humanen sekundären Wundheilung unsere ursprünglichen Beobachtungen im Mausmodell und *in vitro*. Sie legen die Vermutung nahe, dass es verschiedene sowohl autokrine als auch heterokrine Regelwege der durch Chemokine induzierten Zellaktivierung gibt und ebenso ein zeitlich-räumliches Zusammenspiel der verschiedenen Chemokinliganden und ihrer Rezeptoren, die biologische Prozesse einschließlich der Zellmigration während der kutanen Wundheilung zu steuern vermögen.



**Abb. 15:** Immunhistochemische Analyse der Chemokinexpression in gesunder Haut verglichen mit verletzter humaner Haut. Kryoschnitte (6 $\mu$ m) von Hautproben, die entweder von gesunden Probanden oder aber von Probanden stammen die eine Acne inversa-Behandlung und sekundäre Wundheilung durchlaufen wurden mit Antikörpern gegen CXCL9 (a-d), CXCR3 (e-h), CCR2a (i), CCR2b (k), CCL1(l), CCR8 (m), CCL27 (n), CCR10 (o), CXCL12 (p), und CXCR4 (q) gefärbt. a und e gesunde Haut; b, f, i und k Tag 2 nach dem Eingriff; c, g, l und q Tag 7 nach dem Eingriff; d, h, m, n, o, und p Tag 12 nach dem Eingriff. Vergrößerung: 100x oder 250x. Die Wunde zeigt zum oberen rechten Rand des Bildes. Der Pfeil markiert den Beginn der Neoeidermis.



**Abb. 16:** Immunhistochemische Analyse der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 während des Wundheilungsprozesses in der humanen Haut. Kryoschnitte (6 $\mu$ m) der Hautproben von Probanden die eine Acne inversa-Behandlung und sekundäre Wundheilung durchlaufen, wurden mit dem Proliferationsmarker Ki67 gefärbt. Bild a: Tag 2, b: Tag 5 und c: Tag 12 nach dem Eingriff. Die Wunde zeigt zum oberen rechten Rand des Bildes. Die linke Bildseite zeigt die sich bildende Neoeidermis. Vergrößerung: 100x.

## 70 Ergebnisse

Genes		Normal Skin	Day 2 p.o.	Day 5 p.o.	Day 9 p.o.	Day 12 p.o.	Genes		Normal Skin	Day 2 p.o.	Day 5 p.o.	Day 9 p.o.	Day 12 p.o.	
<b>CCR1</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	<b>CCL1</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	
	Macrophage	+	++	++	+	+		<i>I-309</i>	Macrophage	-	-	-	-	-
	Lymphocyte	-	-	-	-	-		Lymphocyte	-	-	-	-	-	-
	Keratinocyte	-	-	-	-	-		Keratinocyte	+	+	+	+	+	+
	Fibroblast	-	-	-	-	-		Fibroblast	-	-	-	-	-	-
	Endothelial cell	-	-	-	-	-		Endothelial cell	++	+++	+++	+++	+++	++
<b>CCR2a</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	<b>CCL4</b>	Neutrophil	+	-	-	-	-	
	Macrophage	-	-	-	-	-		<i>MIP-1<math>\beta</math></i>	Macrophage	+	++	++	+	+
	Lymphocyte	-	-	-	-	-		Lymphocyte	-	-	-	-	-	-
	Keratinocyte	-	-	-	-	-		Keratinocyte	-	-	-	-	-	-
	Fibroblast	-	-	-	-	-		Fibroblast	-	-	-	-	-	-
	Endothelial cell	+	++	++	+	+		Endothelial cell	+	++	+	+	+	+
<b>CCR2b</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	<b>CCL11</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	
	Macrophage	+	++	++	+	+		<i>eotaxin</i>	Macrophage	-	-	-	-	-
	Lymphocyte	-	+	+	+	+		Lymphocyte	-	-	+	+	+	
	Keratinocyte	-	-	-	-	-		Keratinocyte	-	-	-	-	-	-
	Fibroblast	-	-	-	-	-		Fibroblast	+	++	++	+++	++	
	Endothelial cell	-	-	-	-	-		Endothelial cell	+	+	+++	+++	+	
<b>CCR3</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	<b>CCL17</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	
	Macrophage	-	-	-	-	-		<i>TARC</i>	Macrophage	-	-	-	-	-
	Lymphocyte	-	+	++	++	+		Lymphocyte	-	-	-	-	-	
	Keratinocyte	+	+	+	+	+		Keratinocyte	+	++	++	+	+	
	Fibroblast	-	+	++	++	+		Fibroblast	-	-	-	-	-	
	Endothelial cell	+	+	++	++	+		Endothelial cell	+	+++	+++	++	+	
<b>CCR4</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	<b>CCL18</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	
	Macrophage	-	-	-	-	-		<i>DC-CK1</i>	Macrophage	-	+	+	+	-
	Lymphocyte	-	-	++	++	+		Lymphocyte	-	-	-	-	-	
	Keratinocyte	+	+	+	+	+		Keratinocyte	+	++	++	++	+	
	Fibroblast	-	-	+	-	-		Fibroblast	-	-	-	-	-	
	Endothelial cell	+	+	++	++	+		Endothelial cell	-	-	-	-	-	
<b>CCR5</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	<b>CCL20</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	
	Macrophage	-	-	-	-	-		<i>MIP-3<math>\alpha</math></i>	Macrophage	-	-	-	-	-
	Lymphocyte	-	-	-	-	-		Lymphocyte	-	-	-	-	-	
	Keratinocyte	-	-	-	-	-		Keratinocyte	+	++	+++	+++	++	
	Fibroblast	-	-	-	-	-		Fibroblast	-	-	-	-	-	
	Endothelial cell	-	-	-	-	-		Endothelial cell	-	-	-	-	-	
<b>CCR6</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	<b>CCL24</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	
	Macrophage	-	-	-	-	-		<i>eotaxin-2</i>	Macrophage	-	-	-	-	-
	Lymphocyte	-	-	-	-	-		Lymphocyte	-	-	-	-	-	
	Keratinocyte	++	++	++	++	++		Keratinocyte	-	-	-	-	-	
	Fibroblast	-	-	-	-	-		Fibroblast	-	-	-	-	-	
	Endothelial cell	-	++	++	++	++		Endothelial cell	+	+	++	++	+	
<b>CCR8</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	<b>CCL27</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	
	Macrophage	+	++	++	+	+		<i>CTACK</i>	Macrophage	-	-	-	-	-
	Lymphocyte	-	+	+	+	+		Lymphocyte	-	-	-	-	-	
	Keratinocyte	-	-	-	-	-		Keratinocyte	+	++	+	+	+	
	Fibroblast	-	-	-	-	-		Fibroblast	-	-	-	-	-	
	Endothelial cell	+	+	++	++	+		Endothelial cell	-	-	-	-	-	
<b>CCR10</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	<b>CXCL8</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	
	Macrophage	-	-	-	-	-		<i>IL-8</i>	Macrophage	-	-	-	-	-
	Lymphocyte	-	+	++	++	++		Lymphocyte	-	-	-	-	-	
	Keratinocyte	-	-	-	-	-		Keratinocyte	+	+++	++	++	+	
	Fibroblast	-	-	-	-	-		Fibroblast	-	-	-	-	-	
	Endothelial cell	++	+	+++	++	++		Endothelial cell	+	++	++	++	+	
<b>CXCR1</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	<b>CXCL9</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	
	Macrophage	-	-	-	-	-		<i>Mig</i>	Macrophage	-	+++	++	+	-
	Lymphocyte	-	-	-	-	-		Lymphocyte	-	-	-	-	-	
	Keratinocyte	+	+	+	+	+		Keratinocyte	+	+	+	+	+	
	Fibroblast	-	-	-	-	-		Fibroblast	-	-	-	-	-	
	Endothelial cell	+	++	++	++	+		Endothelial cell	-	-	-	-	-	
<b>CXCR2</b>	Neutrophil	-	+	+	-	-	<b>CXCL10</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	
	Macrophage	-	-	-	-	-		<i>IP-10</i>	Macrophage	-	-	-	-	-
	Lymphocyte	-	-	-	-	-		Lymphocyte	-	-	-	-	-	
	Keratinocyte	+	+	+	+	+		Keratinocyte	+	+	+	+	+	
	Fibroblast	-	-	-	-	-		Fibroblast	-	-	-	-	-	
	Endothelial cell	-	++	++	-	-		Endothelial cell	-	+	++	+	-	
<b>CXCR3</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	<b>CXCL12</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-	
	Macrophage	-	-	-	-	-		<i>SDF-1<math>\alpha</math></i>	Macrophage	+	+++	+++	++	+
	Lymphocyte	-	-	-	-	-		Lymphocyte	-	-	-	-	-	
	Keratinocyte	+	++	+++	+	+		Keratinocyte	-	-	-	-	-	
	Fibroblast	-	-	-	-	-		Fibroblast	-	-	-	-	-	
	Endothelial cell	-	-	+	-	-		Endothelial cell	+	++	+++	+++	+	
<b>CXCR4</b>	Neutrophil	-	-	-	-	-								
	Macrophage	+	+++	+++	+	+								
	Lymphocyte	-	+	+	+	+								
	Keratinocyte	+	+	+	++	++								
	Fibroblast	-	-	-	-	-								
	Endothelial cell	+	+	+	+	+								

**Tabelle 2:** Immunhistochemische Analyse der Chemokinexpression in gesunder Haut verglichen mit verletzter humaner Haut. Kryoschnitte (8  $\mu\text{m}$ ) von Hautproben (2, 5, 9 bzw. 12 Tage nach dem Trauma), die entweder von gesunden Probanden oder aber von Probanden stammen, die eine Acne inversa-Behandlung und sekundäre Wundheilung durchlaufen, wurden mit Antikörpern gegen die aufgelisteten Chemokinliganden und Chemokinrezeptoren gefärbt. Repräsentative Resultate von vier unterschiedlichen Donoren. +, schwache; ++, moderate; +++, starke Färbung.

### **3.5 Chemokine vermitteln Wundheilung von strukturellen Zellen *in vitro***

Der letzte Punkt in der Reihe der Fragen betrifft die Frage nach der Funktionalität der von den strukturellen Zellen exprimierten Chemokinrezeptoren. Um diese Frage zu beantworten wurden „Wound Repair“-Assays eingesetzt. In diesen Assays wurde die Antwort primärer Keratinozyten, dermaler Fibroblasten und dermaler Endothelzellen auf ein relevantes Chemokin *in vitro* beobachtet - d.h. der jeweilige Rezeptor wird von der Zielzelle exprimiert (siehe auch Abb. 11-13).

Für „Wound Repair“-Assays wurden humane primäre epidermale Keratinozyten, dermale Fibroblasten und dermale endotheliale Zellen in 24-Well Platten kultiviert und bis zur 80%igen Konfluenz gebracht. Das Medium wurde entfernt und eine einzelne definierte Wunde wurde mit einer sterilen Pipettenspitze in den intakten Monolayer gesetzt. Medium ohne oder mit einem relevantem Chemokin für die entsprechende Zielzelle wurde in drei verschiedenen Konzentrationen zu jedem Well hinzugefügt. Um die Beteiligung eines  $G_{(i)}\alpha$ -Protein gekoppelten Rezeptor-signalweges bei der Chemokin induzierten Wundheilung struktureller Zellen zu bestätigen, wurden die Zellen 10 bis 12 Stunden vor der Verwundung und Chemokinstimulation mit oder ohne Pertussis-Toxin (100 ng/ml) vorinkubiert.

Außerdem wurden in Wound-Repair-Assays mit primären Keratinozyten die Effekte von diversen Inhibitoren auf den Wundheilungsprozess untersucht. Der Zustand der Wunden wurde sofort und 8 bis 18 Stunden nach der Wundsetzung beobachtet. Hierbei standen die Methode des Endpunktassays mit dokumentierenden Bildern am Anfang und am Ende des Beobachtungszeitraums oder aber die sog. Time-Lapse

Video Mikroskopie, die eine kontinuierliche Dokumentation über den Versuchszeitraum ermöglicht, zur Wahl.

Primäre Keratinozyten in Kultur exprimieren CXCR1, CXCR3, CCR3, CCR4 und CCR6 auf ihrer Zelloberfläche. Entsprechend wurden die Liganden CCL17, CCL20, CXCL8 und CXCL10 untersucht. CCL20 und CXCL10 generierten bei Keratinozyten die stärkste von einem Chemokin induzierte Wundheilungsantwort, mit einem dosis abhängigen Wundverschluss nach 12 Stunden (Tabelle 3, Abb. 17). Schwächere, aber noch signifikante Reaktionen zeigten CXCL8 und CCL11. Die Stimulation von Keratinozyten mit dem CCR4 Liganden CCL17 führte nur zu einer variablen Stimulation des Heilungsprozesses (Tabelle 3). Keine Wundheilungsantwort wurde in kultivierten Keratinozyten für „irrelevante“ (d.h. für den Rezeptor negative) Liganden wie z.B. CXCL12 beobachtet.

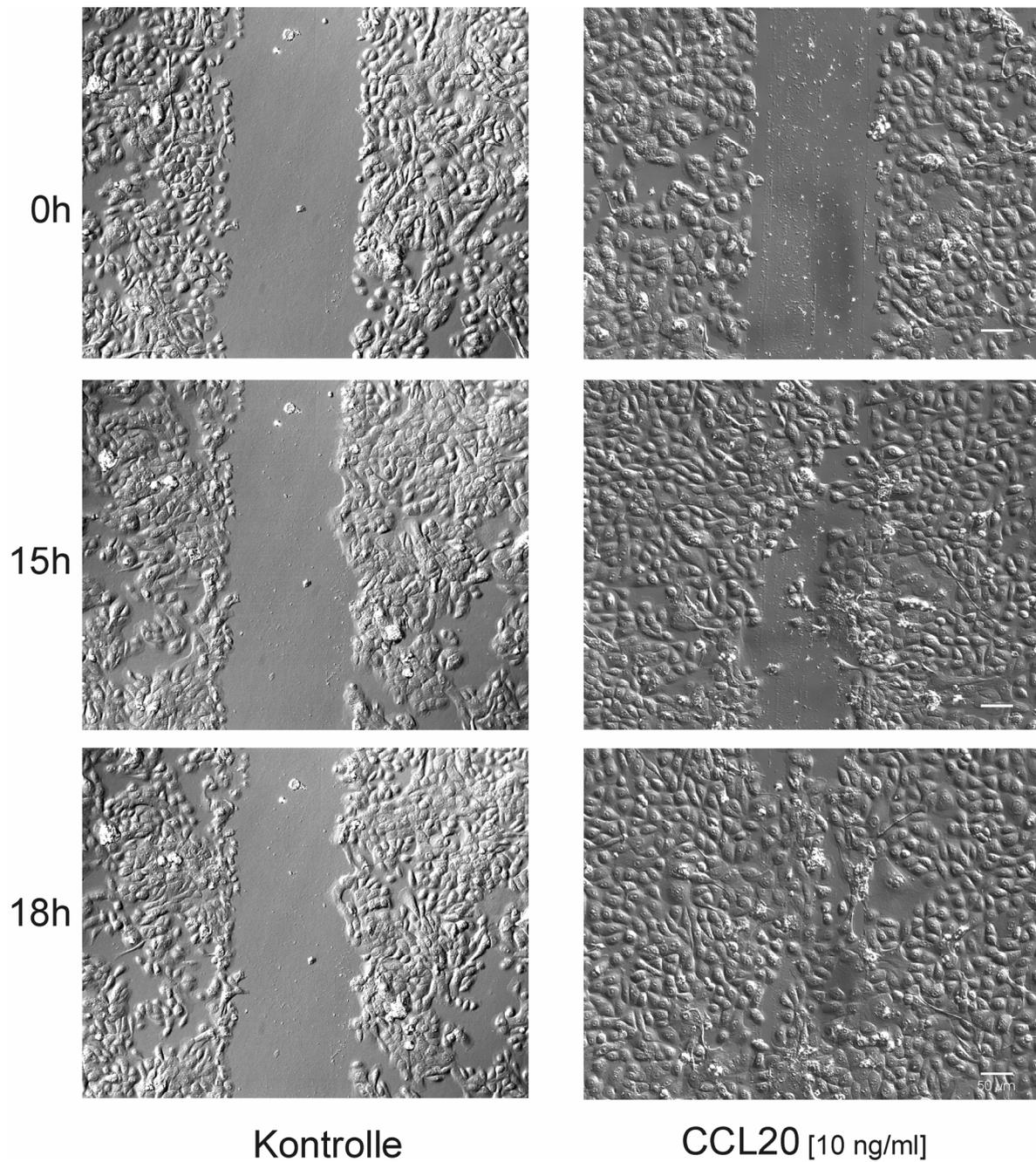
Die Time-lapse Video Mikroskopie der von CCL20 induzierten Wundheilung bei Keratinozyten zeigte, dass die Chemokinstimulation die Zellmotilität stark steigert, ein Clustering der Zellen am Wundrand induziert, die Formation einer „Leading-Edge“ auslöst und die Migration von Keratinozytenclustern in den Wundbereich unterstützt.

Dermale Fibroblasten exprimieren in Kultur CCR3, CCR4 und CCR10. Daher wurden die Liganden CCL11, CCL17, CCL26 und CCL27 im Assay untersucht. CCL11, CCL17, CCL26 (Abb. 18) und CCL27 induzierten eine signifikante Migration dermalen Fibroblasten in den Bereich der Wunde (Abb. 18, Tabelle 3), während das „irrelevante“ Chemokin CCL3 keine Antwort induzieren konnte.

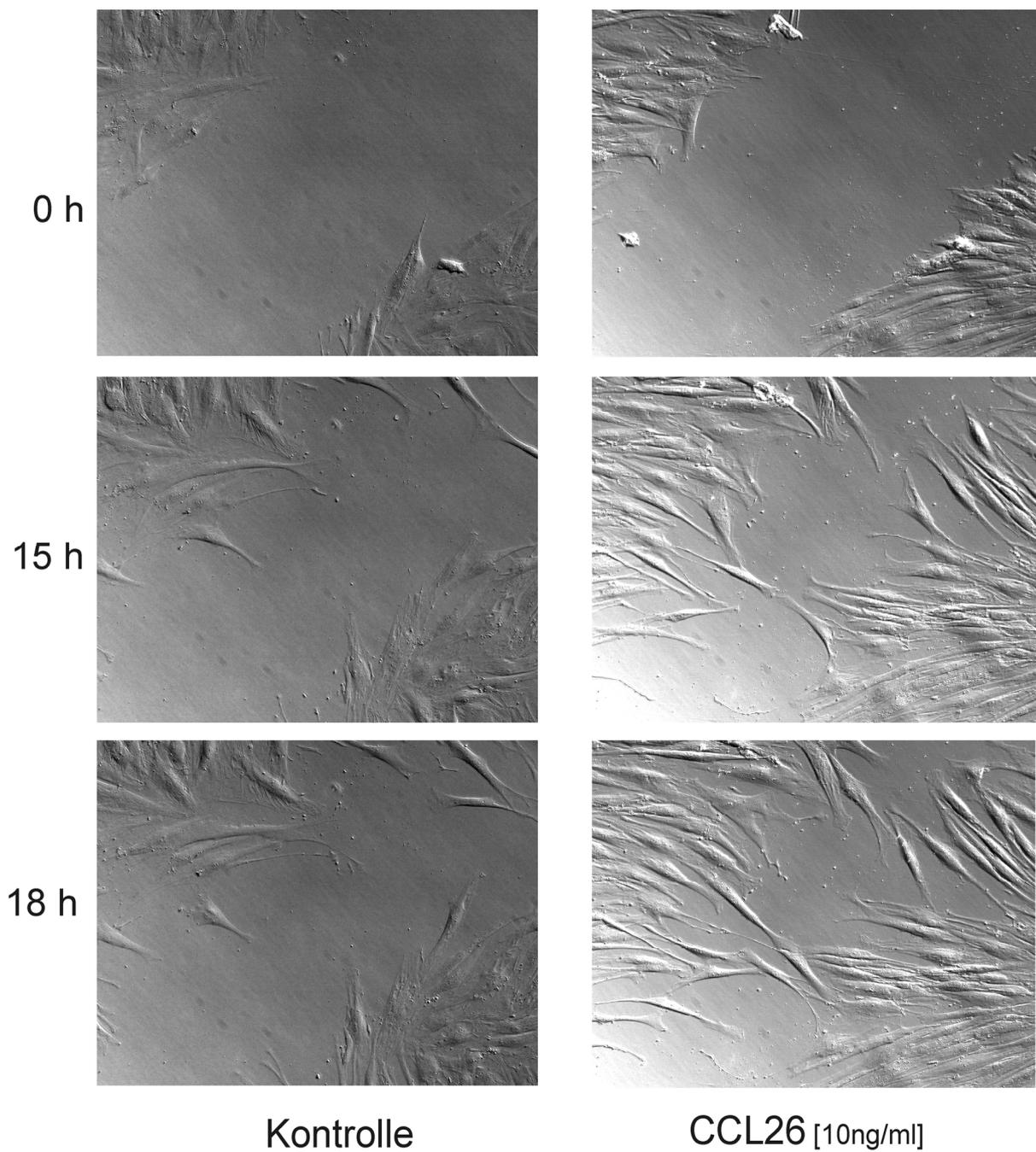
Mit den exprimierten Chemokinrezeptoren CCR3, CCR4, CCR6, CCR8, CCR9 und CCR10 sowie CXCR1, CXCR2 und CXCR3 zeigten kultivierte dermale

Endothelzellen das weiteste Spektrum an exprimierten Chemokinrezeptoren der strukturellen Zellen. Hier wurde die Wundheilung signifikant durch die Stimulation mit CCL1, CCL11 und CCL27 verstärkt (Tabelle 3). Unterschiedliche Resultate brachte eine Stimulation mit CXCL8. Obwohl dermale Endothelzellen auf ihrer Oberfläche signifikante Mengen an CCR6 und CXCR3 exprimieren, konnte eine Verstärkung der Wundheilung durch ihre Liganden CCL20 und CXCL10 nicht beobachtet werden (Tabelle 3).

Die Antwort der strukturellen Zellen auf die relevanten Chemokine war Pertussistoxin sensitiv, ein Indikator für einen  $G_{(i)}\alpha$ -Protein Rezeptor gekoppelten Signalweg für die Chemokin induzierte Wundheilung *in vitro* (Abb. 19a). Experimente mit dem Zell-Signaling Inhibitor Chelerythrin zeigten die Unabhängigkeit der von Chemokinen induzierten Wundheilung bei Keratinozyten von der  $\alpha$ -PKC-Aktivität (Abb. 19a). Im Gegensatz dazu zeigte der PI3-Kinase Inhibitor Ly294002 eine dosisabhängige Hemmung der Chemokin vermittelten Wundheilung (Abb. 19b). Die Behandlung der Keratinozytenkulturen mit  $\alpha$ -Amanitin oder Cycloheximid zeigte das basale Transkription und Translation einen Teil (30%) zur von Chemokinen vermittelten Wundheilung beitragen (Abb. 19a).



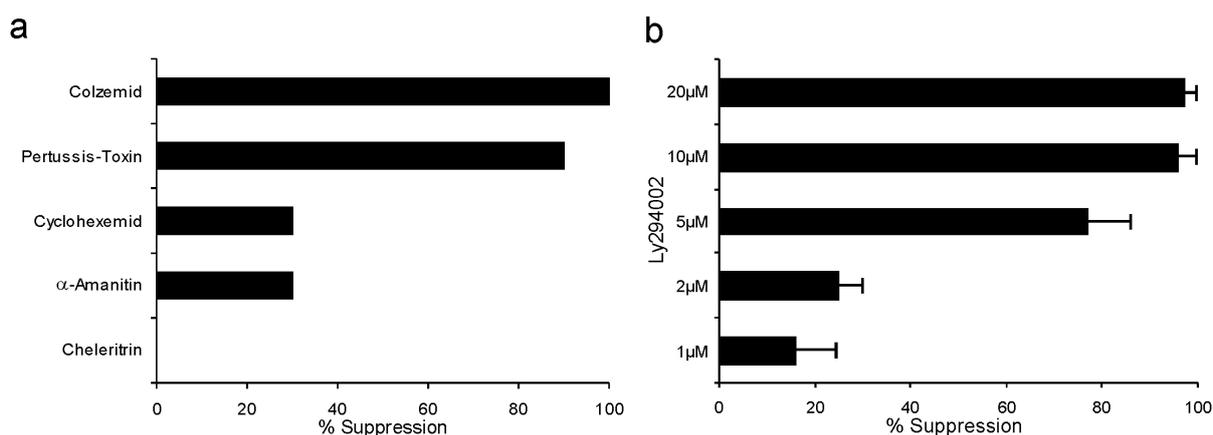
**Abb. 17:** Wundheilung einer einzelnen Wunde in einer konfluenten Kultur humaner primärer Keratinozyten in der Anwesenheit eines Chemokins (CCL20 mit 10 ng/ml) oder Medium allein. Aufnahme mit Hilfe der Time-lapse Video Mikroskopie über 18 Stunden nach der Verletzung des Monolayers. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.



**Abb. 18:** Wundheilung einer einzelnen Wunde in einer konfluenten Kultur humaner dermaler Fibroblasten in der Anwesenheit eines Chemokins (CCL26 mit 10 ng/ml) oder Medium allein. Aufnahme mit Hilfe der Time-lapse Video Mikroskopie über 18 Stunden nach der Verletzung des Monolayers.

**Tabelle 3:** Wundheilung einer einzelnen Wunde in einer konfluenten Kultur humaner primärer dermaler Endothelzellen, dermaler Fibroblasten bzw. epidermaler Keratinozyten in der Anwesenheit eines Chemokins oder Medium allein. Beobachtungszeit 12 bis 18 Stunden. (-, Verschuß der Wunde unter 10%; n.d., not determined; x, es wird kein Rezeptor für diesen Liganden exprimiert).

Chemokine <i>ng/ml</i>	Endothelzellen			Fibroblasten			Keratinozyten		
	10	100	500	10	100	500	10	100	500
CCL1/ <i>I-309</i>	39%	46%	61%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CCL3/ <i>MIP-1<math>\alpha</math></i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x
CCL11/ <i>eotaxin</i>	-	52%	100%	30%	36%	54%	n.d.	n.d.	n.d.
CCL17/ <i>TARC</i>	-	-	-	51%	67%	54%	-	74%	44%
CCL20/ <i>MIP-3<math>\alpha</math></i>	-	-	-	x	x	x	100%	88%	62%
CCL26/ <i>MIP-3<math>\alpha</math></i>	n.d.	n.d.	n.d.	70%	34%	-	-	-	-
CCL27/ <i>CTACK</i>	-	41%	100%	100%	77%	53%	-	-	-
CXCL8/ <i>IL-8</i>	38%	-	-	x	x	x	47%	81%	72%
CXCL10/ <i>IP-10</i>	-	-	-	x	x	x	-	18%	83%



**Abb. 19:** (a) Suppression der von Chemokinen geförderten Wundheilung durch verschiedene Inhibitoren. (b) Dosisabhängige Suppression der von Chemokinen geförderten Wundheilung durch den PI3-Kinase-Inhibitor Ly294002.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die potentielle Rolle von Chemokinen als mögliche Mediatoren des Wundheilungsprozesses neben Zytokinen, Wachstumsfaktoren Adhäsionsmolekülen und der extrazellulären Matrix<sup>8,9</sup> untersucht.

Ausgehend von der Beobachtung, dass Chemokine die am stärksten exprimierten Gene während des kutanen Wundheilungsprozesses stellen, wurde ihr zellulärer Ursprung bestimmt, ihre Regulation durch primäre proinflammatorische Proteine untersucht und ihre putative Funktion und Interaktion bestimmt.

Die gewonnenen Ergebnisse lassen auf ein komplexes Zusammenspiel von Leukozyten und strukturellen Zellen schließen, dessen Schlüsselmediator die Interaktion von Chemokinliganden mit ihren entsprechenden Rezeptoren ist.

Der Prozess der Wundheilung kann in drei ineinander übergehende Phasen unterteilt werden. Zu ihnen gehören die Phase der Entzündungsreaktion, die Phase der Proliferation und die Phase der Remodellierung<sup>8,9</sup>. Innerhalb von wenigen Stunden nach dem Trauma wandern Neutrophile in den Wundbereich ein, um die Wunde von fremden und möglicherweise infektiösen Partikeln zu säubern<sup>8,9,57</sup>. Den Neutrophilen folgen Monozyten, die zu aktivierten Makrophagen differenzieren. Diese geben eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie z.B. Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF) und Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) ab, die zusammen mit Chemoattraktanten die Bildung des Granulationsgewebes beginnen<sup>8,9,57</sup>.

Eine wichtige Rolle beim Übergang von der Endzündungsphase zur Phase der Gewebereparatur wird den Makrophagen zugeschrieben. Die von ihnen ausgeschütteten Faktoren sind essentiell für den geordneten Verlauf der Wund-

heilung. Im Tiermodell konnte an Tieren mit Makrophagenmangel eine krankhafte Veränderung der Wundheilung beobachtet werden<sup>12</sup>.

In den Focus für die Regulation der Monozyten/Makrophagen-Einwanderung rückten Chemokine wie CCL3, CCL4, CCL2 und CCL5 und die entsprechenden Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR3 und CCR5<sup>2,3,31</sup>. Bei der Untersuchung von wundassoziierten CD68<sup>+</sup> Makrophagen in der murinen wie auch der humanen Wundheilung konnte die starke Expression von CCL2, CCL3 und CCL4 während der inflammatorischen Phase ebenso bestätigt werden<sup>57</sup>, wie eine damit korrespondierende Expression ihrer wichtigsten Rezeptoren CCR1 und CCR2.

Ein bemerkenswertes Muster war bei der Untersuchung der CCR2-Expression auf wundassoziierten CD68<sup>+</sup> Makrophagen mit Antikörpern gegen zwei Isoformen von CCR2 zu beobachten. Während anti-CCR2b bevorzugt Makrophagen färbte, konnte eine Färbung mit anti-CCR2a ausschließlich an Endothelzellen beobachtet werden. Die Resultate von Tanaka et al.<sup>58</sup>, nach denen CCR2b eine zehnfach höhere Expression auf Monozyten aufweist als CCR2a, unterstützen diese Beobachtung. CCR2a, nicht aber CCR2b, wird in Gefäßwänden exprimiert, wie Studien zu entzündlichen Myopathien zeigen<sup>59</sup>.

Transfektionsstudien in Jurkat-Zellen ergaben außerdem Hinweise auf verschiedene Signalwege der beiden Isoformen. Die CCR2b Isoform mit dem längeren Carboxy-Terminus führt im Gegensatz zur CCR2a Isoform zu einem Ca<sup>2+</sup> Signal. Beide Isoformen sind aber in der Lage, eine migratorische Antwort zu induzieren<sup>60</sup>.

Chemokinrezeptor-Isoformen wie diese, die unterschiedlich exprimiert werden und an gemeinsame und getrennte Signalwege gekoppelt sind, könnten zu der heutigen

Vielfalt der von Chemokinen beeinflussten Vorgänge geführt haben.

Unsere Beobachtungen lassen zudem den Schluss zu, dass andere Chemoattraktanten für Monozyten und Makrophagen wie z.B. CCL1 und CXCL12 in die Rekrutierung von CCR8- und CXCR4-positiven Makrophagen bzw. dendritischen Zellen während der Entzündung und dem dann folgenden Übergang in die Gewebeformationsphase der kutanen Wundheilung eingebunden sein könnten, denn kutane Makrophagen und dendritische Zellen produzieren während der Wundheilung neben Wachstumsfaktoren auch eine große Menge an Chemokinliganden. Im humanen Modell produzieren Makrophagen und dendritische Zellen im Wundbereich große Mengen an CCL18, CXCL9 und CXCL12. Frühere Ergebnisse in der Arteriosklerose und in Lungenkrankheiten zeigen eine starke CCL18 Expression von lesionalen Makrophagen und dendritischen Zellen<sup>61, 62, 63</sup>.

Den Makrophagen folgen am Tag 2 bis 3 nach der Verletzung Lymphozyten in den Wundbereich. Sie verbleiben im Gegensatz zu Neutrophilen und Makrophagen, die nach der Formation des Granulationsgewebes größtenteils verschwinden, über den gesamten Wundheilungsprozess in der demarkierenden Zone. Während der Entzündungsphase und der Gewebeformationsphase ist in Lymphozyten eine große Anzahl von Chemoattraktanten wie CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL11, CCL18, CCL20, CCL24, CCL27, CXCL9, CXCL10, CXCL12, und XCL1 aktiv. Entsprechend dazu kann eine starke Expression von CCR2, CCR3, CCR6, CCR8, CCR10, CXCR3 und CXCR4 auf der Oberfläche von CD3<sup>+</sup> Lymphozyten beobachtet werden. Damit wird ein multipler und redundanter Satz an Mechanismen zur Verfügung gestellt, um Lymphozyten in den Bereich einer Wunde und der

Gewebereparatur zu bringen. Neben ihrer angestammten Wächterfunktion für das Immunsystem können Lymphozyten auch während der Gewebeformation und Gewebereorganisation Funktionen übernehmen. Diese sind aber weitgehend unbekannt. So können CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten während der kutanen Wundheilung hauptsächlich in perivaskulären Taschen in der Nähe von einwandernden Blutgefäßen beobachtet werden. Das spricht für eine Rolle der CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten bei der Unterstützung der endothelialen Zellproliferation, -migration und -invasion.

Mit dem Beginn der Reepitheliasation des Wundbettes, ein Vorgang, der nur wenige Stunden nach dem Trauma beginnt<sup>8, 9</sup>, ist eine deutliche Veränderung des Phänotyps der am Wundrand befindlichen Keratinozyten zu beobachten. Sie reorganisieren ihr Zytoskelett, lösen die intrazellulären Desmosomen auf, verlieren ihre hemidesmosomalen Verbindungen zwischen der Dermis und der Epidermis und verstärken die Expression ihrer Integrinrezeptoren<sup>8, 9</sup>. Zusammengenommen ermöglichen all diese Vorgänge die Einwanderung der Keratinozyten entlang des lebenden Gewebes in das Wundbett, wobei die grundlegenden Stimuli, die die Migration der Keratinozyten während der Formation der Neo-Epidermis steuern, bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Die *in vitro* Ergebnisse zeigen aber, dass humane primäre Keratinozyten funktionell aktive Chemokinrezeptoren exprimieren. So konnten CCR3, CCR4, CCR6, CXCR1, CXCR2 und CXCR3 auf ihrer Zelloberfläche identifiziert werden. Die Liganden zu den entsprechenden Rezeptoren beschleunigen signifikant die Migration von Keratinozyten und unterstützen die Wundheilung *in vitro*. Auch konnte die Expression der Chemokinrezeptoren von Keratinozyten während der sekundären Wundheilung *in vivo* bestätigt werden. Hier

zeigten sich verschiedene wichtige Chemokinliganden-Chemokinrezeptoren-Kombinationen während der Reepithelisation. In der gesunden Haut exprimieren Keratinozyten große Mengen an CXCR3 auf ihrer Zelloberfläche. Da aber suprabasale Keratinozyten des Stratum spinosum oder Stratum granulosum die CXCR3 Expression verlieren, scheint die CXCR3 Expression von Keratinozyten differenzierungsabhängig zu sein. Im Gegensatz dazu zeigen differenzierende Keratinozyten *in vivo* eine CXCR4 Expression. Überraschenderweise zeigten alle in das Wundbett migrierenden und die Neo-Epidermis formierenden Keratinozyten eine CXCR3 Expression und standen in enger räumlicher Nähe zu CXCL9 exprimierenden Makrophagen.

CCR6 ist ein weiterer Rezeptor, der in basalen Keratinozyten in markanter Weise exprimiert und in der neo-Epidermis hochreguliert wird. Dieser Umstand könnte auf mögliche CCL20-CCR6 Interaktionen im Prozess der Reepitheliasation hindeuten. Auch Charbonnier et al. wiesen in immunhistologischen Studien bei Keratinozyten eine CCR6 Expression nach<sup>64</sup>. Die biologische Funktion konnten sie jedoch nicht ergründen<sup>64</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aktivierung von CCR6 die Fähigkeit von Keratinozyten *in vitro* stark verbessert, eine Wunde zu schließen. Die reichliche Expression von CCL20 *in vivo* könnte weiter ein Beleg für eine CCL20-CCR6 Interaktion bei der Wiederherstellung der epithelialen Oberfläche sein. Die molekularen Mechanismen, die der von Chemokinen induzierten Wundheilung z.B. bei Keratinozyten zu Grunde liegen, sind unklar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die von CCR6 vermittelte Migration und

Wundheilung bei Keratinozyten auf grundlegenden Transkriptionsvorgängen und einer Neuordnung des Zytoskeletts beruht und von Pertussistoxin sensitiven  $G_{\alpha_i}$ -Protein und PI3K-Signalwegen abhängig ist. Diese Beobachtungen an strukturellen Zellen der Haut stehen im Einklang mit Ergebnissen von Dumstrei et al., die in einer Studie zeigen konnten, dass die Wanderung der unreifen Keimzellen beim Zebrafisch ebenfalls von  $G_{\alpha_i}$ -Protein und PI3K-Signalwegen abhängig ist<sup>65</sup>.

Die Keratinozyten des Wundrandes beginnen einen bis zwei Tage nach dem Trauma<sup>8, 9</sup> zu proliferieren und sind stark CXCR4 positiv. CXCR4-positive proliferierende Keratinozyten konnten in anatomischer Nähe zu CXCL12-exprimierenden  $CD68^+$ -dermalen Makrophagen und dendritischen Zellansammlungen am Wundrand und in der Nähe der neo-Epidermis nachgewiesen werden. Die für die Wegfindung verantwortlichen basalen Keratinozyten der Neo-Epidermis sind eine starke Quelle für CCL27. Die Expression von CCL27 durch Keratinozyten in der neo-Epidermis wird durch  $CCR10^+/CD68^+$ -Leukozyten flankiert. Sie interagieren möglicherweise mit in die Wunde einwandernden  $CCR10^+/CD31^+$ -Endothelzellen.

CCL27 steigert *in vitro* die Fähigkeit von Endothelzellen und Fibroblasten deutlich, eine Wunde zu schließen. Dies ist ein möglicher Indikator für eine CCL27/CCR10 Interaktion in der Homeostase und während der Gewebereperatur.

Die die neo-Epidermis bildenden Keratinozyten und dermale Endothelzellen exprimieren in hohem Maße CXCL8. Zusammen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen legen diese Beobachtungen nahe, dass CXCL8-CXCR2 Interaktionen eine Rolle bei der Migration und Proliferation von Keratinozyten über autokrine und heterokrine Schleifen spielen<sup>66, 10, 67</sup>. So zeigen CXCR2-defiziente

Mäuse signifikante Verzögerungen bei der Wundheilung einschließlich der Epithelialisation und eine verringerte neo-Vaskularisation<sup>67</sup>. Diese Chemokin-liganden-Chemokinrezeptor-Interaktionen scheinen als Koordinator der Re-Epitheliasation kutaner Wunden zu arbeiten. Darauf deuten die *in vitro* und *in vivo* gewonnenen Ergebnisse hin. CCL18 galt bis jetzt als ein von Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniertes Chemokin<sup>61, 62, 63</sup>. Nur eine Studie von Pardo et al. zeigte die Expression von CCL18 in epithelialen Zellen der Lunge<sup>62</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke CCL18 Expression auch in suprabasalen Keratinozyten der neo-Epidermis gezeigt werden. Dieser Befund könnte einen Einfluss auf die Identifizierungsstrategien für weitere CCL18-positive Zellen und die mögliche Charakterisierung des noch immer unbekanntes Rezeptors für CCL18 haben.

Etwa vier Tage nach der Verletzung wandert das Granulationsgewebe in das Wundbett ein. Die Fibroblasten beginnen mit der Produktion einer provisorischen Matrix, die aus Fibrin, Fibronectin und Hyaluronsäure besteht. Sie ist die Grundlage für die Einwanderung von Zellen<sup>8, 9</sup>. Die Einwanderung von Zellen in diese Matrix setzt proteolytische Fähigkeiten voraus, die von Matrix-Metalloproteinasen wie Plasmin, Plasminaktivator, Kollagenase, Gelatinase A und Stromolysin zu Verfügung gestellt werden. Diese werden in den Tagen zwei bis fünf nach der Verletzung hochreguliert und schneiden einen Weg für die einwandernden Zellen frei.

Die Induktion von Matrix-Metalloproteinasen durch CCL2 wird in früheren Studien in dermalen Fibroblasten gezeigt<sup>68</sup>. Obwohl keine signifikante CCR2 oder CCR5 Expression bei kultivierten Fibroblasten festgestellt werden konnte, zeigten die in

Ergebnisse *in vitro*, dass primäre dermale Fibroblasten deutlich CCR3, CCR4 und CCR10<sup>22</sup> exprimieren. Diese Ergebnisse korrespondierten mit der verstärkten Fähigkeit der Wundreparatur bei Stimulation mit deren Liganden. Eine ganze Reihe von CCR3-Liganden wie CCL5, CCL7, CCL11 und CCL24 wurden während der kutanen Wundheilung hochreguliert. Dies kann bedeuten, dass diese Rezeptor-Liganden-Interaktionen eine Rolle sowohl in der Biologie der Fibroblasten als auch in der Phase der Gewebeformation während der Wundheilung spielen.

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der nicht nur die extrazelluläre Matrix des Wundbetts benötigt, sondern auch auf Zellmigration und mitogene Stimulation von Endothelzellen angewiesen ist. In den letzten Jahren konnte eine ganze Reihe an Faktoren identifiziert werden, die Angiogenese induzieren. Zu ihnen gehören z.B. basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Vascluar Endothelial Growth Factor (VEGF), Transforming Growth Factor- $\beta$ , (TGF- $\beta$ ), Angiogenin, Angiotropin, Angiopoietin-1, Trombospondin, ein geringer Sauerstoffspiegel und ein erhöhter Milchsäurespiegel.

Ein Fokus in der Chemokinforschung richtete sich auf die Wirkung von Chemokinen bei der Angiogenese. Einige Mitglieder der CXC- und nach neuerer Forschung auch der CC-Chemokin-Familie induzieren Endothelzellen-Migration *in vitro* und Angiogenese *in vivo* <sup>10, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76</sup>.

Da gezeigt werden konnte, dass angiogenetische Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF die Chemokinrezeptorexpression auf Endothelzellen regulieren können, kann ein komplexer Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktoren und Chemokinen während der Angiogenese angenommen werden<sup>71</sup>.

Hier konnte gezeigt werden, dass humane dermale Endothelzellen *in vitro* mit CCR3,

CCR4, CCR6, CCR10, CXCR2 und CXCR3 ein eigenes Muster an Chemokinrezeptoren exprimieren. Eine signifikante Verbesserung der Wundheilung von kultivierten Endothelzellen konnte durch Stimulation mit den Liganden CCL1, CCL11, CCL27 und CXCL8 erreicht werden. Im Gegensatz dazu führt ein anderer Satz von Chemokinen wie CCL17, CCL20 und CXCL10 zu keiner Verbesserung der Wundheilung, obwohl deren Rezeptoren ebenfalls reichlich auf der Endothelzelloberfläche exprimiert wurden. Für Liganden von CXCR3, wie z.B. CXCL9, CXCL10 und CXCL11 gibt es immer mehr Hinweise, dass diese Mitglieder der Chemokinsuperfamilie Angiogenese über ihren geteilten Rezeptor CXCR3 induzieren können<sup>77, 78, 79</sup>. Endothelzellen, die *in vivo* in das Wundbett einwandern, exprimieren in hohem Maße CCR2, CCR3, CCR6, CCR8, CCR10, CXCR1 und CXCR2. Sie konnten in einem nahen zeitlich-räumlichen Verhältnis zu ihren -von in die Wunde einwandernden Leukozyten oder strukturellen Zellen exprimierten-Liganden beobachtet werden. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Chemokinrezeptor-Liganden-Interaktionen eine Rolle im Prozess der Gewebeformation und der Angiogenese über multiple, wahrscheinlich auch redundante Mechanismen spielen. Bernardini et al. und Haque et al. konnten zeigen, dass der CCR8 Ligand CCL1 an Endothelzellen bindet, Chemotaxis und Invasion der Zellen stimuliert, *in vitro* die Differenzierung von humanen umbilicalen Venen Zellen in kapillar ähnliche Strukturen verstärkt und die Angiogenese *in vivo* induziert<sup>74, 75</sup>. Es wurde schon früher berichtet, dass Chemokine mit dem angiogenetischen ELR-Motiv wie z.B. CXCL8 während der inflammatorischen und Gewebeformationsphase exprimiert werden, während ELR-Motiv negative angiostatische Chemokine, wie CXCL10, erst später im Wundheilungsprozess auftauchen und die Phase der

Geweberemodellierung dominieren<sup>10</sup>. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass beide Faktoren, sowohl die angiogenetischen wie auch die angiostatischen, während aller Phasen des kutanen Wundheilungsprozesses anwesend sind und legen eine komplizierte Balance und Regulation zwischen den beiden wiederstrebenden Faktoren nahe.

Zusammengenommen zeigten diese Ergebnisse die wichtige Rolle die Chemokine während der komplexen Abläufe im Prozess der kutanen Wundheilung.

Sie unterstreichen das zentrale Muster, dass eine Hautverletzung mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine beginnt, diese zur Rekrutierung von Leukozyten führt und weiter zur Produktion von Wachstumsfaktoren geht. Andererseits könnte die Wachstumsfaktorproduktion durch Leukozyten und strukturelle Zellen zusammen mit der Steuerung durch Chemokine die dynamischen Prozesse der Wundheilung wie Migration, Invasion und Proliferation von parenchymalen Zellen leiten.

Abschließend ermöglichen die Ergebnisse dieser Arbeit ein besseres Verständnis der grundlegenden Mechanismen der kutanen Wundheilung und haben möglicherweise Einfluss auf die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Behandlung von Wundheilungsstörungen wie z.B. chronischen Ulcera.

## 5 Zusammenfassung

Wundheilung ist ein dynamischer Prozess, in dem die gerichtete Migration von Leukozyten und von strukturellen Zellen eine wichtige Rolle spielt. Chemokine sind für ihre Kontrolle migratorischer Prozesse bekannt. Diese Superfamilie chemoattraktiver Proteine gehört zu den ersten, die auf der molekularen Ebene vollständig charakterisiert wurden. Obwohl ihre entscheidende Rolle bei der gerichteten Migration von Leukozytenpopulationen schon lange bekannt ist, liegen über ihre Funktion während der Geweberegeneration nur sehr wenige Erkenntnisse vor.

Die quantitative real-time PCR Analyse wurde mit einem murinen Wundheilungsmodell benutzt, um einen ersten „globalen“ Überblick über mehr als 100 am Wundheilungsprozess beteiligte Gene zu bekommen. Flowzytometrische Analysen wurden zur Aufklärung des Verteilungsmusters von Chemokinrezeptoren auf humanen primären strukturellen Zellen eingesetzt. Um die Funktionalität, der von humanen primären strukturellen Zellen exprimierten Chemokinrezeptoren zu untersuchen, wurden *in vitro* „Wound repair“ Assays eingesetzt. Immunhistochemie diente zur Identifizierung der zeitlichen und räumlichen Verteilung von Chemokinrezeptoren und ihrer korrespondierenden Liganden während der Phasen der kutanen Wundheilung.

Unter allen bekannten Chemokinrezeptoren zeigen humane Keratinozyten (CCR4, CCR6, CCR9, CXCR1, CXCR2 und CXCR3), Fibroblasten (CCR3, CCR4 und CCR10) und Endothelzellen (CCR3, CCR4, CCR6, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3 und CXCR4) ein eindeutiges und funktionell aktives Rezeptorrepertoire auf ihrer Zelloberfläche. Chemokine sind in der Lage, über ihre

$G\alpha_{(i)}$  Protein gekoppelten Rezeptoren auf strukturellen Zellen die *in vitro* „Wound Repair“ PI3K abhängig signifikant zu steigen. Die anfangs im Mausmodell gemachten Beobachtungen konnten durch die Ergebnisse im humanen kutanen Wundheilungsverlauf bestätigt werden und zeigen die große zeitliche und räumliche Nähe der Expression von Chemokinliganden zu den entsprechenden Chemokinrezeptor-positiven Zielzellen während der Phasen der kutanen Wundheilung.

In dieser ersten umfassenden Analyse der kutanen Wundheilung konnte gezeigt werden, dass eine Gruppe von Chemokinen zu den am höchsten regulierten Genen gehört, verglichen mit Genen von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und Matrix-Metalloproteinasen. Diese Ergebnisse geben nicht nur einen Einblick in das komplexe Chemokinnetzwerk während der kutanen Wundheilung, sondern deuten auch neue Strategien bei der Behandlung von Wundheilungsstörungen an.

## 6 Abstract

Wound healing represents a dynamic process involving directional migration of leukocytes and structural cells. Chemokines control migratory processes and this superfamily of chemoattractive proteins is among the first complete protein families to be identified at the molecular level. Although their critical role in leukocyte trafficking has recently been identified, very little is known about their function in tissue repair.

We used quantitative real-time PCR analyses in a mouse model to get a “global view” over more than 100 genes involved in the wound healing process. Flow cytometry was performed to show the distribution of chemokine receptors on human primary cells. *In vitro* wound repair assay were used to show the functionality of the chemokine receptors expressed on human primary structural cells. Immunohistochemistry was performed to elucidate the particular temporal-spatial distribution of chemokine receptors and their corresponding ligands during the phases of cutaneous wound healing.

Among all known chemokine receptors, human keratinocytes (CCR4, CCR6, CCR9, CXCR1, CXCR2, CXCR3), fibroblasts (CCR3, CCR4, CCR10) and endothelial cells (CCR3, CCR4, CCR6, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4) express a distinct and functionally active receptor repertoire on their cell surface. Signaling through  $G\alpha_{(i)}$  protein-coupled chemokine receptors on structural cells markedly enhances *in vitro* wound repair in a PI3K-dependent manner. Observations in mice parallel findings during human cutaneous wound healing demonstrating the temporal-spatial expression of chemokine ligands in close proximity to chemokine receptor-positive target cells.

This first comprehensive, time-course analysis of cutaneous wound healing showed that a subset of chemokines is among the most highly regulated genes in comparison to other cytokines, growth factors, adhesion molecules and matrix-metalloproteinases. These findings not only provide insights into the chemokine networks during cutaneous wound healing but also suggest novel strategies for the treatment of wound healing disorders.

## 7 Lebenslauf

**Name** Erich Bünemann, geb. Koschorek

Geburtsdatum 13. August 1965

Geburtsort Hagen, jetzt Hagen a.T.W.

Familienstand verheiratet, 3 Kinder

Staatsangehörigkeit deutsch

### Schulbildung

1972-1975 Grundschule Hagen, Hagen a.T.W.

1976-1977 Orientierungsstufe Oesede, Georgsmarienhütte

1978-1980 Gymnasium Oesede, Georgsmarienhütte

1981-1986 Gymnasium Angelaschule, Osnabrück

### Dienste

09/1986-10/1990 Bundeswehr – München, Osnabrück, Ulm, München, Ulm

### Hochschulbildung

10/1990-05/1997 Studium der Biologie an der Universität Osnabrück, Osnabrück; Abschluss: Diplom

05/1997-02/1999 Promotionsstudium am Institut für Neurophysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

03/1999-04/2007 Promotionsstudium in der Hautklinik des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

## 8 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Lever, W. F. (1984). "Histopathology of the skin." 6<sup>th</sup> Edition.
- <sup>2</sup> Bowden, P. E., H. J. Stark, *et al.* (1987). "Expression and modification of keratins during terminal differentiation of mammalian epidermis." *Curr Top Dev Biol* 22: 35-68.
- <sup>3</sup> Fuchs, E. (1990). "Epidermal differentiation: the bare essentials." *J Cell Biol* 111(6 Pt 2): 2807-14.
- <sup>4</sup> Teraki, Y. und T. Shiohara (1999). "Apoptosis and the skin." *Eur J Dermatol* 9(5): 413-25; quiz 426.
- <sup>5</sup> Wehrli, P., I. Viard, *et al.* (2000). "Death receptors in cutaneous biology and disease." *J Invest Dermatol* 115(2): 141-8.
- <sup>6</sup> Jung, E. G., Ed. (1995). *Dermatologie*. Stuttgart, Hippokrates Verlag.
- <sup>7</sup> Militzer, K. (1982). *Haut und Hautanhangsorgane kleiner Laboratoriumssäugetiere*. Teil I: Vergleichende Morphologie der Haut und Haare von Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen. Berlin und Hamburg, Verlag Paul Parey.
- <sup>8</sup> Martin, P. (1997). "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration." *Science* 276(5309): 75-81.
- <sup>9</sup> Singer, A. J. und R. A. Clark (1999). "Cutaneous wound healing." *N Engl J Med* 341(10): 738-46.
- <sup>10</sup> Engelhardt, E., A. Toksoy, *et al.* (1998). "Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing." *Am J Pathol* 153(6): 1849-60.
- <sup>11</sup> Sunderkotter, C., K. Steinbrink, *et al.* (1994). "Macrophages and angiogenesis." *J Leukoc Biol* 55(3): 410-22.
- <sup>12</sup> Leibovich, S. J. und D. M. Wiseman (1988). "Macrophages, wound repair and angiogenesis." *Prog Clin Biol Res* 266: 131-45.
- <sup>13</sup> Blotnick, S., G. E. Peoples, *et al.* (1994). "T lymphocytes synthesize and export

heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8): 2890-94.

- <sup>14</sup> Hunt, T. K., Ed. (1980). *Wound Healing and wound infection: theory and surgical practice*. New York, Appleton-Century-Crofts.
- <sup>15</sup> Welch, M. P., G. F. Odland, *et al.* (1990). "Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction." *J Cell Biol* 110: 133-45.
- <sup>16</sup> Zlotnik, A., O. Yoshie, *et al.* (2006). "The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution." *Genome Biol* 7(12): 243.
- <sup>17</sup> Baggiolini, M., B. Dewald, *et al.* (1994). "Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines." *Adv Immunol* 55: 97-179.
- <sup>18</sup> Baggiolini, M., B. Dewald, *et al.* (1997). "Human chemokines: an update." *Annu Rev Immunol* 15: 675-705.
- <sup>19</sup> Luster, A. D. (1998). "Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation." *N Engl J Med* 338(7): 436-445.
- <sup>20</sup> Hasegawa, H. und S. Fujita (2001). "Chemokines and lymphocytes: Role of chemokines and their receptors in the immune system." *Cell Mol Biol* 47(4): 599-607.
- <sup>21</sup> Broxmeyer, H. E. (2001). "Regulation of hematopoiesis by chemokine family members." *Int. J. Hematol.* 4(1): 9-17.
- <sup>22</sup> Homey, B., H. Alenius, *et al.* (2002). "CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation." *Nat Med* 8(2): 157-65.
- <sup>23</sup> Muller, A., B. Homey, *et al.* (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* 410(6824): 50-6.
- <sup>24</sup> Clark-Lewis, I., K. S. Kim, *et al.* (1995). "Structure-activity relationships of chemokines." *J Leukoc Biol* 57(5): 703-11.
- <sup>25</sup> Baggiolini, M. (2001). "Chemokines in pathology and medicine." *J. Intern. Med.* 250(2): 91-104.

- <sup>26</sup> Kelner, G. S., J. Kennedy, *et al.* (1994). "Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine." *Science* 266(5189): 1395-9.
- <sup>27</sup> Kennedy, J., G. S. Kelner, *et al.* (1995). "Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin." *J Immunol* 155(1): 203-9.
- <sup>28</sup> Bazan, J. F., K. B. Bacon, *et al.* (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." *Nature* 385(6617): 640-4.
- <sup>29</sup> Pan, Y., C. Lloyd, *et al.* (1997). "Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation." *Nature* 387(6633): 611-7.
- <sup>30</sup> Homey, B. und A. Zlotnik (1999). "Chemokines in allergy." *Curr Opin Immunol* 11(6): 626-34.
- <sup>31</sup> Zlotnik, A. und O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." *Immunity* 12(2): 121-7.
- <sup>32</sup> IUIS/WHO\_Subcommittee\_on\_Chemokine\_Nomenclature (2002). "Chemokine/chemokine receptor Nomenclature." *J. Immunol. Methods* 262(1-2): 1-3.
- <sup>33</sup> Holmes, W. E., J. Lee, *et al.* (1991). "Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor." *Science* 253(5025): 1278-80.
- <sup>34</sup> Murphy, P. M. und H. L. Tiffany (1991). "Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor." *Science* 253(5025): 1280-3.
- <sup>35</sup> Horuk, R. (1994). "The interleukin-8-receptor family: from chemokines to malaria." *Immunol Today* 15(4): 169-74.
- <sup>36</sup> Murphy, P. M. (1994). "The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors." *Annu Rev Immunol* 12: 593-633.
- <sup>37</sup> Crump, M. P., J. H. Gong, *et al.* (1997). "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1." *Embo J* 16(23): 6996-7007.
- <sup>38</sup> Chakravarty, L., L. Rogers, *et al.* (1998). "Lysine 58 and histidine 66 at the C-terminal alpha-helix of monocyte chemoattractant protein-1 are essential for glycosaminoglycan binding." *J Biol Chem* 273(45): 29641-7.
- <sup>39</sup> Amara, A., O. Lorthioir, *et al.* (1999). "Stromal cell-derived factor-1alpha associates

with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine." *J Biol Chem* 274(34): 23916-25.

- <sup>40</sup> Webb, L. M., M. U. Ehrengruber, *et al.* (1993). "Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(15): 7158-62.
- <sup>41</sup> Middleton, J., S. Neil, *et al.* (1997). "Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells." *Cell* 91(3): 385-95.
- <sup>42</sup> Bowman, E. P., J. J. Campbell, *et al.* (1998). "Regulation of chemotactic and proadhesive responses to chemoattractant receptors by RGS (regulator of G-protein signaling) family members." *J Biol Chem* 273(43): 28040-8.
- <sup>43</sup> Shi, G. X., K. Harrison, *et al.* (2002). "RGS13 regulates germinal center B lymphocytes responsiveness to CXC chemokine ligand (CXCL)12 and CXCL13." *J Immunol* 169(5): 2507-15.
- <sup>44</sup> Lippert, E., D. L. Yowe, *et al.* (2003). "Role of regulator of G protein signaling 16 in inflammation-induced T lymphocyte migration and activation." *J Immunol* 171(3): 1542-55.
- <sup>45</sup> del Pozo, M. A., M. Nieto, *et al.* (1998). "The two poles of the lymphocyte: specialized cell compartments for migration and recruitment." *Cell Adhes Commun* 6(2-3): 125-33.
- <sup>46</sup> Laudanna, C., J. Y. Kim, *et al.* (2002). "Rapid leukocyte integrin activation by chemokines." *Immunol Rev* 186: 37-46.
- <sup>47</sup> Laudanna, C., J. J. Campbell, *et al.* (1996). "Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins." *Science* 271(5251): 981-3.
- <sup>48</sup> Haddad, E., J. L. Zugaza, *et al.* (2001). "The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis." *Blood* 97(1): 33-8.
- <sup>49</sup> Takesono, A., R. Horai, *et al.* (2004). "Requirement for Tec kinases in chemokine-induced migration and activation of Cdc42 and Rac." *Curr Biol* 14(10): 917-22.
- <sup>50</sup> Weiss-Haljiti, C., C. Pasquali, *et al.* (2004). "Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma, Rac, and PAK signaling in chemokine-induced macrophage

- migration." *J Biol Chem* 279(41): 43273-84.
- <sup>51</sup> Sasaki, T., J. Irie-Sasaki, *et al.* (2000). "Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration." *Science* 287(5455): 1040-6.
- <sup>52</sup> Jimenez, C., R. A. Portela, *et al.* (2000). "Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration." *J Cell Biol* 151(2): 249-62.
- <sup>53</sup> Bonacchi, A., P. Romagnani, *et al.* (2001). "Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes." *J Biol Chem* 276(13): 9945-54.
- <sup>54</sup> Nombela-Arrieta, C., R. A. Lacalle, *et al.* (2004). "Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase gamma during T and B lymphocyte homing." *Immunity* 21(3): 429-41.
- <sup>55</sup> Homey, B., W. Wang, *et al.* (2000). "Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC)." *J Immunol* 164(7): 3465-70.
- <sup>56</sup> Rossi, D. und A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." *Annu Rev Immunol* 18: 217-42.
- <sup>57</sup> Gillitzer, R. und M. Goebeler (2001). "Chemokines in cutaneous wound healing." *J Leukoc Biol* 69(4): 513-21.
- <sup>58</sup> Tanaka, S., S. R. Green, *et al.* (2002). "Differential expression of the isoforms for the monocyte chemoattractant protein-1 receptor, CCR2, in monocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 290(1): 73-80.
- <sup>59</sup> Bartoli, C., M. Civatte, *et al.* (2001). "CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies." *Acta Neuropathol (Berl)* 102(4): 385-92.
- <sup>60</sup> Sanders, S. K., S. M. Crean, *et al.* (2000). "Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell." *J Immunol* 165(9): 4877-83.

- <sup>61</sup> Lindhout, E., J. L. Vissers, *et al.* (2001). "The dendritic cell-specific CC-chemokine DC-CK1 is expressed by germinal center dendritic cells and attracts CD38-negative mantle zone B lymphocytes." *J Immunol* 166(5): 3284-9.
- <sup>62</sup> Pardo, A., K. M. Smith, *et al.* (2001). "CCL18/DC-CK-1/PARC up-regulation in hypersensitivity pneumonitis." *J Leukoc Biol* 70(4): 610-6.
- <sup>63</sup> Mrazek, F., V. Sekerova, *et al.* (2002). "Expression of the chemokine PARC mRNA in bronchoalveolar cells of patients with sarcoidosis." *Immunol Lett* 84(1): 17-22.
- <sup>64</sup> Charbonnier, A. S., N. Kohrgruber, *et al.* (1999). "Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells." *J Exp Med* 190(12): 1755-68.
- <sup>65</sup> Dumstrei, K., R. Mennecke, *et al.* (2004). "Signaling pathways controlling primordial germ cell migration in zebrafish." *J Cell Sci* 117(Pt 20): 4787-95.
- <sup>66</sup> Michel, G., L. Kemeny, *et al.* (1992). "Interleukin-8 receptor-mediated chemotaxis of normal human epidermal cells." *FEBS Lett* 305(3): 241-3.
- <sup>67</sup> Devalaraja, R. M., L. B. Nanney, *et al.* (2000). "Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice." *J Invest Dermatol* 115(2): 234-44.
- <sup>68</sup> Yamamoto, T., B. Eckes, *et al.* (2000). "Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop." *J Immunol* 164(12): 6174-9.
- <sup>69</sup> Feil, C. und H. G. Augustin (1998). "Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines." *Biochem Biophys Res Commun* 247(1): 38-45.
- <sup>70</sup> Murdoch, C., P. N. Monk, *et al.* (1999). "Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells." *Cytokine* 11(9): 704-12.
- <sup>71</sup> Salcedo, R., K. Wasserman, *et al.* (1999). "Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-

- 1alpha." *Am J Pathol* 154(4): 1125-35.
- <sup>72</sup> Weber, K. S., P. J. Nelson, *et al.* (1999). "Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(9): 2085-93.
- <sup>73</sup> Addison, C. L., T. O. Daniel, *et al.* (2000). "The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity." *J Immunol* 165(9): 5269-77.
- <sup>74</sup> Bernardini, G., G. Spinetti, *et al.* (2000). "I-309 binds to and activates endothelial cell functions and acts as an angiogenic molecule in vivo." *Blood* 96(13): 4039-45.
- <sup>75</sup> Haque, N. S., J. T. Fallon, *et al.* (2001). "The chemokine receptor CCR8 mediates human endothelial cell chemotaxis induced by I-309 and Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded vMIP-I and by lipoprotein(a)-stimulated endothelial cell conditioned medium." *Blood* 97(1): 39-45.
- <sup>76</sup> Romagnani, P., F. Annunziato, *et al.* (2001). "Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity." *J Clin Invest* 107(1): 53-63.
- <sup>77</sup> Keane, M. P., J. A. Belperio, *et al.* (1999). "IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis." *J Immunol* 163(10): 5686-92.
- <sup>78</sup> Belperio, J. A., M. P. Keane, *et al.* (2000). "CXC chemokines in angiogenesis." *J Leukoc Biol* 68(1): 1-8.
- <sup>79</sup> Salcedo, R., J. H. Resau, *et al.* (2000). "Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells." *Faseb J* 14(13): 2055-64.

## 9 Veröffentlichungen

### 9.1 Artikel:

H. Rabe, H., **Koschorek, E.**, Nona, S.N., Ritz, H.J., Jeserich, G. (1999). "Voltage-gated sodium and potassium channels in radial glial cells of trout optic tectum studied by patch clamp analysis and single cell RT-PCR." *Glia* 26(3): 221-32.

Homey, B., Alenius, H., Müller, A., Soto, H., Bowman, EP., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerma, A., Assmann, T., **Bünemann, E.**, Lehto, M., Wolff, H., Yen, D., Marxhausen, H., To, W., Sedgwick, J., Ruzicka, T., Lehmann, P., Zlotnik, A. (2002). "CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation." *Nat Med* 8(2): 157-65.

Homey, B. und **E. Bünemann** (2004). "Chemokines and inflammatory skin diseases." *Ernst Schering Res Found Workshop*(45): 69-83.

Gombert, M., Dieu-Nosjean, MC., Winterberg, F., **Bünemann, E.**, Kubitza, RC., Da Cunha, L., Haahtela, A., Lehtimäki, S., Müller, A., Rieker, J., Meller, S., Pivarcsi, A., Koreck, A., Fridman, WH., Zentgraf, HW., Pavenstadt, H., Amara, A., Caux, C., Kemeny, L., Alenius, H., Lauerma, A., Ruzicka, T., Zlotnik, A., Homey, B. (2005). "CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation." *J Immunol* 174(8): 5082-91.

Meller, S., Winterberg, F., Gilliet, M., Müller, A., Lauceviciute, I., Rieker, J., Neumann, N.J., Kubitza, R., Gombert, M., **Bünemann, E.**, Wiesner, U., Franken-Kunkel, P., Kanzler, H., Dieu-Nosjean, M-C., Amara, A., Ruzicka, T., Lehmann, P., Zlotnik, A., Homey, B.. "Ultraviolet radiation-induced injury, chemokines, and leukocyte recruitment: An amplification cycle triggering cutaneous lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* 52(5): 1504-16.

## 9.2 Poster

- September 2002      **Bünemann E.**, Zepeda M.L., Müller A., Kubitza R.C.,  
Wiesner U., Rieker J., Meller S., Pavenstädt H., Zentgraf  
H.-W., Amara A., Giebel B., McClanahan T., Steinhoff M.,  
Smith K., Ruzicka T., Zlotnik A., Homey B. „Chemokines  
Orchestrate Epithelial and Stromal Cell Migration in  
Cutaneous Wound Healing“  
*32th Annual Meeting of the European Society for  
Dermatological Research, Geneva*
- Juli 2003            **Bünemann E.**, Zepeda M.L., Müller A., Kubitza R.C.,  
Wiesner U., Rieker J., Meller S., Pavenstädt H., Zentgraf  
H.-W., Amara A., Giebel B., McClanahan T., Steinhoff M.,  
Smith K., Ruzicka T., Zlotnik A., Homey B.  
“Chemokines: Key Regulators in the Dynamic Process of  
Cutaneous Wound Healing”  
*From Bench to Bedside, Düsseldorf*
- September 2004    Meller S., Winterberg F., Gilliet M., Müller A., Lauceviciute  
I., Rieker J., Neumann J.N., Kubitza R., Gombert M.,  
**Bünemann E.**, Wiesner U., Franken-Kunkel P., Kanzler  
H., Dieu-Nosjean M.-C., Amara A., Ruzicka T., Lehmann  
P., Zlotnik A., Homey B.  
„UV-Injury, Chemokines and Leukocyte Recruitment: An  
Amplification Cycle Triggering Cutaneous Lupus  
Erythematosus”  
*1st International Conference on Cutaneous Lupus  
Erythematosus, Düsseldorf.*

März 2006

Gombert M., Dieu-Nosjean M.-C., Winterberg F.,  
**Bünemann E.**, Kubitza R. C., Da Cunha L. , Haahtela A.,  
Lehtimäki S., Müller A., Rieker J., Meller S., Pivarcsi A.,  
Koreck A., Fridman W., Zentgraf H., Pavenstädt H., Amara  
A., Caux C., Kemeny L., Alenius H., Lauerma A., Ruzicka  
T., Zlotnik A., Homey B.

“CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the  
recruitment of T cells and Langerhans Cells to Sites of  
Atopic Skin Inflammation”

*XXXIII. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft  
Dermatologische Forschung, Aachen.*

### 9.3 Vorträge:

September 2005

“Chemokines in Woundhealing / Chemokine und  
Wundheilung”

Key Session: Adhesion Molecules, Chemokines and  
Proinflammatory Cytokines

Hauptsitzung: Adhäsionsmoleküle, Chemokine und  
entzündungsfördernde Zytokine

*Joint meeting between ETRS, EWMA and DGfW, Stuttgart*

#### 9.4 Preise:

- September 2002      *32nd Annual ESDR Meeting*  
“Chemokines: Key Regulators in the Dynamic Process of  
Cutaneous Wound Healing”  
Ausgezeichnet mit dem GALDERMA Posterpreis
- Juli 2003              “Chemokines: Key Regulators in the Dynamic Process of  
Cutaneous Wound Healing” Rev. Version Posterpreis der  
Medizinischen Fakultät der Heinerich-Heine-Universität