

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

*pharmazentrum frankfurt*

Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie  
Direktor: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

**Die Regulation der  
endothelialen Stickstoffmonoxidsynthese  
in der normalen und der chronisch-diabetischen kutanen  
Wundsituation**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereiches Humanmedizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von

M a n u e l A n h o l d

aus Hadamar

Frankfurt am Main, 2011

Dekan: **Prof. Dr. J. Pfeilschifter**  
Referent: **Prof. Dr. S. Frank**  
Korreferent: **Prof. Dr. W.-H. Boehncke**  
Tag der mündlichen Prüfung: **21. November 2012**

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Eine Übersicht zur Morphologie der Haut .....	1
1.1.1	Biologische Funktionen der Haut .....	1
1.1.2	Epidermale Strukturen und Proliferation.....	1
1.2	Die kutane Wundheilung .....	2
1.3	Stickstoffmonoxid und Stickstoffmonoxidsynthasen.....	3
1.3.1	Ein Überblick zu Stickstoffmonoxid .....	3
1.3.2	Eine Überblick zu Stickstoffmonoxidsynthasen .....	3
1.4	NO in der Wundheilung.....	5
1.4.1	L-Arginin und Stickstoffmonoxid in der Wundheilung .....	5
1.4.2	Die iNOS reguliert die kutane Wundheilung .....	6
1.4.3	Die eNOS in der Wundheilung .....	8
1.5	Ziele dieser Arbeit .....	8
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>10</b>
2.1	Material.....	10
2.1.1	Chemikalien.....	10
2.1.2	Enzyme und Enzypuffer .....	11
2.1.3	Primer, Vektoren und rekombinante Plasmide.....	12
2.1.4	Zellkultur .....	12
2.1.5	Antiseren, Antikörper und Blocking-Peptid.....	13
2.1.6	Labortiere .....	13
2.2	Methoden .....	14
2.2.1	Zellbiologische Verfahren .....	14
2.2.2	Beschreibung des tierexperimentellen Wundmodells .....	15
2.2.3	Nukleinsäure-Methoden .....	15
2.2.4	Protein-Methoden.....	18
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>21</b>
3.1	Expression der eNOS in der kutanen Wundheilung.....	21
3.1.1	Regulation der eNOS mRNA in der kutanen Wundheilung .....	21
3.1.2	Regulation des eNOS Proteins in der kutanen Wundheilung.....	22
3.1.3	Lokalisation der eNOS in kutanen Wunden im Tiermodell.....	23
3.2	Expression der eNOS in Keratinozyten <i>in vitro</i> .....	23

3.2.1	Expression der eNOS mRNA in Keratinozyten <i>in vitro</i> .....	24
3.2.2	Expression des eNOS Proteins in Keratinozyten <i>in vitro</i> .....	25
3.3	Die Rolle der eNOS in gestörter Wundheilung.....	26
3.3.1	Wundheilung in eNOS-defizienten Mäusen.....	26
3.3.2	Expression der eNOS im diabetischen Wundmodell .....	26
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>29</b>
4.1	Gesundheitsökonomische Relevanz gestörter kutaner Wundheilung ....	29
4.2	NO reguliert die Wundheilung .....	30
4.2.1	Moderate Induktion der eNOS in der kutanen Wundheilung.....	31
4.2.2	Keratinozyten-abhängige Expression der eNOS <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	31
4.2.3	Funktionelle Implikationen: Die Wundheilung in eNOS-defizienten Mäusen .....	32
4.2.4	Assoziation veränderter eNOS Expression mit gestörter Wundheilung in diabetischen Mäusen .....	33
4.3	Therapeutische Konsequenzen und Ausblick.....	34
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>37</b>
5.1	Deutsche Version.....	37
5.2	Englische Version.....	38
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>50</b>
7.1	Danksagung .....	50
7.2	Wissenschaftliche Publikation.....	51
7.3	Curriculum Vitae .....	52
7.4	Schriftliche Erklärung.....	53

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### EINHEITEN

°C	Grad Celsius
bp	Basenpaar(e)
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute; Anzahl/Minute
d	Tag
g	Gramm, Gravitation (9.81ms <sup>-2</sup> )
h	Stunde(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
log	Logarithmus
M	Molar, Molarität
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
N	Anzahl
ng	Nanogramm
pg	Pikogramm
s, sec	Sekunde(n)
U	Units; Einheiten
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
µg	Mikrogramm
µm	Mikroliter
µM	Mikromolar

### ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN

6R-BH <sub>4</sub>	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
Abb.	Abbildung
Ang	Angiopoetin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
FGF	Fibroblast Growth Factor
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA; komplementäre DNA
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-Trimethyl-Ammoniumbromid
CTGF	Bindegewebswachstumsfaktor
CTP	Cytosintriphosphat
ctrl	Kontrolle
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest	destilliert

dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor; epidermaler Wachstumsfaktor
eNOS, NOS-III	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
et al.	et alter
EtOH	Ethanol
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	Fetal Calf Sera; fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Groth Factor; Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FMN	Flavinmononukleotid
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
GSCN	Guanidiniumthiocyanat
GSNO	S-Nitroso-Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
HaCaT	Humane Keratinozyten-Zellreihe
HO	Hämoxygenase
HRPO	Meerrettichperoxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Endothelzellen aus Nabelschnurvenen
IFN	Interferon
IFN- $\gamma$ ;	Interferon- $\gamma$ ; Interferon-gamma
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG, IgM, IgA, IgE	Immunglobulin der Klasse G, M, A, E
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -D-Galactosid
KGF	Keratinocyte Growth Factor; Keratinozyten-Wachstumsfaktor
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LB	Lauria-Bertani

L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid
L-NIL	L-N <sup>6</sup> -(1-Iminoethyl)-Lysin
L-NMMA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonucleic Acid; Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nNOS, NOS-I	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotidtriphosphat
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Ion
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PECAM	Pan-Endothelial Cellular Adhesion Molecule
pH	Potentia Hydrogenii
PIPES	Piperazin-N,N'-Bis (2-Ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive Oxygen Species
RPA	RNase Protection Assay; RNase-Verdauungsschutz-Analyse
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOD	Superoxid-Dismutase
TAE	Tris-Acetat
TBE	Tris-Borsäure
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor-beta
T <sub>H</sub>	T-Helfer-Zellen
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
tPA	Tissue Plasminogen Activator; Gewebefibrinolyse-Aktivator
Tris	Tris (Hydroxymethyl-) Aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
u.v.	Ultraviolett
u-PA	Urokinase-Plasminogenaktivator
URL	Uniform Resource Locator
UTP	Uridin 5'-Triphosphat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor; vaskularer endothelialer Wachstumsfaktor
wt	Wildtyp
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactosid



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 EINE ÜBERSICHT ZUR MORPHOLOGIE DER HAUT

### 1.1.1 BIOLOGISCHE FUNKTIONEN DER HAUT

Die Haut stellt mit einer durchschnittlichen Oberfläche von 1,6 Quadratmetern und etwa 16 % des Gesamtgewichts [LEONHARDT, 1991] das größte zusammenhängende Organsystem des Menschen dar [FRITSCH, 1998]. Sie setzt sich aus epidermalen, dermalen und subkutanen Strukturen zusammen [DREWS, 1993] und bildet eine äußere Barriere mit protektiven Funktionen gegenüber chemischen und physikalischen Noxen sowie gegenüber invasiven Mikroorganismen. Die Haut reguliert zusammen mit ihren Anhangsgebilden den Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt und hat Einfluss auf die Temperaturbalance. Darüber hinaus hat sie wesentliche immunologische Funktionen: Sie beinhaltet Antigen-präsentierende Immunzellen und epidermale Keratinozyten, die durch die Synthese proinflammatorischer Zytokine an immunologischen Vorgängen beteiligt sind [WEHNER & GEHRING, 1990].

### 1.1.2 EPIDERMAL STRUKTUREN UND PROLIFERATION

Die Haut kann morphologisch in die drei Schichten *Epidermis*, *Dermis* und *Subkutis* unterteilt werden. Die äußere Oberfläche wird von einem vornehmlich aus Keratinozyten bestehendem, verhornendem Plattenepithel gebildet. Zusätzlich sind CD4-positive und Antigen-präsentierende Immunzellen (*Langerhans-Zellen*) sowie Melanozyten in die epithelialen Schichten eingebettet. Die Keratinozyten unterliegen einem Prozess terminaler Differenzierung: Sie erscheinen innerhalb der Epidermis von basal nach suprabasal in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung. Gering differenzierte und mitogen aktive Stammzellen des *Stratum germinativum* (*Stratum basale* und unteres *Stratum spinosum*) bilden den zellulären Ursprung der *Epidermis*. Lediglich die Keratinozyten des *Stratum basale* besitzen diese mitotische Potenz [FUCHS & RAGHAVAN, 2002]. Nach Verletzung der Haut unterliegt die epidermale Proliferation der Regulation diverser Wachstumsfaktoren, hierunter dem *Epidermalen Wachstumsfaktor* (*EGF*) und dem *Keratinozyten-Wachstumsfaktor* (*KGF*). Während ihrer Migration in den epithelialen Schichten differenzieren die Keratinozyten durch Expression differentieller Zytokeratine und Transglutaminasen. Diese Veränderungen sind im *Stratum corneum* abgeschlossen. Die als *Korneozyten* bezeichneten, kernlosen Zellen

beinhalten Keratinfilamente in einer amorphen Matrix und erlauben die Ausbildung des mit protektiver Funktion versehenen *cornified envelope* [FRITSCH, 1998].

## 1.2 DIE KUTANE WUNDHEILUNG

Die Wundheilung ist durch ein komplexes Zusammenwirken zellulärer und humoraler Regenerations- und Reparationsprozesse mit dem Ziel der möglichst vollständigen Wiederherstellung der Gewebeintegrität gekennzeichnet [BECKERT & KÖNIGSRÄINER, 2009]. Der überwiegende Teil der Hautwunden heilt schnell und effizient. Bei ausgedehnten Schädigungen kann jedoch eine Defektheilung mit permanentem Verlust kutaner Strukturen und Hautanhangsgebilden resultieren. In den vergangenen Jahrzehnten konnte im Zuge wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn ein deutlich erweitertes Verständnis über grundlegende Wundheilungsprozesse gewonnen werden. Auch die zellbiologischen und molekularen Vorgänge der einzelnen Wundheilungsphasen sind in Teilen aufgeklärt.

Die Wundheilung kann in drei Phasen unterteilt werden. Diese werden jeweils von einer komplexen Mischung aus Wachstumsfaktoren und Zytokinen koordiniert und reguliert [CLARK, 1996]:

1. Die *Phase der Inflammation* (Tag 1 - 3) ist nach Degranulation der Thrombozyten durch rasche Infiltration von Immunzellen in das Wundbett charakterisiert.
2. Die *Phase der Proliferation* (Tag 4 - 7) beinhaltet neben der Reepithelialisierung die Ausbildung des Granulationsgewebes. Das Einwachsen von Fibroblasten, Matrixbildung und Angiogenese stellen wesentliche Aspekte dieser Wundheilungsphase dar.
3. Die *Phase der Regeneration* beginnt um den achten Tag mit dem *Remodeling* der extrazellulären Matrix (*Maturation*). Diese umfasst insbesondere die Transformation des Granulationsgewebes in ein beinahe azelluläres Narbengewebe.

Im Folgenden werden einzelne Aspekte der Reepithelialisierung dargestellt. Hierunter wird die Wiederausbildung einer epidermalen Wundabdeckung nach Verletzung verstanden. Zur Reepithelialisierung gehören die Bildung des *Stratum corneum*, die Erneuerung der dermal-epidermalen Junctionen einschließlich der *Basalmembran* sowie die Reetablierung lokaler Immunfunktion. Sie erfolgt in enger zeitlicher und lokaler Interaktion mit dem Granulationsgewebe. Die beteiligten Prozesse unterliegen einer strengen Regulation durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Mitogene. Die Reepithelialisierung hat ihren Ursprung im zellreichen *hyperproliferativen Epithel* der kutanen Wundränder, deren Keratinozyten durch

eine hohe proliferative Aktivität und die Fähigkeit zur Migration gekennzeichnet sind [MARTIN, 1997]. Erhaltene Haarfollikelstümpfe tragen durch Ausbildung epithelialen Gewebes ebenso zum Heilungsprozess bei. Vergleichbar mit den Wundrändern bilden sie epidermale Zellinseln ausgehend vom Follikelstumpf. Die von der Basalmembran abgelösten und migrierenden Keratinozyten unterliegen keiner üblichen Differenzierung. Sie erreichen das Wundareal entlang an Fibronectin- und Fibrinbündeln des Gerinnungsthrombus [CLARK et al. 1982]. Für diesen Migrationsprozess nutzen sie Integrine, Plasminogen-Aktivatoren und Matrix-Metalloproteinasen [GROSE et al. 2002].

Mit Abschluss der Reepithelialisierung wird die Proliferation der Epithelzellen durch Kontaktinhibition terminiert. Insofern ist die kutane Wundheilung durch die Balance zwischen einerseits Proliferation und andererseits Differenzierung charakterisiert [PANKOW et al. 2006].

### **1.3 STICKSTOFFMONOXID UND STICKSTOFFMONOXIDSYNTASEN**

Die kutane Wundheilung wird wesentlich durch Proteinmediatoren reguliert [CLARK, 1996]. Seit langem bestehen jedoch Belege für eine zusätzliche Beteiligung niedermolekularer, diffusibler Botenstoffe an deren Regulation.

#### **1.3.1 EIN ÜBERBLICK ZU STICKSTOFFMONOXID**

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges, freies Radikal mit kurzer biologischer Gewebehalbwertszeit [MARLETTA, 1994]. NO hat autokrine Effekte auf die synthetisierenden Zellen und parakrine Wirkungen im umliegenden Gewebe.

Die Guanylatzyklase stellt den intrazellulären Rezeptor für NO dar und katalysiert die Bildung zyklischen Guanylatmonophosphats (cGMP) als dessen *second messenger* [KRÖNCKE et al. 1995]. cGMP ist seinerseits der allosterische Aktivator der Proteinkinase G [MÜLLER-ESTERL et al. 2002], moduliert Phosphodiesterasen und ist in der Lage Ionenkanäle zu öffnen. cGMP stellt entsprechend den wahrscheinlich bedeutsamsten *second messenger* der physiologischen NO-Effekte dar. NO konnten vielfältige biologische Funktionen zugeordnet werden, zu denen Vasodilatation und Immunreaktionen sowie anti-tumorale und anti-mikrobielle Effekte zählen. Weiterhin agiert es als unkonventioneller Neurotransmitter [MONCADA et al. 1991].

#### **1.3.2 EINE ÜBERBLICK ZU STICKSTOFFMONOXIDSYNTASEN**

NO wird durch Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) synthetisiert. Derzeit werden drei Isoformen der NOS differenziert. Sie sind jeweils homo-dimere Proteine und besitzen eine N-terminale Oxigenase-Domäne sowie eine C-terminale Reduktase-Domäne, die für die zweischrittige Enzymreaktion von zentraler Bedeutung sind [NATHAN & XIE, 1994].

Die chemische Reaktion umfasst die Oxidation eines der beiden Stickstoffatome der Guanidino-Gruppe des L-Arginins sowie den Einsatz von zwei Molekülen O<sub>2</sub> und 1,5 Molekülen reduzierten Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphats (NADPH) je synthetisiertem Molekül NO. Neben NADPH ist die katalytische Aktivität der NOS abhängig von den essentiellen Co-Faktoren Flavin-Adenin-Dinukleotid, (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin und Häm-gebundenem Eisen (Fe-Protoporphyrin-IX-Komplex). Diese bilden innerhalb des Enzyms eine Elektronen-Transfer-Kette. Reduktase- und Oxigenase-Domänen sind über eine Bindungsstelle für Calmodulin verknüpft. Diese Domänenstruktur ist kennzeichnend und spezifisch für alle Isoformen der NOS [ALDERTON et al. 2001].

Im Menschen zeigen die NOS eine Strukturhomologie von 51 - 58 % bezogen auf ihre Primärstruktur [POLLOCK et al. 1995]. Die Isoenzyme unterscheiden sich jedoch deutlich hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisationen und ihrer Expressionsregulation. In Säugetieren gelten zwei der Isoenzyme der NOS als konstitutiv exprimiert: In Neuronen ist dies die neuronale NOS (nNOS), in Endothelzellen des Gefäßsystems die endotheliale NOS (eNOS). Die dritte Isoform, die induzierbare NOS (iNOS), zeigt bei einer großen Vielzahl von Gewebezellen unter Stimulation mit Zytokinen eine Induktion [KRÖNCKE et al. 1995]. Die Isoenzyme der NOS unterscheiden sich zudem bezüglich ihrer molekularen Massen: Diese betragen 160 kDa für die nNOS, 130 kDa für die iNOS und 133 kDa für die eNOS [BUSSE & MÜLSCH, 1996].

## I. KONSTITUTIVE ISOFORMEN DER NOS

Die originär in endothelialen Zellen isolierte eNOS [FÖRSTERMANN et al. 1991] und die nNOS mit Erstbeschreibung in Neuronen werden als konstitutive Enzyme angesehen. Sie agieren im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion. Endothelial gebildetes NO stellt einen potenten Vasodilatator dar und inhibiert darüber hinaus die Thrombozytenaggregation und -adhäsion. Die eNOS katalysiert dabei die Bildung von NO unter Einfluss des intrazellulären Kalziumspiegels, der wiederum durch *shear stress*, Neurotransmitter und andere Mediatoren reguliert wird [NATHAN & XIE, 1994].

Die eNOS besitzt spezielle Bindungsstellen für Myristin und Palmitinsäure, die eine Membranassoziation erlauben [FLEMING et al. 2003]. In Endothelzellen und Herzmuskelzellen ist die eNOS in spezifischen Signaltransduktions-Domänen des Plasmalemm lokalisiert: den *Caveolae*. Die eNOS interagiert hier mit Caveolin, einem integralen Membranprotein dieser *Caveolae*. Die enzymatische Aktivität der konstitutiven Isoformen der NOS wird durch den Kalzium-Calmodulin-Komplex reguliert [FÖRSTERMANN & KLEINERT, 1995]. Darüber hinaus ist ein Kalzium-unabhängiger Mechanismus durch Enzymphosphorylierung mittels Serin-/Threonin-Proteinkinase Akt/Proteinkinase B mit nachfolgend gesteigerter NO-Produktion für die eNOS beschrieben [DIMMELER et al. 1999]. Eine zusätzliche Regulation der eNOS erfolgt auf dem Niveau der Gentranskription sowie durch Modifikation der Stabilität des Transkripts und der Enzymhalbwertszeit. Dies ermöglicht die lokale intrazelluläre und dynamische Anpassung an physiologische und pathologische Bedingungen [FÖRSTERMANN & KLEINERT, 1995].

## II. DIE iNOS UND INFLAMMATION

Die iNOS wurde erstmals in Makrophagen beschrieben. Sie ist jedoch in einer großen Vielzahl unterschiedlicher Zellen nachweisbar, in denen ihre Expression unter dem Einfluss von Zytokinen und Endotoxinen regulierbar ist. Beim Menschen sowie bei Mäusen und Ratten ist die enzymatische Aktivität der iNOS von Kalzium unabhängig. Ihre Expression wird vielmehr auf der Ebene der Transkription reguliert [FÖRSTERMANN & KLEINERT, 1995].

Unter Inflammationsbedingungen führt die Induktion der iNOS zur Freisetzung hoher Konzentrationen von NO im umliegenden Gewebe [MONCADA et al. 1991; KRÖNCKE et al. 1995]. Eine Beteiligung von NO an inflammatorischen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, an Hepatitiden, der Sepsis sowie beim hämorrhagischem Schock [GRISHAM et al. 1999] sind bekannt. Dies verweist auf eine generelle Bedeutung von NO im Rahmen von Entzündungsvorgängen, so auch in der kutanen Wundheilung.

### 1.4 NO IN DER WUNDHEILUNG

Neben den Proteinmitogenen wird dem NO bereits seit langem eine bedeutsame Rolle als Mediator kutaner Wundheilungsprozesse zugeordnet.

#### 1.4.1 L-ARGININ UND STICKSTOFFMONOXID IN DER WUNDHEILUNG

Den L-Arginin-abhängigen Enzymen wurde aufgrund klinischer Studien bereits früh eine Beteiligung an in der Wundheilung zugesprochen. Die Verfügbarkeit von L-Arginin, als Substrat der NOS, hatte im Tierexperiment einen positiven Effekt auf die Heilungsvorgänge, während ein Mangel dieser Aminosäure mit beeinträchtigter Reparatur in Ratten assoziiert war [SEIFTER et al. 1978]. Klinische Studien belegten einen positiven Einfluss von L-Arginin auf Immunfunktion und Wundheilung bei Patienten, die eine orale Supplementierung mit L-Arginin-reicher Kost erhielten. Hierbei konnten auch verstärkte Kollagenbildung und erhöhte Wundfestigkeit gezeigt werden, während die Epithelialisierung durch orale L-Arginin-Supplementierung im Menschen und beim Nagetier nicht beschleunigt wurde [KIRK et al. 1993]. Dies könnte teilweise durch eine verstärkte Produktion von L-Ornithin durch Arginase und nachfolgend erhöhte Verfügbarkeit von Prolin für die Kollagensynthese bedingt sein, da Arginase mit NO um die Substratbindung konkurriert [LI et al. 2001]. Diese These wurde aufgrund des Nachweises einer geringeren Ausprägung positiver Effekte von L-Arginin in iNOS-Knockout-Mäusen bestärkt [SHI et al. 2000].

Weitere Experimente zeigten eine Verbesserung der Wundheilung durch exogen applizierte NO-Donoren im Menschen [SMITH et al. 1996]. Frühere Untersuchungen von ALBINA et al. [1990] zeigten vermehrt NO und Citrullin, beides Endprodukte der NOS, in Wundsekreten der frühen, entzündlichen Phase der Wundheilung. Die Bildung der Wundmatrix zeigte sich abhängig von der NO-Verfügbarkeit. Dabei ging die Inhibition der NO-Synthese mit reduzierter Kollagensynthese und Wundfestigkeit einher [CARTER et al. 1994]. SCHÄFFER UND KOLLEGEN [1997] konnten hohe Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen in den Exsudaten von Inzisionswunden während der ersten 14 Heilungstage nachweisen. Diese waren mit zeitgleich niedrigen Konzentrationen von L-Arginin assoziiert. Dies verweist auf eine hohe Aktivität der NOS in der akuten Wundheilung. Darüber hinaus ließ sich in aktuellen Studien eine Induktion der Arginase in den proliferativen Phasen der Wundheilung in Mäusen zeigen [KÄMPFER et al. 2003]. Zusammenfassend verweisen die Daten auf eine Korrelation zwischen der Verfügbarkeit von L-Arginin, als Substrat der NOS, und der normalen Wundheilung. Zusätzlich implizieren die Ergebnisse einen relevanten kausalen Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit von NO und dem Wundheilungspotenzial [STALLMEYER et al. 1999].

#### **1.4.2 DIE iNOS REGULIERT DIE KUTANE WUNDHEILUNG**

SCHÄFFER und Mitarbeiter [1997] postulierten einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen reduzierter NOS-Enzymaktivität und gestörter Wundheilung. Hohe Aktivität der iNOS ist für diverse inflammatorische Dermatosen charakterisierend. Hieraus ergab sich die Arbeitshypothese für eine potenzielle Bedeutung der iNOS für die kutane Wundheilung. Es zeigte sich entsprechend eine deutliche Induktion nach kutaner Verletzung, dieses möglicherweise im Sinne eines anti-mikrobiellen Abwehrmechanismus [BOGDAN et al. 2000]. Die zeitliche und lokale Expression der iNOS während der kutanen Wundheilung wurde von FRANK und Kollegen [1998] in einem murinen exzisionalen Wundheilungsmodell beschrieben. Dort konnte eine ausgeprägte (etwa 10-fache) Induktion der iNOS gerade für die Phasen der Wundheilung gezeigt werden, in denen Inflammation, Granulation und Reepithelialisierung stattfinden. Der Befund wurde durch Arbeiten von ALBINA et al. [1990] sowie NILL et al. [1995] gestützt, aus denen Indizien für eine vermehrte NO-Synthese im Wundheilungsverlauf abzuleiten waren. Die iNOS Expression war bemerkenswerterweise nicht auf Immunzellen beschränkt. Vielmehr konnte eine relevante NO-Synthese durch die Keratinozyten der Wundränder nachgewiesen werden.

Bereits vor langer Zeit wurde eine funktionelle Bedeutung der iNOS für die kutane Wundheilung belegt. RAMASAMI und Kollegen [1998] zeigten, dass iNOS-abhängiges NO einen potenten Mediator für Wundheilungsvorgänge darstellt. Die topische Applikation eines iNOS-kodierenden, adenoviralen Konstrukts auf Wunden iNOS-defizienter Mäuse führte zu einer signifikanten Verbesserung der in diesen Tieren erheblich gestörten kutanen Wundheilung. Bereits eine singuläre Gabe des iNOS Plasmids konnte die reduzierte Heilungstendenz im Experiment korrigieren [MOST et al. 2002]. Vergleichbare Untersuchungen bei Ratten zeigten die vermehrte Bildung von Kollagen nach direkter Transfektion mit iNOS cDNA [THORNTON et al. 1998].

In Umkehrung dieser Experimente führte die spezifische Hemmung der iNOS Enzymaktivität durch L-N<sup>6</sup>-(1-Iminoethyl)Lysin (L-NIL) bei Mäusen zu einem Verlust proliferativer Kapazität. Es zeigte sich ein desorganisiertes Wundrandepithel mit gestörter Reepithelialisierung im exzisionalen Wundheilungsmodell [STALLMEYER et al. 1999]. Die Inhibition der iNOS reduzierte darüber hinaus die Kollagenbildung und Wundfestigkeit in Inzisionswunden und reduzierte Heilungsvorgänge auch in anderen Wundmodellen [SCHÄFFER et al. 1999]. Eine Verbesserung der Wundheilung wurde in Steroid-therapierten Tieren nach adenoviral vermittelter iNOS Überexpression gefunden [SCHWENTKER et al. 2001]. Hierin könnte eine Therapieoption für gestörte Wundheilung durch die Regulation der iNOS bzw. der Keratinozytenfunktion bestehen.

### 1.4.3 DIE eNOS IN DER WUNDHEILUNG

Seit langem sind wesentliche Funktionen der eNOS in der vaskulären Physiologie und Pathophysiologie bekannt [ARNAL et al. 1999]. Mit Bezug auf die Relevanz der iNOS und der Wirkung von iNOS-abhängigem NO während der Wundheilung stellte sich die Frage, ob den konstitutiv exprimierten NOS Isoformen, wie der eNOS, ein vergleichbarer Stellenwert zukommt.

Tatsächlich zeigten Studien von LEE et al. [1999] einen verzögerten Wundverschluss mit reduzierter Wundfestigkeit bei eNOS-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Bei diesen Untersuchungen war die eNOS-Defizienz auch mit vermindertem Endothelwachstum korreliert. *In-vitro*-Daten aus kultivierten Aortensegmenten der Maus belegten reduzierte endotheliale Migration, Proliferation und Differenzierung für eNOS-defiziente Mäuse. Da der Endothelzellfunktion im Rahmen der Wundheilung eine entscheidende Funktion zukommt, liegt eine Beteiligung der eNOS für die kutane Wundheilung und der durch Wachstumsfaktoren stimulierten Angiogenese nahe. Entsprechend erschien es schlüssig, auch eine relevante funktionelle Bedeutung der eNOS und eNOS-abhängiger NO-Synthese für die kutane Wundheilung anzunehmen. Zeitliche Expressionskinetiken im Wundheilungsverlauf sowie stringente Aussagen zur Lokalisierung der eNOS im Wundgebiet waren bis zur Publikation der Resultate dieser Arbeit [ANHOLD et al. 2002] jedoch nicht verfügbar.

## 1.5 ZIELE DIESER ARBEIT

Obwohl eine funktionelle Bedeutung der eNOS für die kutane Wundheilung angenommen werden konnte, waren die exakten Regulationsmechanismen noch weitgehend unklar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung der eNOS für die kutane Wundheilung geklärt werden:

- I. Diese Arbeit hatte zum Ziel, die Lokalisation der eNOS und deren zeitlichen Expressionsverlauf in der Wundheilung in gesunden Tieren zu bestimmen.
- II. Die Lokalisierung der eNOS in Wunden sollte die zellulären Quellen der eNOS Expression *in situ* klären.
- III. *In-vitro*-Experimente (Zellkultur) sollten die Regulation der eNOS durch Mediatoren untermauern und neue Aspekte zur Regulation und Funktion der eNOS aufzeigen.



- IV. Die Analyse der eNOS Expression in diabetischen Tieren könnte zu erweiterten Kenntnissen über die Rolle von NO in gestörter Wundheilung führen.
- V. Ein Wundheilungsmodell mit transgenen eNOS-defizienten Mäusen diene dazu, die Funktion der eNOS während des Wundheilungsverlaufs zu bestimmen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 CHEMIKALIEN

Aceton, Säuren, Chloroform, Ethanol, Methanol und Isopropanol wurden dem zentralen Bestand des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main entnommen. Alle anderen hier nicht näher aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma Biochemicals (Deisenhofen) bezogen.

Acrylamid / Bisacrylamid (29:1; 40 %)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid / Harnstoff (30:0,8; 30 %)	Roth, Karlsruhe
Agarose ME Seakem	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Agarose NuSieve GTG	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Ammoniumperoxidisulfat	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
5-Bromo-6-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactosid	Roth, Karlsruhe
Bromophenol-Blau	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
N-Cetyl-N,N,N-Trimethyl-ammoniumbromid	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Dimethylformamid	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Dithiothreitol	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Eosin	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Ethylen-Diamin-Tetraacetat	AppliChem, Darmstadt
Glutathion	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Guanidiniumthiocyanat	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Hämatoxylin-Lösung	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe
8-Hydroxyquinolin (1-azanaphtalen-8-ol)	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Isopropylthiogalactosid	Roth, Karlsruhe
N-Lauryl-Sarkosyl-Natrium-Salz	Serva, Heidelberg
Leupeptin	Roche Biochemicals, Mannheim
2-Mercaptoethanol	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Methylen-Blau	Merck, Darmstadt
Molekulare Gewichtsmarker (DNA ladder plus)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Molekulare Gewichtsmarker (broad-range protein)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Nukleotidtriphosphate	Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt
Oligonukleotide	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Pepstatin	Roche Biochemicals, Mannheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roche Biochemicals, Mannheim
Ponceau S-Lösung	Serva, Heidelberg

Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Proteinproben-Färbekonzentrat	Bio-Rad, München
RNasin	Promega, Madison, USA
Select Hefe-Agar	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Select Pepton 140	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Select Hefeextrakt	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Skim Milchpulver (Fett-frei)	Fluka BioChemika, Neu-Ulm
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Darmstadt
Natriumlaurylsarcosyl	Serva, Heidelberg
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
tRNA [RNase-frei]	Roche Biochemicals, Mannheim
Triton X-100	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Tween 20 [Polyoxyethylensorbitanmonolaurat]	Sigma Biochemicals, Deisenhofen
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]UTP [800 Ci/mmol]	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen
Rompun® (Xylazinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen

### 2.1.2 ENZYME UND ENZYMPUFFER

Die Enzyme und Enzympuffer wurden bis zur Verwendung permanent auf einer Temperatur von -20°C gehalten.

#### I. ENZYME

<i>pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Lysozym	Roche Biochemicals, Mannheim
Proteinase K	Roche Biochemicals, Mannheim
Restriktionsenzyme	Roche Biochemicals, Mannheim
Reverse Transkriptase	Gibco Life Technologies, Eggenstein
RNase A	Roche Biochemicals, Mannheim
RNase T1	Roche Biochemicals, Mannheim
T3-/T7-RNA Polymerase	Roche Biochemicals, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche Biochemicals, Mannheim
<i>taq</i> -DNA-Polymerase	PE Biosystems, Weiterstadt

#### II. ENZYMPUFFER

Erststrang-Puffer	5x	Gibco Life Technologies
PCR-Puffer [15mM MgCl <sub>2</sub> ]	10x	PE Biosystems, Weiterstadt
Restriktionspuffer [A,B,H]	10x	Roche Biochemicals, Mannheim
T4-DNA-Ligase Puffer	10x	Boehringer, Mannheim
Transkriptionspuffer	10x	Boehringer, Mannheim

Zusammensetzung der Pufferlösungen:

<u>5x Erststrang-Puffer:</u>	250 mM Tris-HCl pH 8,3
	375 mM KCl
	15 mM MgCl <sub>2</sub>

<u>taq-DNA-Polymerase:</u>	0,1 M	Tris-Cl pH 8.4
	15 mM	MgCl <sub>2</sub>
	500 mM	KCl
<u>T4-DNA-Ligase Puffer:</u>	0,5 M	Tris-Cl pH 7.5
	50 mM	MgCl <sub>2</sub>
	50 mM	DTT
	0,5 mg/ml	BSA
<u>T7-RNA-Polymerase:</u>	0,4 M	Tris-Cl pH 7.5
	0,1 M	MgCl <sub>2</sub>
	50 mM	DTT
	0,5 mg/ml	BSA

### 2.1.3 PRIMER, VEKTOREN UND REKOMBINANTE PLASMIDE

#### I. PRIMER

Oligo-(dT<sub>15</sub>)-Primer [0,5 mg/ml] wurden von der Firma Promega (Madison) bezogen. Weitere spezifische Primer wurden von der Firma Gibco LifeTechnologies (Eggenstein) und werden im Detail in ANHOLD et al. [2002] beschrieben. Die lyophilisierten Primer wurden vor Gebrauch in Aqua<sub>dest</sub> zu einer Konzentration von 0,1 mM gelöst.

#### II. VEKTOREN UND REKOMBINANTE PLASMIDE

pBluescript II KS (+) [2961bp, BEDBROOK et al. 1979]	Stratagene, Heidelberg
pBKS(+)GAPDH (Human, Nukleotide 148-302)	TOKUNAGA et al. [1987]
pBKS(+)GAPDH (Maus, Nukleotide 128-282)	SABATH et al. [1990]
pBKS(+)eNOS (Human, Nukleotide 3224-3583)	JANSSENS et al. [1992]
pBKS(+)eNOS (Human, Nukleotide 2712-3125)	JANSSENS et al. [1992]
pBKS(+)eNOS (Maus, Nukleotide 3075-3403)	GNANAPANDITHEN et al. [1996]

### 2.1.4 ZELLKULTUR

#### I. ZELLKULTURLÖSUNGEN

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Dulbecco's <i>Modified Eagle's</i> Medium	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Fetales Kälberserum (0,1 µM)	Gibco Life Technologies, Eggenstein
KBM-2	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Penicillin, Streptomycin	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Trypsin-EDTA	Gibco Life Technologies, Eggenstein

#### II. ZYTOKINE

Epidermaler Wachstumsfaktor	EGF	Roche Biochemicals, Mannheim
Interferon-γ	IFN-γ	Roche Biochemicals, Mannheim
Interleukin-1β	IL-1β	Roche Biochemicals, Mannheim

Keratinozyten-Wachstumsfaktor	KGF	Roche Biochemicals, Mannheim
Tumor-Wachstumsfaktor- $\beta$ 1	TGF- $\beta$	Roche Biochemicals, Mannheim
Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$	TNF- $\alpha$	Roche Biochemicals, Mannheim

### III. S-NITROSO-GLUTATHION

S-Nitroso-Glutathion (GSNO) wurde von der Firma Alexis Biochemicals (Enzo Life Sciences GmbH) in Lörrach bezogen.

### IV. EUKARYOTE ZELLEN

Humane primäre epidermale Keratinozyten	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Humane adulte Keratinozyten (HaCaT)	BOUKAMP et al. [1988]
Humane umbilikale Gefäßendothelzellen (HUVEC)	JAFFÉ et al. [1973]

### V. PROKARYOTE ZELLEN

*E. coli* XL-1 blue Stratagene, Heidelberg

#### 2.1.5 ANTISEREN, ANTIKÖRPER UND BLOCKING-PEPTID

anti-eNOS	[Kaninchen, polyklonal]	SantaCruz Biotechnologies, Heidelberg
anti-Maus CD31	[Kaninchen, polyklonal]	SantaCruz Biotechnologies, Heidelberg
anti-Maus F4/80	[Ratte, monoklonal]	Serotec, Hamburg
anti-Maus Ki67	[Kaninchen, polyklonal]	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen IgG	[Ziege, Meerrettich-Peroxidase, gekoppelt]	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG	[Kaninchen, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt]	DAKO, Denmark
eNOS Blockierungspeptid		SantaCruz Biotechnologies, Heidelberg

#### 2.1.6 LABORTIERE

Zur Durchführung der *In-vivo*-Experimente wurden acht Wochen alte weibliche Mäuse eingesetzt. Die verwendeten C57BLKS/J-m  $+/+$  *Lepr<sup>db</sup>* (db/db)- und Wildtyp-Mäuse C57BLKS wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME, USA) bzw. Charles River (Deisenhofen) erworben. Homozygote eNOS-defiziente Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Prof. R. BUSSE vom Institut der Physiologie der Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse wurden in Käfigen zu je vier Tieren bei einer konstanten Umgebungstemperatur von 22°C und einem künstlichen 12h-Tag-/12h-Nachtzyklus gehalten. Sie erhielten eine Standardlabornahrung *ad libitum*. Mit Durchführung der Tierexperimente wurden die Mäuse in

Käfigen vereinzelt. Die Genehmigung der Studienprotokolle erfolgte durch das Regierungspräsidium Darmstadt.

## **2.2 METHODEN**

Im Folgenden werden die wesentlichen Methoden dargestellt. Wo nicht anders angegeben, kamen die Experimente in Übereinstimmung mit den von SAMBROOK und Kollegen [1989] publizierten Protokollen zur Anwendung.

### **2.2.1 ZELLBIOLOGISCHE VERFAHREN**

#### **I. ZELLKULTUR**

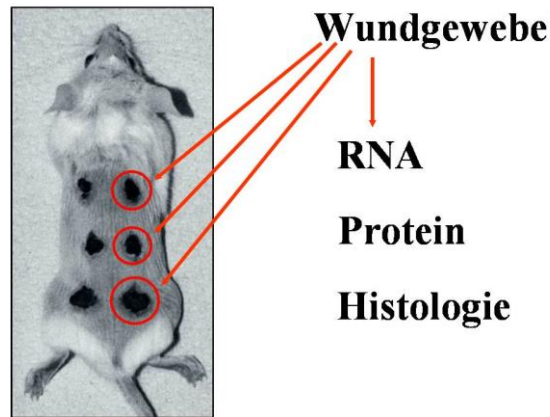
Die Zellkulturexperimente wurden in einer Heraeus BBD6220 Inkubationskammer in angefeuchteter Atmosphäre mit einem Anteil von 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid bei einer Temperatur von 37 °C vorgenommen. Die humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT [BOUKAMP et al. 1988] wurde in Dulbecco's *Modified Eagle's* Medium (DMEM) mit Zusatz von 10 % FCS (v/v), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zellen wuchsen unter Ausbildung eines 'Monolayers' und wurden anschließend für definierte Perioden mit spezifischen Reagenzien bzw. Faktoren stimuliert. Primäre Humane Epidermale Keratinozyten wurden von der Firma BioWhittaker bezogen und entsprechend den Herstellerangaben in einem Spezialmedium (KBM-2) kultiviert.

#### **II. TRANSFORMATION KOMPETENTER PROKARYOTER ZELLEN**

*Escherichia coli* XL-1 blue (Stratagene, Heidelberg) wurden in flüssigem Lauria-Bertani (LB)-Medium kultiviert. 200 µl der bakteriellen Zelllösung wurde auf Eis gebracht und 4 µl Plasmidlösung anschließend hinzugegeben. Plasmide und Bakterien wurden für weitere 30 min auf Eis ko-inkubiert. Für die Hitze-Schock-Reaktion wurde die Suspension kurzzeitig (30 sec) bei 42 °C erwärmt und anschließend unmittelbar für 2 min auf Eis abgekühlt. Die so transformierte Lösung wurde für 1 h bei 37 °C mit 250µl SocMedium (Nalgene®) inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf Agarplatten ausgestrichen. Geeignete Klone wurden durch Blue/White-Screening nach Bebrütung detektiert wie bei MILLER [1972] beschrieben.

### 2.2.2 BESCHREIBUNG DES TIEREXPERIMENTELLEN WUNDMODELLS

Die in dieser Arbeit verwendeten tierexperimentellen Verfahren wurden von FRANK & KÄMPFER [2002] beschrieben.



**Abb. 1 Exzisionales Wundmodell in der Maus.**

Es wurden jeweils sechs exzisionale Wunden auf dem Rücken der Mäuse generiert (ABB. 1). Zur Durchführung wurden die Mäuse mit einer einmaligen intraperitonealen Injektion mit Ketamin (80 mg/kg Körpergewicht) / Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert.

Das Fell auf dem Rücken wurde entfernt und die Haut mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Wunden (5 mm Durchmesser, 3–4 mm Tiefe) wurden durch Exzision der Haut mit einer sterilen Schere bis auf das Niveau des darunter gelegenen *Panniculus carnosus* hergestellt. Die Ausbildung von Wundschorf wurde während der Wundheilung explizit toleriert. Die Gewebeprobe der verletzten Haut von jeweils vier Tieren wurden an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 13 nach Verletzung gewonnen. Zu den vorgesehenen Zeitpunkten wurden die kompletten Wunden einschließlich Schorf und Wundrändern ausgeschnitten. Vergleichbare Biopsien intakter Haut wurden als Kontrollen entnommen. In jedem Experiment wurden jeweils die Wunden von vier Labortieren (n = 16 Wunden) sowie die unverletzte Haut von je vier Tieren zusammengeführt, rasch in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C zur Gewinnung von RNA- und Proteinisolaten aufbewahrt.

### 2.2.3 NUKLEINSÄURE-METHODEN

#### I. SEPARATION VON NUKLEINSÄUREN IN AGAROSEGELEN

Agarosegele sind geeignet, um Nukleinsäuren entsprechend ihrem molekularen Gewicht in einem homogenen elektrischen Feld zu separieren. Bei Durchführung der Gelelektrophorese

wurde eine maximale elektrische Feldstärke von 5 V/cm angelegt. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurde dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt.

Die Herstellung analytischer Gele wurde mit Seakem Agarose (Biozym Diagnostik, Oldendorf) durchgeführt. Diese wurde durch Erhitzung auf hohen Schmelzpunkt in einem Mikrowellenherd in 1xTAE-Puffer gelöst. Hierzu wurde 2 %-iges Agarose-Gel für Nukleinsäuren mit 100 - 200 bp eingesetzt, während 1,5 %-ige Agarose für hochmolekulare Nukleinsäuren Verwendung fand.

Nach Abkühlung auf 60 °C wurde der noch flüssigen Agarose Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugefügt. Die Gelelektrophorese wurde in einer Elektrophoresekammer (Sub-Cell GT mini/basic, Bio-Rad) in 1xTAE durchgeführt. Dabei wurden die Nukleinsäureproben in geformte Aussparungen der präparierten Gele zusammen mit Ladepuffer eingebracht.

<u>Ladepuffer (6x):</u>	30 % Glycerin (v/v)
	0,25 % Bromophenol-Blau (w/v)
	0,25 % Xylen-Cyanol (w/v)
	60 % 10x TAE (v/v)

## **II. PLASMIDISOLATION AUS BAKTERIENZELLEN MITTELS ALKALISCHER LYSE**

Wie zuvor ausgeführt, wurden bakterielle Zellen zur Amplifikation von Plasmid-DNA eingesetzt. 3 ml LB-Medium wurden dabei mit einer einzelnen bakteriellen Kolonie inokuliert und bei 37 °C über Nacht unter anhaltendem Schwenken inkubiert. Die Plasmidextraktion aus den Bakterienzellen erfolgte anhand eines modifizierten Protokolls mit originärer Beschreibung nach BIRNBOIM & DOLY [1978] sowie ISH-HOROWICZ & BURKE [1981]. Die Extraktion kleiner und größerer Mengen Plasmid-DNA wurde mit dem Quiagen Plasmid Purification Kit (Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben vorgenommen.

## **III. DNA-AMPLIFIKATION MITTELS POLYMERASE-KETTENREAKTION**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die rasche Vervielfältigung spezifischer einzelsträngiger DNA-Matrizen durch exponentielle Kopien [MULLIS & FOLOONA, 1987; SAIKI et al. 1988].

<u>PCR:</u>	10-20 ng cDNA-Matrize
	2,5µl 20 µM Primer (forward/backward)
	10 µl 2 mM dNTP-Mix
	5 µl 10x PCR-Puffer [incl. 15mM MgCl <sub>2</sub> ]
	0,3 µl 1 U Taq-DNA-Polymerase [AmpliTaq™]
	ad 50 µl Aqua <sub>dest</sub>



Die PCR wurde in GeneAmp® PCR System 9700 (Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt) mit 25-30 Amplifikationszyklen vorgenommen. Jeder PCR-Zyklus umfasste die folgenden Phasen:

<b>Phase</b>	<b>Dauer [sec]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>
Primer Annealing	120	50
DNA Replikation	60	72
DNA Denaturierung	60	95

#### **IV. IDENTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN DURCH DNA-SEQUENZIERUNG**

Die DNA-Sequenzierung wurde mit der Didesoxy- bzw. Kettenabbruch-Methode nach SANGER et al. [1977] in einem ABI-Prism 310 Genetic Analyser sowie dem BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt) nach Herstellerangaben vorgenommen.

#### **V. DNA-ANALYSE**

Die Nukleinsäurerestriktion wurde mit einer DNA-Konzentration von 0,1 µg/µl mit 5 Einheiten Restriktionsenzym pro 1 µg DNA durchgeführt. Es wurde eine adäquate Pufferlösung nach Herstellangaben verwendet. Nach Inkubation bei 37 °C für 3 h wurde der Restriktionserfolg jeweils elektrophoretisch bestätigt.

#### **VI. DNA-LIGATION**

Zur gezielten DNA-Rekombination wurden die durch Restriktionsendonukleasen geschnittenen DNA-Fragmente bzw. PCR-Produkte sowie T4-DNA-Ligase verwendet:

<u>DNA-Ligation:</u>	10 µl	Gel / cDNA (5 ng/µl)
	1,5 µl	Linearisierte Vektor-DNA
	4 µl	10x Ligase-Puffer
	2 µl	T4-DNA-Ligase
	22,5 µl	Aqua <sub>dest</sub>

#### **VII. RNA-EXTRAKTION**

Die Isolierung zellulärer Gesamt-RNA und RNA aus Wundgewebe wurde unter Einsatz von Guanidiniumthiocyanat (GSCN) nach einem modifizierten Protokoll mit ursprünglicher Beschreibung von CHOMCZYNSKI & SACCHI [1987] vorgenommen, wie von FRANK et al. [1999] publiziert.

<u>GSCN-Lösung:</u>	50 %	Guanidiniumthiocyanat (w/v)
---------------------	------	-----------------------------

0,5 % Natriumlaurylsarcosin (w/v)  
 15 mM Natriumcitrat pH 7.0  
 0,7 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

### VIII. RNA-DETEKTION MIT REVERSE TRANSKRIPTASE-POLYMERASE-KETTENREAKTION

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) kombiniert zwei molekularbiologische Methoden in aufeinanderfolgenden Phasen: die reverse Transkription und die Polymerase-Kettenreaktion:

Reverse Transkription:

7 $\mu$ l	5 $\mu$ g RNA (in DEPC-H <sub>2</sub> O)
1 $\mu$ l	Oligo-(dT <sub>15</sub> )-Primer (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)
4 $\mu$ l	5x Reverse Transkriptase-Puffer (Erststrang-Puffer)
2 $\mu$ l	0,1 M Dithiothreitol (DTT)
1 $\mu$ l	RNasin
4 $\mu$ l	10 mM dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
1 $\mu$ l	Superscript II (200 U/ $\mu$ l reverse Transkriptase)

Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert und die Reaktion durch Inkubation bei 95 °C für 5 min terminiert. Nach Lösung in 20  $\mu$ l Aquadest (DEPC-behandelt) wurde die cDNA bei -20 °C aufbewahrt. Die PCR erfolgte nach oben beschriebenem Protokoll.

### IX. RNA-DETEKTION MIT RNASE-VERDAUUNGSSCHUTZ-ANALYSE

Die RNase-Verdauungsschutz-Analyse (RNase Protection Assay; RPA) stellt ein Verfahren dar, bei dem Ribonukleasen und radioaktiv markierte RNA-Sonden kombiniert zur spezifischen Detektion und Quantifizierung von mRNA verwendet werden. Die RPA besitzt eine verglichen mit dem Northernblot höhere Sensitivität und Spezifität [COX et al. 1984]. MELTON et al. [1984] konnte zeigen, dass bereits Mengen von 0,1 pg mRNA spezifisch mit der RPA nachgewiesen werden können. Die RPA wurde in der vorliegenden Arbeit wie in WERNER et al. [1992] beschrieben durchgeführt.

#### 2.2.4 PROTEIN-METHODEN

##### I. MESSUNG DER PROTEINKONZENTRATION MIT DER BRADFORD-METHODE

Die quantitative Bestimmung der Eiweißkonzentration in Zellkulturextrakten und Gewebelysaten erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay auf Grundlage von BRADFORD [1976]. Für die photometrische Analyse wurden 20  $\mu$ l Proteinlösung (Verdünnung 1:20 für zytoplasmatische Proteine) in 96-well ELISA-Platten (PS Microplate 96 well, Greiner)

pipettiert. Als Vergleichsstandard wurden definierte Konzentrationen bovines Serumalbumins (125 - 1000 µg/ml BSA) eingesetzt. Dabei wurde eine Eichreihe mit Proteinmengen von 0 - 1 mg/ml BSA hergestellt und die Proben in einem definierten Volumen auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte aufgebracht. Die Proben wurden für 10 min mit jeweils 180 µl Bio-Rad-Reagenz (Verdünnung 1:5 in Aqua<sub>dest</sub>) inkubiert.

Die optischen Dichten wurden bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Microplate Reader (Bio-Rad) gemessen. Die Berechnung der Absorptionswerte und Proteinkonzentrationen erfolgte mit Microplate Manager 4.0 PC Software (Bio-Rad).

## II. TRITON-PRÄPARATION VON PROTEINLYSATEN

Die Proteinlysate stammten aus kultivierten eukaryoten Zellen sowie aus in Tierexperimenten gewonnenen Gewebeproben. Die Homogenisierung erfolgte mittels Lyse-Puffer:

<u>Homogenisierungs-Puffer:</u>	1 %	Triton X-100 (v/v)
	20 mM	Tris-HCl pH 8,0
	137 mM	NaCl
	10 %	Glyzerin (v/v)
	5 mM	EDTA pH 8,0
<u>Proteinaseinhibitor-</u> <u>Zusätze:</u>	1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
	1 %	0,15 U/ml Aprotinin (w/v)
		15 µg/ml Leupeptin
		10 µg/ml Pepstatin

## III. IMMUNOBLOT

Die Westernblot-Analyse [TOWBIN ET AL. 1979] ermöglicht die Detektion und Separation von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes. Sie umfasst als essenzielle Schritte die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), den Proteintransfer und die Immundetektion. Die SDS-PAGE erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem, wie bereits von LAEMMLI [1970] beschrieben.

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde der Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P Transfermembran, Millipore, Bedford, MA) in einem horizontalen, *semi-dry* Elektrolot (Trans-Blot SD, Bio-Rad) vorgenommen. Die PVDF-Membran wurde dazu im Vorfeld für 3 min in Isopropanol aktiviert und in deionisiertem Wasser sowie Transferpuffer gespült. Der Proteintransfer erfolgte mit einer konstanten elektrischen Feldstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 75 min. Die PDVF-Membran wurde anschließend

auf *Whatman*-Papier getrocknet. *Ponceau S*-Lösung (0,1 % Ponceau S, 5 % Essigsäure) diente der Kontrolle eines gleichmäßigen Proteinübertrags nach Immunfärbung.

Nach erfolgtem Transfer wurden eNOS und CD31 Protein durch polyklonale Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg) detektiert. Zur Visualisierung wurden mit Merrettich-Peroxidase konjugierte sekundäre Antikörper sowie das ECL-Detektionssystem (Amersham, Freiburg) eingesetzt.

#### **IV. IMMUNHISTOCHEMIE IN WUNDBIOPSIEN**

Die Exzisionswunden wurden komplett aus der Rückenhaut der Labormäusen entnommen und zweigeteilt. Sie wurden anschließend in Gewebemedium eingebettet und tiefgefroren. Serielle Mikrotom-Gefrierschnitte wurden mit Aceton fixiert und für 10 min bei Raumtemperatur mit 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS zur Inaktivierung endogener Peroxidasen inkubiert. Anschließend wurden diese für 1 h bei Raumtemperatur mit polyklonalem Antiserum gegen murine eNOS (Santa Cruz, Heidelberg) bzw. murines Ki-67 (Dianova, Hamburg; 1:25 verdünnt in PBS, 0,1 % BSA) inkubiert. Ein Blockierungspeptid zur Prüfung der Spezifität des Anti-eNOS-Antiserums wurde von der Fa. Santa Cruz (Heidelberg) bezogen. Die Schnitte wurden mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-System (Santa Cruz, Heidelberg) gefärbt, welches 3-Amino-9-Ethylcarbazol als chromogenes Substrat verwendet. Nach Inkubation wurden die immunhistologischen Präparate mit Wasser gespült und mit Hämatoxylin (Sigma, Deisenhofen) gegengefärbt.

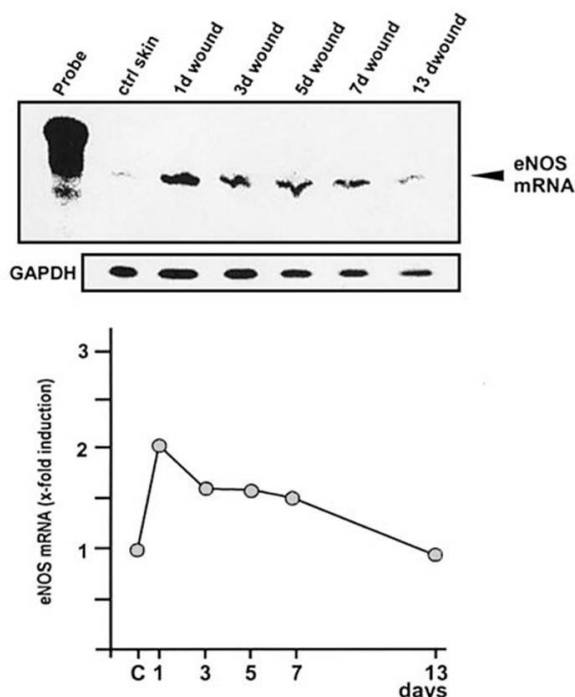
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 EXPRESSION DER eNOS IN DER KUTANEN WUNDHEILUNG

##### 3.1.1 REGULATION DER eNOS mRNA IN DER KUTANEN WUNDHEILUNG

Zunächst wurde die Expressionkinetik der eNOS im kutanen Wundheilungsverlauf in gesunden Mäusen analysiert. Dies erfolgte in dem zuvor beschriebenen Wundheilungsmodell mit weiblichen C57BLKS Mäusen. Die Gesamt-RNA wurde zu definierten Zeitpunkten aus den Exzisionswunden isoliert und mit der RPA bezüglich eNOS mRNA analysiert. Jedem Untersuchungszeitpunkt waren dabei  $n = 16$  Wunden aus jeweils vier unterschiedlichen Tieren zugeordnet. Die Gewebeproben unverletzter Haut aus gesunden Mäusen dienten als jeweilige Kontrolle.

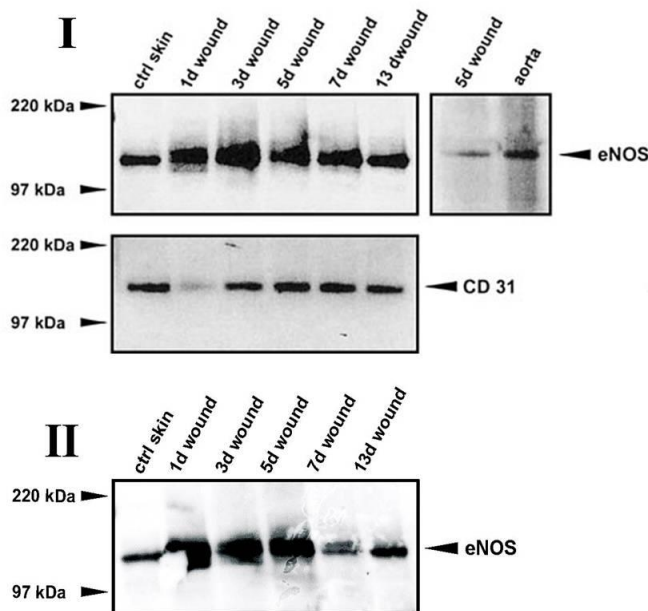
Wie in ABB. 2 dargestellt, konnte eine geringe basale Expression der eNOS mRNA bereits in intakter Haut (ctrl skin) gefunden werden. Im Wundheilungsverlauf ließ sich darüber hinaus eine moderate Induktion bis zum 2-Fachen dieser mRNA-Konzentration für die Frühphase der Wundheilung (Tag 1) nachweisen. Die Expression der eNOS mRNA zeigte sich in der Inflammationsphase, in der Granulation, Angiogenese und Reepithelialisierung stattfinden, anhaltend erhöht (bis Tag 7).



**Abb. 2 Regulation der eNOS mRNA im kutanen Wundheilungsverlauf.** 20 ug zelluläre Gesamt-RNA aus unverletzter Haut sowie aus Wunden von C57BLKS Mäusen wurde mittels RNase-Verdauungsschutz-Analyse bezüglich der Expression von eNOS mRNA untersucht. Die entsprechenden Zeitpunkte nach Verletzung sind auf der Zeitachse markiert. In der Abbildung ist ein repräsentatives Gel gezeigt. Das GAPDH-Signal dient als Ladekontrolle. Im unteren Abschnitt der Abbildung wird die relative Induktion der eNOS mRNA angezeigt, wie sie mittels PhosphoImager (Fuji, Tokio, Japan) analysiert wurde. Jeder experimentelle Zeitpunkt entspricht insgesamt  $n = 32$  Wunden aus zwei unabhängigen Tierexperimenten.

### 3.1.2 REGULATION DES eNOS PROTEINS IN DER KUTANEN WUNDHEILUNG

Vereinbar mit den Befunden auf der Transkriptionsebene ließ sich eNOS Protein spezifisch in unverletzter Kontrollhaut nachweisen. Es zeigte sich auch eine moderate Induktion nach Verwundung. Im Vergleich zur gefundenen Kinetik der eNOS mRNA konnte die maximale eNOS Proteinkonzentration mit einer zeitlichen Latenz an Tag 3 der Wundheilung nachgewiesen werden. Diese Induktion war bis zum Ende der akuten Wundheilung (13-Tage-Wunde) komplett rückläufig. Die Expressionskinetik konnte sowohl in C57BLKS, als auch für BALB/C Mäuse nachgewiesen werden. Im Immunoblot wurden hierbei acht Wunden von vier unterschiedlichen Tieren zu jedem Untersuchungszeitpunkt verwendet (ABB. 3: I oben, II).



**Abb. 3 eNOS und CD31 Expressionsverlauf in intakter Haut und Hautwunden in C57BLKS-Mäusen sowie eNOS Expressionsverlauf in verwundeter und intakter Rückenhaut in Balb/C-Mäusen.** 50 µg Gesamtproteinlysate aus unverletzten murinen Hautproben bzw. Wunden wurde auf spezifisches eNOS- (I, oben und II) und CD31-Protein (I, unten) untersucht. n = 8 Wunden aus vier Tieren wurden für jeden angezeigten Zeitpunkt entnommen und für Proteinisolate eingesetzt. Die Spezifität des Anti-eNOS-Antiserums wurde mit Proteinlysaten aus muriner Aortenbiopsie (I, oben rechts) bestätigt. Die Markierungen zeigen jeweils spezifische Signale an. Kontrollhaut (ctrl skin) bezieht sich auf intakte Haut.

Die Spezifität des polyklonalem Anti-eNOS-Antikörpers (Santa Cruz, Heidelberg) wurde mehrfach kontrolliert. Hierzu wurde eine murine Aortenbiopsie entnommen. Die Aortenfragmente wurden zur Proteinextraktion in LAEMMLI-Ladepuffer (30 µl) bei 95 °C für 10 min erhitzt, um konstitutiv exprimierte eNOS aus dem Gefäßendothel zu gewinnen. Die Spezifität der eNOS Banden wurde anschließend im Westernblot bestätigt (ABB. 3, I oben rechts).

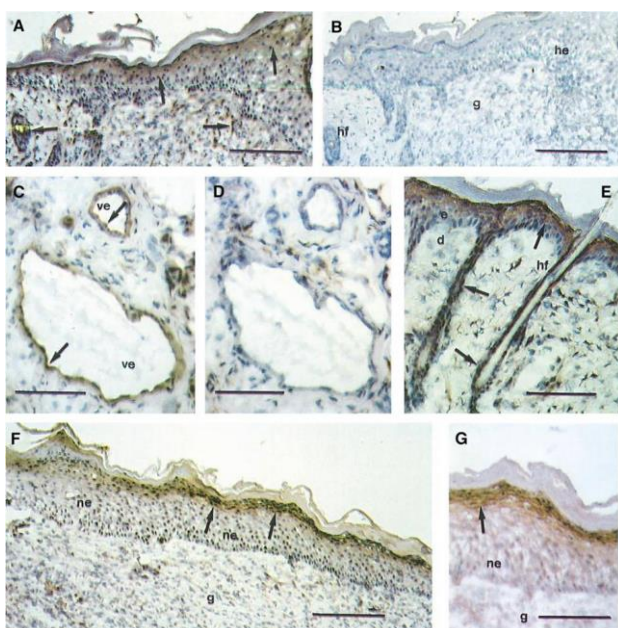
Interessanterweise konnte durch Vergleich mit dem pan-endothelialen Marker CD31 gezeigt werden, dass die Induktion der eNOS mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht endothelialen Ursprungs war. Es zeigte sich vielmehr eine signifikante Diskrepanz zwischen der Präsenz endothelialer Zellen (gemessen mit CD31) und der Induktion der eNOS mit deutlicher Ausprägung in der Frühphase der Wundheilung (Tag 1 und 3). Dies implizierte die Annahme

zusätzlicher zellulärer eNOS Expression außerhalb der Gefäßendothelien im Verlauf der Wundheilung.

### 3.1.3 LOKALISATION DER eNOS IN KUTANEN WUNDEN IM TIERMODELL

Um die extravaskuläre Expression der eNOS zu klären, wurde deren Lokalisation im Wundgewebe untersucht. Die erforderliche Immunhistochemie wurde mit Gefrierschnitten von 5-Tage- und 7-Tage-Wunden durchgeführt. Es ließen sich hierbei insbesondere die Keratinozyten der Wundränder, die Granularschichten des Neo-Epithels sowie Haarfollikel als weitere zelluläre Orte der eNOS Expression (ABB. 4A, E, F und G) nachweisen. Interessanterweise zeigten sich innerhalb der Epithelien nur die suprabasalen Keratinozyten für die eNOS positiv.

Es wurden mehrfache Verifikationen bezüglich der Spezifität des eingesetzten Anti-eNOS-Antikörpers vorgenommen: Die parallele Färbung der Endothelzellschichten der Gefäße innerhalb des Granulationsgewebes diente als positive Kontrolle. (ABB. 4C). Zusätzlich konnte eine eNOS-spezifische Immunreaktivität auch in kollabierten Mikrogefäßen direkt unterhalb der Wundrandepithelien (ABB. 4A) gesehen werden. In seriellen Mikrotom-Schnitten konnte mittels paralleler immunhistochemischer Färbung mit Anti-eNOS- und Anti-CD31-Antiserum die Identität des Gefäßendothels bestätigen (hier nicht dargestellt). Darüber hinaus ließ sich unter Verwendung eines spezifischen Blockierungspeptids die Anfärbung der eNOS komplett aufheben (ABB. 4A und B, ABB. 4C und D).



**Abb. 4 Zelluläre Quellen der eNOS im Wundgewebe.** Serielle Wundschnitte an Tag 5 (A-E) und Tag 7 (F, G) wurden von C57BLKS-Mäusen gefertigt. Die Gefrierschnitte wurden mit eNOS-Antiserum inkubiert. Markante immun-positive Färbungen innerhalb der Schnittpräparate sind durch schwarze Pfeile hervorgehoben. Die Spezifität des eNOS-spezifischen Antikörpers (A, C, E, F, G) wurde in unmittelbar benachbarten seriellen Gewebeschnitten bestätigt unter Prä-Inkubation des eNOS-Antiserums mit spezifischem Blockierungspeptid (B, D). Legende: d Dermis, e Epidermis, g Granulationsgewebe, he Hyperproliferatives Epithel, hf Haarfollikel, ne Neo-Epidermale Zunge, ve Blutgefäß. Die Vergleichsbalken entsprechen 100 µm in den Schnitten A, B, F, H und I, 50 µm für E und G sowie 25 µm für C und D)

### 3.2 EXPRESSION DER eNOS IN KERATINOZYTEN *IN VITRO*

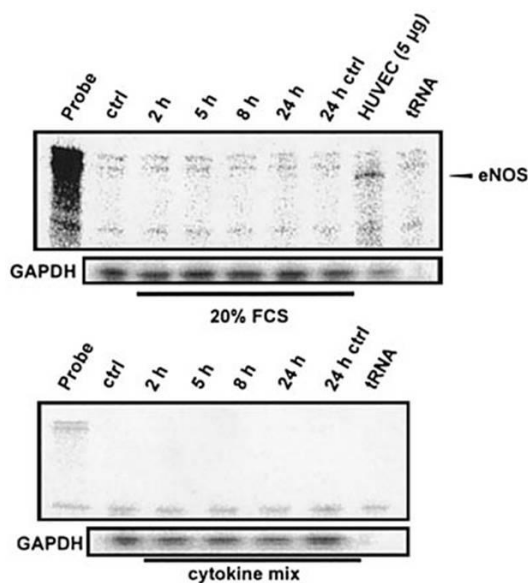
Aufgrund der *in vivo* gefundenen eNOS-Nachweise in Keratinozyten wurden zusätzliche Zellkultur-Experimente angeschlossen. Die humane Keratinozyten-Zellreihe HaCaT diente im Rahmen der vorliegenden Arbeit als *In-vitro*-Modell. Die Untersuchungen an diesen Keratinozyten erlaubte eine selektive und definierte Zellstimulation.

### 3.2.1 EXPRESSION DER eNOS mRNA IN KERATINOZYTEN *IN VITRO*

Die *In-vitro*-Detektion von eNOS Transkript erfolgte für humane primäre epidermale Keratinozyten (HUVEC) und die immortalisierte aneuploide humane Keratinozyten-Zellreihe HaCaT [BOUKAMP et al. 1988].

#### I. DETEKTION VON eNOS mRNA IN KERATINOZYTEN MIT RPA

In den hier durchgeführten Analysen konnte bei niedriger RNA-Gesamtmenge eNOS mRNA deutlich in HUVEC nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ließ sich eNOS mRNA trotz hoher Mengen zellulärer Gesamt-RNA mittels der RPA nicht in HaCaT nachweisen. Dies gelang auch nicht nach Stimulation mit 20 % (v/v) fetalem Kälberserum (ABB. 5, oben), definiertem Zytokin-Mix (ABB. 5, unten), 500  $\mu$ M GSNO, 10 ng/ml TGF- $\beta$  und KGF. In unstimulierten HaCaT-Zellen (nicht gezeigt) war mit dieser Methode ebenfalls kein Nachweis zu erbringen. Bei fehlendem Nachweis von eNOS Transkript in der spezifischen und direkten RPA (ABB. 5) wurde eine sensitivere Diagnostik angeschlossen.

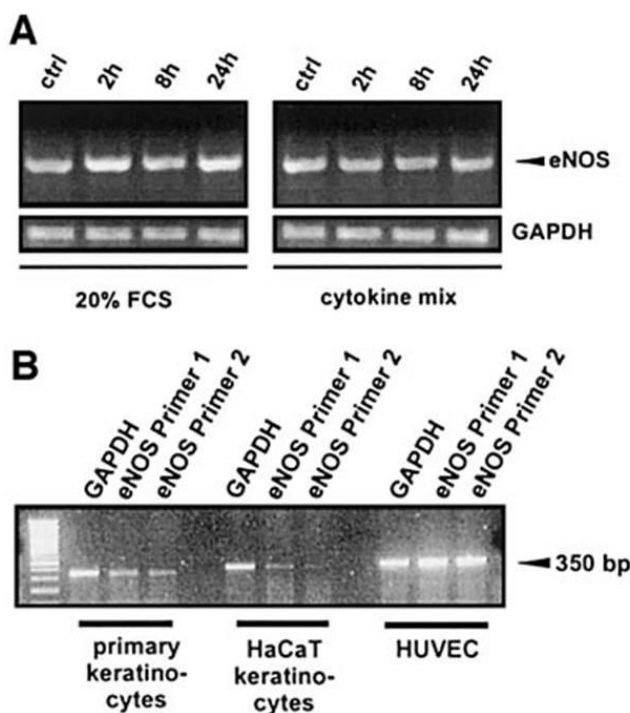


**Abb. 5** Bei zu niedriger Sensitivität konnte eNOS mRNA mittels RPA in humanen Keratinozyten *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Konfluente, quieszente humane Keratinozyten (HaCaT) wurden für die angegebenen Zeiträume mit 20 % (v/v) fetalem Kälberserum (20 % FCS), definierter Mischung aus proinflammatorischen Zytokinen (Zytokin-Mix: 2 nM IL-1 $\beta$ , 2 nM TNF- $\alpha$ , 100 U/ml IFN- $\gamma$ ). Zelluläre Gesamt-RNA (50  $\mu$ g) aus kultivierten Zellen wurde mittels RPA hinsichtlich der Expression von eNOS mRNA untersucht. 5  $\mu$ g der isolierten zellulären Gesamt-RNA aus humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVEC) dienten als Positivkontrolle für die eNOS mRNA. GAPDH diente als Ladekontrolle. Spezifische Bandenmuster sind durch Pfeil markiert.

#### II. DETEKTION VON eNOS mRNA IN KERATINOZYTEN MITTELS RT-PCR



Mit Bezug auf die limitierte Aussagekraft der RPA wurde die methodisch sensitivere RT-PCR zum Nachweis von eNOS mRNA eingesetzt. Hierbei konnte nun eine konstitutive Expression von eNOS mRNA sowohl in HaCaT Keratinozyten, als auch in proliferierenden humanen epidermalen Keratinozyten nachgewiesen werden (ABB. 6A, B). Die Identität der Banden als eNOS cDNA konnte durch Klonierung des PCR-Produkts und nachfolgende Sequenzierung gesichert werden. Die Expression der eNOS mRNA erschien hierbei konstitutiv, insofern als unter Stimulation mit definiertem Zytokin-Mix (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) die eNOS mRNA in konfluent gewachsenen HaCaT Keratinozyten nicht alterierte (ABB. 6A).



**Abb. 6 Konstitutive eNOS Expression in Keratinozyten *in vitro*.**

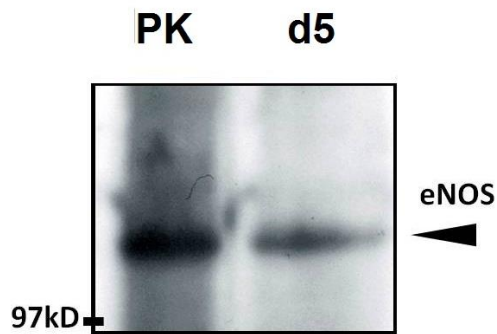
(A) Quieszente humane Keratinozyten (HaCaT) wurden mit fetalem Kälberserum (20 % v/v) bzw. einer fixen Zytokinmischung (2 nM IL-1 $\beta$ , 2 nM TNF- $\alpha$ , 100 U/ml IFN- $\gamma$ ) über definierte Zeiträume stimuliert. Synthetisierte komplementäre DNA zu isolierter zellulärer RNA diente als Matrize für die Amplifikation spezifischer eNOS Sequenzen. Die durch nachfolgende Klonierung und Sequenzierung bestätigte eNOS-spezifische Bande ist durch Pfeil markiert. GAPDH wurde als Equilibrierungskontrolle verwendet. (B) cDNA aus exponentiell wachsenden primären humanen Keratinozyten und HaCaT Keratinozyten wurden auf eNOS Expression mit zwei unterschiedlichen Primer-Paaren analysiert. cDNA aus HUVEC-Zellen wurde als Positivkontrolle verwendet. Die durch Klonierung und Sequenzierung bestätigten eNOS-spezifische Banden sind durch Pfeil markiert.

**3.2.2 EXPRESSION DES eNOS PROTEINS IN KERATINOZYTEN *IN VITRO***

Die *In-vitro*-Detektion von eNOS Protein wurde mit dem Immunoblot durchgeführt. 50 $\mu$ g Protein aus Keratinozyten wurde im Westernblot eingesetzt. Die gleiche Proteinmenge aus 5-Tage-Wunden von C57BLKS-Mäusen (n = 8 Wunden) diente als Positivkontrolle. Polyklonales Anti-eNOS-Antiserum und der Sekundärantikörper wurden wie bei den Tierexperimenten verwendet (Erstantikörper: 1:200, Sekundärantikörper: 1:2500). In primären humanen Keratinozyten konnte eNOS Protein klar nachgewiesen werden (ABB. 7). Im Gegensatz dazu konnte die eNOS in Proteinlysaten aus HaCaT Keratinozyten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es ist davon auszugehen, dass die spezifische Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Westernblot lag.

**Abb. 7 Nachweis von eNOS Protein in Keratinozyten *in vitro*.**

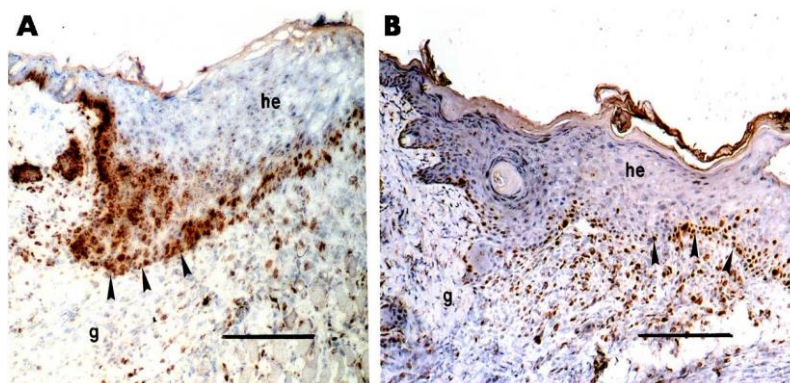
Die Proteine wurden aus exponentiell wachsenden humanen primären epidermalen Keratinozyten (PK), ebenso aus 5-Tage-Wunden (n = 8 Wunden) aus c57BLKS Mäusen (d5) gewonnen. 50  $\mu$ g des Proteinisolates aus primären Keratinozyten sowie



### 3.3 DIE ROLLE DER eNOS IN GESTÖRTER WUNDHEILUNG

#### 3.3.1 WUNDHEILUNG IN eNOS-DEFIZIENTEN MÄUSEN

Zur Klärung einer möglichen physiologischen Rolle der eNOS in der Wundheilung wurden isolierte 5-Tage-Wunden aus eNOS-defizienten Mäusen ( $n = 3$  Tiere) histologisch untersucht. Es konnte hierbei eine Reduktion des proliferativen Epithels der Wundränder histomorphologisch gesehen werden. Dies wird durch zwei repräsentative Mikrotom-Schnittpräparate mit einer Immunfärbung gegen den Proliferationsmarker Ki-67 [GERDES et al. 1984] demonstriert (ABB. 8A und B). Während das hyperproliferative Epithel im Verlauf der normalen Wundheilung tief in das darunterliegende Granulationsgewebe vordringt (ABB. 8A), zeigen Wunden aus eNOS-Knockout-Mäusen eine signifikant reduzierte und abgeflachte epitheliale Zunge oberhalb der Wundebene (ABB. 8B). Als wesentlicher Befund lässt sich die verminderte Ausbildung des Wundrandepithels in eNOS-Knockout-Mäusen feststellen. Diese ist mit einem Verlust an Proliferationskapazität der Keratinozyten (gemessen mit Ki-67) assoziiert (ABB. 8B).



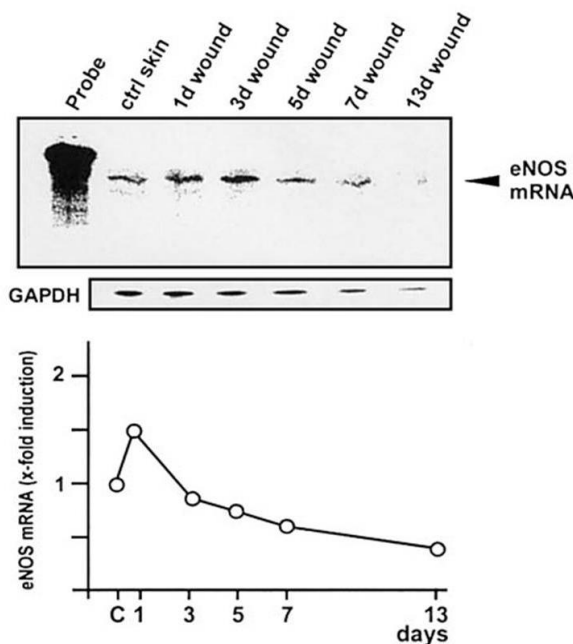
**Abb. 8 Funktionelle Implikationen in eNOS-defizienten Mäusen.** Serielle Mikrotom-Gefrierschnitte wurden aus 5-Tage-Wunden von (A) C57BL/6J Wildtyp-Mäusen und (B) eNOS (-/-)-defizienten Mäusen (C57BL/6J) gewonnen und immunhistologisch mit Antiserum gegen murinen Proliferationsmarker Ki-67 (A, B) gefärbt. Die Größenbalken entsprechen 100  $\mu$ m. Legende: g Granulationsgewebe, he Hyperproliferatives Epithel.

#### 3.3.2 EXPRESSION DER eNOS IM DIABETISCHEN WUNDMODELL

Es wurde nachfolgend ein diabetisches Wundmodell zur Klärung der funktionellen Rolle der eNOS in der Wundpathophysiologie untersucht. Hierzu wurden C57BLKS/J-*m* *+/+* *Lepr<sup>db</sup>* (*db/db*)-Mäuse verwendet. Diese Tiere sind durch eine, analog dem Diabetes mellitus Typ 2, hyperglykämie Stoffwechsellage bei Insulinresistenz gekennzeichnet und zeigen neben einem Syndrom aus Infertilität, Adipositas und Hyperphagie die bereits von COLEMAN [1982] beschriebene gestörte kutane Wundheilung.

**I. EXPRESSION DER eNOS MRNA IN DIABETISCH GESTÖRTER KUTANER WUNDHEILUNG**

RNA aus exzisionalen Wunden in *db/db*-Mäusen wurden zu vier definierten Zeitpunkten nach Wundsetzung isoliert und mittels RPA untersucht. Für jeden experimentellen Zeitpunkt wurden 16 Wunden (*n* = 16) von vier unterschiedlichen Tieren analysiert. Die intakte Haut unverwundeter Mäuse wurde zur Kontrolle eingesetzt. In den diabetischen Tieren ließ sich bemerkenswerterweise die für die Wundheilung im Wildtyp gefundene moderate eNOS mRNA Induktion nicht nachweisen. Vielmehr zeigte sich nach einer geringeren Induktion (etwa 1,5-fach) in der Frühphase (ABB. 9, Tag 1) ein Verlust der eNOS mRNA bis unter das Niveau der Kontrollhaut in der Inflammationsphase (ABB. 9, ctrl skin).



**Abb. 9 Regulation der eNOS mRNA in diabetisch gestörter Wundheilung.** 50 µg zellulärer Gesamt-RNA wurden aus verletzter und gesunder Rückenhaut (Tage 1, 3, 5, 7 und 13 nach Verletzung) von C57BLKS/J-*m* *+/+* *Lepr<sup>db</sup>* (*db/db*) diabetischen Mäusen gewonnen. Die RNA-Extrakte wurden mittels RPA hinsichtlich der Expression eNOS-spezifischer mRNA analysiert. Ein repräsentatives Gel ist im oberen Abschnitt gezeigt. GAPDH mRNA wurde als Ladekontrolle verwendet. Der relative Expressionsverlauf anhand Vermessung des radioaktiv markierten Gels in PhosphoImager (Fuji, Tokio, Japan) ist im unteren Abschnitt wiedergegeben. Jedem experimentellen Zeitpunkt entsprechen insgesamt *n* = 16 Wunden aus vier unabhängigen Tierversuchen. Ctrl skin bezieht sich auf unverletzte Kontrollhaut. Spezifisches Signal ist mit Pfeil markiert.

**II. EXPRESSION DES eNOS PROTEINS IN DIABETISCH GESTÖRTER KUTANER WUNDHEILUNG**

Der Immunoblot wurde unter den gleichen Bedingungen mit identischem Anti-eNOS-Antiserum (Santa Cruz, Heidelberg) wie in den vorhergehenden Experimenten durchgeführt. In Übereinstimmung mit den für die eNOS mRNA gefundenen Daten zeigte sich (ABB. 10) eine weitgehend fehlende eNOS Proteinexpression. ABB. 10 (oben) zeigt diese Abwesenheit der eNOS Expression in diabetischen *db/db*-Mäusen. Zeitgleich zeigt sich ein deutliches Defizit



## 4 DISKUSSION

### 4.1 GESUNDHEITSÖKONOMISCHE RELEVANZ GESTÖRTER KUTANER WUNDHEILUNG

Gestörte kutane Wundheilung entsteht aufgrund von Defiziten der zeitlichen und räumlichen Abfolge der Geweberegeneration [DUBAY & FRANZ, 2003]. Sie kommt klinisch in drei Hauptformen vor: venöse Ulzera, diabetische Ulzera und Dekubitalulzera [FALANGA, 1993]. Die Wundheilungsstörung kann zu einem unvollständigen, bindegewebigem Wundverschluss führen [KRÜGER, 2001]. Funktionelle Störungen, wie dermatogene Kontrakturen, können die klinische Folge sein.

Chronische Wunden und Wundheilungsdefizite stellen vor dem Hintergrund des demographischen Wandels eine sozioökonomisch relevante Größe dar [GERMANN, 2008]. Die Prävalenz chronischer Wunden in Deutschland wird auf 2,5 - 3 % der Bevölkerung [JANßEN & BECKER, 2008; DEBUS ET AL. 2003], geschätzt. Das Vorliegen chronischer Wunden ist mit einer im Allgemeinen ungünstigen Prognose verbunden und stellt eine erhebliche medizinische Herausforderung dar. Für diese bestehen derzeit nur in begrenztem Umfang effektive Behandlungsoptionen.

Epidemiologische Daten belegen, dass etwa 80 % der chronischen Wunden als venöse oder gemischt venös-arterielle Ulzera entstehen. Neuropathische Ulzera treten vorwiegend im Rahmen eines Diabetes mellitus auf [VALENCIA et al. 2001].

Hinzu kommt außerdem eine hohe Zahl von Patienten mit Dekubitalulzera. Nach Schätzung des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2007 ist in Deutschland bei etwa 550.000 Patienten von zumindest erhöhtem Dekubitusrisiko auszugehen. Die jährliche Inzidenz des Dekubitus wird auf mindestens 400.000 beziffert [ANDERS et al. 2010]. Der veränderte Altersaufbau stellt in diesem Kontext einen wesentlichen kausalen Faktor dar. Er impliziert eine steigende Zahl polymorbider, geriatrischer Patienten mit chronischen Wundheilungsstörungen und nachfolgender Einschränkung von Lebensqualität und Teilhabe sowie intensivem Therapiebedarf [RUCKLEY, 1997].

Die jährlichen Therapiekosten chronischer Wunden werden in Deutschland auf über 4 Milliarden Euro beziffert [DEBUS et al. 2003], in den Vereinigten Staaten liegen die assoziierten Therapiekosten bei etwa 25 Milliarden US-Dollar [SEN et al. 2009].

Vor dem Hintergrund einer hohen sozio-ökonomischen Relevanz chronischer Wunden erscheinen effiziente Therapiekonzepte vonnöten.

## 4.2 NO REGULIERT DIE WUNDHEILUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Rolle der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase in der kutanen Wundheilung untersucht. Obwohl frühere molekulare Arbeiten sich nicht explizit mit Stickstoffmonoxid als Botenstoff der Wundheilungsregulation beschäftigten [Moulin, 1995], wurde eine Beteiligung L-Arginin-abhängiger Enzyme in der kutanen Wundheilung aufgrund klinischer Studien schon lange angenommen. So führte diätetische Supplementierung von L-Arginin bei Patienten zu verbesserter Immunreaktion und beschleunigter Wundheilung [BARBUL et al. 1990; KIRK et al. 1998]. Diese klinischen Arbeiten waren vereinbar mit tierexperimentellen Studien, in denen L-Arginin-depletierte Kost mit verzögerter Wundheilung bei Ratten korreliert war [SEIFTER et al. 1978]. Aktuellere klinische Daten belegten für die exogene Applikation mit NO-Donoren eine signifikant gesteigerte Wundheilung beim Menschen [KEEFER et al. 1996].

Weiteren Studien konnten iNOS-abhängiges NO als wichtigen Mediator der kutanen Wundheilung identifizieren. Im Tierexperiment ist die iNOS während der kutanen Wundheilung in Mäusen deutlich induziert [FRANK et al. 1998]. Diese Induktion ist am stärksten während der Inflammationsphase ausgeprägt, in der Granulation, Angiogenese und Reepithelialisierung stattfinden. In diesem Zusammenhang ist es wichtig festzuhalten, dass die Expression der iNOS [MONCADA et al. 1991] während der akuten Inflammation nicht auf die Immunzellen begrenzt ist, sondern insbesondere auch von den Keratinozyten der Wundränder ausgeht. Das Neo-Epithel trägt somit posttraumatisch in relevantem Umfang zur iNOS-abhängigen NO-Bildung bei [FRANK et al. 1998].

NO ist unmittelbar an Reparaturvorgängen beteiligt: Die Transfektion mit iNOS cDNA in kutanen Wunden bei Ratten führte zu signifikant gesteigerter Kollagenbildung [THORNTON et al. 1998]. Die adenoviral mediierte Expression humaner iNOS cDNA führte auch in Wunden iNOS-defizienter Mäuse zur Verbesserung der Gewebereparatur [YAMASAKI et al. 1998]. Umgekehrt resultierte bei Inhibition der enzymatischen iNOS Aktivität mit dem spezifischen Inhibitor L-NIL ein erheblicher Verlust der proliferativen Kapazität der Keratinozyten und eine nachfolgend schwer gestörte Reepithelialisierung in der kutanen Wundheilung in Mäusen [STALLMEYER et al. 1999].

#### 4.2.1 MODERATE INDUKTION DER eNOS IN DER KUTANEN WUNDHEILUNG

Obwohl die vorliegende Arbeit eine funktionelle Bedeutung für eNOS-abhängiges NO in der kutanen Wundheilung stark impliziert, bestanden bislang kaum Daten zu Kinetik und lokaler Expression der eNOS im Wundheilungsverlauf.

Die eNOS galt lange als konstitutiv exprimiertes Enzym. In den vergangenen Jahren wurde allerdings zunehmend deutlich, dass die eNOS unter bestimmten Konditionen einer moderaten Expressionsregulation unterliegt [FÖRSTERMANN et al. 1998]. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine mäßige Induktion des eNOS Proteins in den Phasen hoher proliferativer Aktivität. Eine aktuelle Arbeit von LUO et al. [2004] bestätigte die Ergebnisse einer signifikanten Modulation der eNOS in kutanen Exzisionswunden gesunder Mäuse nochmals. Die Induktion der eNOS in der kutanen Wundheilung stellt offenbar ein weiteres Beispiel variabler eNOS Expression dar.

Die Haut ist ein intensiv vaskularisiertes Organ. Erwartungsgemäß konnte die eNOS bereits in intakter Haut gesunder Mäuse nachgewiesen werden. Aufgrund der Resultate dieser Arbeit konnte die maximale eNOS Proteinexpression in der Frühphase der Wundheilung gemessen werden (ABB. 3). Es zeigte sich jedoch gerade keine Korrelation zur Angiogenese, so dass von einer zusätzlichen extravaskulären eNOS Expression ausgegangen werden konnte. Dies bestätigte sich im Verlauf der weiteren Untersuchungen mit Nachweis der eNOS in Keratinozyten.

#### 4.2.2 KERATINOZYTEN-ABHÄNGIGE EXPRESSION DER eNOS *IN VITRO* UND *IN VIVO*

In der murinen Wundsituation wurden Keratinozyten als zusätzliche Quelle der eNOS Proteinexpression neben den Gefäßendothelien des Granulationsgewebes gefunden. Insbesondere die Keratinozyten der Wundränder und der Haarfollikel zeigten eine positive Färbung für eNOS in der Immunhistochemie.

In der Folge sollten die *In-vivo*-Befunde durch *In-vitro*-Diagnostik verifiziert werden. In diesem Punkt konnte die Arbeit eine zusätzliche Klärung herbeiführen. Für die humane Epidermis war die eNOS Expression bereits früher publiziert worden [SAKAI et al. 1996; ORMEROD et al. 1998]. Untersuchungen von JACKSON et al. [1998] negierten jedoch diese Ergebnisse. Hier konnten weder in Keratinozyten aus humanem Präputium, noch in der humanen Keratinozyten-Zellreihe HaCaT die eNOS nachgewiesen werden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte, begleitend zu den *In-vivo*-Ergebnissen, eNOS mRNA und eNOS Protein sowohl in primären humanen Keratinozyten, als auch eNOS mRNA in HaCaT Keratinozyten detektiert werden. In dieser Arbeit konnte eNOS mRNA mit der RPA nicht objektiviert werden, jedoch in der RT-PCR detektiert werden. Dies verweist auf niedrige Transkriptionsraten der eNOS in HaCaT Keratinozyten. Dies deckt sich mit den von ORMEROD et al. [1998] und SAKAI et al. [1996] publizierten Daten, bei denen eNOS-spezifische cDNA aus exponentiell wachsenden primären humanen Keratinozyten und HaCaT Keratinozyten amplifiziert werden konnte. Die Expression von eNOS Transkript in HaCaT wurde von NAKAI und Kollegen [2003] nochmals bestätigt. Ein Nachweis für eNOS Protein konnte im Immunoblot bei primären humanen Keratinozyten hier geführt werden, während HaCaT-Keratinozyten die eNOS mutmaßlich unterhalb der Detektionsgrenze des eingesetzten Assays exprimierten. SOUZA et al. [2001] wiesen eNOS Protein jedoch in Keratinozyten-Zellreihen nach.

Die vorliegenden *In-vivo*-Daten beinhalten einen weiteren interessanten Aspekt: In der immunhistochemischen Färbung wiesen lediglich die suprabasalen epidermalen Zellschichten eine positive Markierung für die eNOS auf. Diese suprabasale Zuordnung steht im Kontrast zur Expression der iNOS, die auf die basalen Zellen des Neo-Epithels und der hoch mitogenen Keratinozyten des hyperproliferativen Epithels begrenzt ist [FRANK et al. 1998]. Zusammenfassend lässt sich als relevantes Ergebnis festhalten, dass durch die vorliegenden wie auch frühere Publikationen eine zusätzliche Quelle für eNOS in Keratinozyten nachgewiesen werden kann.

#### **4.2.3 FUNKTIONELLE IMPLIKATIONEN: DIE WUNDHEILUNG IN eNOS-DEFIZIENTEN MÄUSEN**

LEE et al. [1999] publizierten bereits früher verzögerten Wundverschluss und reduzierte Wundfestigkeit in eNOS-defizienten Mäusen. Als potenzieller Mechanismus wurde ein gestörtes endotheliales Zellwachstum mit nachfolgend reduzierter Angiogenese in diesen Tieren beobachtet.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen bei reduzierter Aktivität der eNOS insbesondere eine Beeinträchtigung der Keratinozytenproliferation. Hier wurde signifikant reduziertes Wundrandepithel bei eNOS-defizienten Mäusen gefunden. Relevant erscheint an dieser Stelle, dass die Expression der iNOS in den basalen Keratinozyten des Wundrandepithels lokalisiert ist [FRANK et al. 1998], während die eNOS auf die suprabasalen Schichten der Epidermis



begrenzt ist. Dieses intraepitheliale Verteilungsmuster der beiden Isoenzyme könnte der Generierung eines kontinuierlichen NO-Gradienten dienen und für die Regulation der Keratinozytenproliferation im regenerierenden Wundepithel einen Stellenwert haben. Die mitogene Potenz des NO wurde bereits aufgrund von *In-vitro*-Analysen gezeigt, bei denen die Zellen auf niedrige Konzentrationen von NO mit Proliferation reagierten [KRISCHEL et al. 1998; FRANK et al. 2000a]. Darüber hinaus beeinflusst NO direkt die Expression relevanter Gene: Der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) und sowie die von Keratinozyten sezernierten Chemokine unterliegen der Regulation durch iNOS-abhängiges NO *in vitro* und *in vivo* [FRANK et al. 1999; FRANK et al. 2000b; WETZLER et al. 2000]. In diesem Zusammenhang diskutierten NOIRI und Kollegen [1996; 1997] die Bedeutung von NO im Sinne eines essentiellen Botenstoffes für die räumliche und zeitliche Koordinierung des lokomotorischen Status der Epithelzellen. Die Balance zwischen Proliferationsförderung und Apoptoseinduktion, die von NO aufrecht erhalten wird, könnte entscheidenden Einfluss auf die Wundheilung haben. NO könnte hierbei für die Induktion eines promigratorischen Phänotyps der Keratinozyten eine Bedeutung zukommen. Diese Hypothese wird durch die verminderte Ausbildung des ansonsten zellreichen und tief in das Granulationsgewebe reichenden Wundrandepithels gestützt, welche in eNOS-defizienten Mäusen beobachtet werden konnte. Es soll jedoch betont werden, dass das Ausmaß der Reduktion epithelialer Mitogenität verglichen mit der Situation unter iNOS Inhibition erheblich geringer ausgeprägt ist. Dort resultierte ein beinahe 80 %-iger Verlust an Keratinozytenproliferation während der Wundheilung [STALLMEYER et al. 1999]. Trotz der hohen Relevanz iNOS-abhängiger NO-Bildung [MONCADA et al. 1991] verweisen die mit dieser Arbeit vorliegenden Daten auf eine Mitbeteiligung von eNOS-abhängigem NO zur Keratinozytenproliferation in der kutanen Wundheilung *in vivo*.

#### **4.2.4 ASSOZIATION VERÄNDERTER eNOS EXPRESSION MIT GESTÖRTER WUNDHEILUNG IN DIABETISCHEN MÄUSEN**

Die Wundheilung in genetisch diabetischen Mäusen ist gestört [COLEMAN, 1982; WETZLER et al. 2000] und ist durch eine deutlich verlängerte Inflammationsphase mit vermehrter Akkumulation von Immunzellen, reduzierter Granulation und verminderter Epithelialisierung charakterisiert. Mit diesen Befunden vereinbar wurde in eNOS-defizienten Mäusen eine reduzierte Mitoseaktivität der Keratinozyten im Wundrandepithels gezeigt. Die Expression der eNOS war in Wunden diabetischer (*db/db*) Mäuse im Vergleich zum normalen

Wundheilungsverlauf deutlich reduziert. In unverletzter Haut diabetischer Tiere konnte sie bereits kaum nachgewiesen werden. Es konnte kein relevanter Unterschied zwischen diabetischen und Wildtyp-Tieren im Ausmaß der Angiogenese gefunden werden. Es zeigte sich, im Gegenteil, vergleichbare Signalintensitäten für den pan-endothelialen Marker CD31 in unverletzter Haut in beiden Gruppen (ABB. 3 I und ABB. 10, ctrl skin). In diesem Kontext diskutierten KÄMPFER et al. [2001] eine vaskuläre Dysregulation mit Einfluss auf Integrität und Gefäßstabilität im diabetischen Wundmodell auf der Grundlage einer veränderten Expression von Angiopoietin-1 und -2.

In einer Publikation von LUO et al. [2004] wurde eine deutlich verzögerte Wundheilung in Streptozotocin-induziertem Typ-I-Diabetes in Mäusen gezeigt. In Übereinstimmung mit den hiesigen Befunden bestand eine deutlich reduzierte eNOS Expression in diesen diabetischen Wunden *in vivo*. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte durch topische Applikation eines eNOS Konstrukts auf Wunden genetisch diabetischer Mäuse eine Verbesserung der Wundheilung dokumentieren. Es ist daher naheliegend, einen kausalen Zusammenhang zwischen reduzierter eNOS Expression bzw. vermindertem eNOS-abhängigem NO und diabetisch gestörter Wundheilung anzunehmen.

### **4.3 THERAPEUTISCHE KONSEQUENZEN UND AUSBLICK**

Trotz deutlicher Verbesserungen des therapeutischen Wundmanagements bei, existieren nur wenige Studien, die die zugehörigen Phänomene auf molekularer Basis betrachten. Es bestehen gute Kenntnisse über die Korrelation endogen-metabolischer Variablen und vaskulärer Faktoren der Wundheilung. Die exakten pathophysiologischen Mechanismen sind allerdings nur unvollständig geklärt.

Die Applikation spezifischer Proteinmediatoren in gestörter Wundheilung brachte bisher noch keine überzeugenden Innovationen in der Therapie chronischer Wunden. Der für die Wundheilung im Menschen als vielversprechend publizierte [BROWN ET AL. 1989] und für Keratinozyten mitogene epidermale Wachstumsfaktor (EGF) erlangte aktuell keine klinische Bedeutung. Möglicherweise stellen andere Proteinmediatoren zukünftig eine therapeutische Option dar [LANDI et al. 2003]. Aufgrund der noch unzureichenden Datenlage kann die Wirksamkeit von Wachstumsfaktoren in der Therapie chronischer Wunden allerdings nicht als belegt gelten [MARGOLIS & LEWIS, 1995]. Mangelnde Effekte exogen applizierter Proteinfaktoren könnten im Zusammenhang mit erhöhter Proteaseaktivität im Wundexsudat mit enzymatischer Inaktivierung stehen [YAGER et al. 1997]. Auch eine Rezeptorinaktivierung, wie

sie von GOREN et al. [2006] in gestörtem Gewebe gezeigt wurde, könnte positive Effekte von Wachstumsfaktoren stören und deren therapeutische Wirksamkeit begrenzen.

Mit Bezug auf die Daten dieser Arbeit nimmt die Identifizierung von Keratinozyten-spezifischen Mitogenen eine mögliche Schlüsselrolle für innovative Therapiekonzepte ein. Der starke Effekt des NO in der Wundheilung und die im Rahmen gestörter Wundheilung reduzierte NO-Bildung legen Behandlungsoptionen durch NO- bzw. NOS-Modulation nahe [SCHWENTKER et al. 2002]. In diesem Kontext scheint NO ein Zielmolekül von besonderem Interesse zu sein, da es hinsichtlich der chemischen Struktur und bezogen auf seinen differenten Wirkmechanismus von Proteinfaktoren grundlegend abweicht.

Eine partielle Verbesserung des Wundverschlusses sowie die Normalisierung reduzierter NO-Konzentrationen konnte im Wundgewebe diabetischer Nagetiere einerseits durch Supplementierung mit L-Arginin [WITTE et al. 2002a], andererseits auch durch topisch appliziertes Molsidomin als NO-Donor erreicht werden [WITTE et al. 2002b]. Eine Insulintherapie im diabetischen Wundmodell führte nicht nur zu verbesserter Kollagenbildung und Wundstabilität, sondern auch zu erhöhter Verfügbarkeit von NO im Wundgewebe. Dies gibt zusätzliche Hinweise darauf, dass NO als relevanter Modulator der Wundpathophysiologie zu betrachten ist. Hier könnten Therapieoptionen insbesondere für Diabetes-assoziierte Wundheilungsdefizite bestehen. Selektive Inhibitoren der NOS sind hierzu verfügbar [SOUTHAN & SZABO, 1996].

Eine erfolgreiche Transfektion des eNOS Gens durch einen adenoviralen Vektor (AdeNOS) wurde bereits beschrieben [KULLO et al. 1997]. BREEN und Kollegen [2008] zeigten für ein AdeNOS enthaltendes Fibringerüst im Wundmodell signifikant erhöhte eNOS Expression an Tag 14 der Wundheilung. Zeitgleich bestanden eine beschleunigte Epithelialisation. In der gleichen Arbeit wurde ein direkter Bezug zwischen der induzierter eNOS Expression und der verbesserten Reepithelialisierung gesehen.

Die hier vorliegende Arbeit zeigte eine Induktion der eNOS in murinen Wunden. Neben dem Gefäßendothel konnten epidermale Keratinozyten als zusätzliche Quelle der eNOS Expression während der kutanen Wundheilung identifiziert werden. Darüber hinaus war die eNOS Expression in diabetisch gestörter Wundheilung signifikant reduziert. In eNOS-defiziente Mäusen bestand eine reduzierte Proliferationskapazität der Keratinozyten der Wundränder. Phasenabhängig könnte die selektive Regulation von NO und seiner Synthesen neue Therapieansätze bei gestörter bzw. chronischer Wundsituation darstellen. Zu diesem Aspekt trägt die vorliegende Arbeit mit Hinblick auf ein grundlegendes Verständnis bei. Die

vorgelegten Daten legen deutlich nahe, dass eNOS-abhängige NO-Aktivität einen Beitrag innerhalb der diversen Mediatoren darstellt, welche die kutane Wundheilung regulieren.

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

### 5.1 DEUTSCHE VERSION

Die kutane Wundheilung hat die funktionelle Wiederherstellung der Gewebeintegrität nach Schädigung zum Ziel. Sie erfolgt im Sinne einer gesteuerten Kaskade von sequentiellen Ereignissen. Diese umfassen die Hämostase, die Inflammation, die Granulation, die Reepithelialisierung und das Remodeling. Die zugrundeliegenden Prozesse werden von einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. Neben diesen Proteinmediatoren ist eine Beteiligung löslicher Kleinmoleküle, wie dem Stickstoffmonoxid (NO), für die Regulation der Wundheilung bekannt.

NO ist ein flüchtiges Radikal, welches enzymatisch durch die Isoformen der Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert wird. NO entfaltet ein breites Spektrum physiologischer und pathophysiologischer Effekte. Dabei ist für die induzierbare NOS (iNOS) eine relevante Beteiligung an epithelialen Prozessen hinreichend dokumentiert. FRANK et al. [1998] konnten eine starke Induktion der iNOS während der kutanen Wundheilung sowie einen funktionellen Zusammenhang zu den NO-Wirkungen auf Keratinozyten zeigen, die in Verbindung mit der enzymatischen Funktion der iNOS stehen.

Eine gestörte kutane Wundheilung wurde auch für Mäuse mit Defizienz der endothelialen NOS (eNOS) beschrieben. Die Beteiligung der eNOS an der Wundheilung war bislang jedoch weitgehend unklar. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Expressionsmuster der eNOS im Wundheilungsverlauf in gesunden und diabetischen Mäusen aufzuzeigen.

In einem kutanen Wundheilungsmodell in Mäusen konnte die Expression von eNOS mRNA und Protein gezeigt werden. Die Expressionskinetik zeigte eine moderate Induktion der eNOS in den frühen Wundheilungsphasen. Diese ließ sich nicht mit einer endothelialen Expressionsänderung erklären, wie es Untersuchungen mit CD31 als pan-endotheliale Marker nahe legten.

Immunhistochemisch konnten Gefäßendothelien des Granulationsgewebes, Keratinozyten der Wundränder, das sich ausbildende Neo-Epithel und Haarfollikel als zusätzliche Quellen der eNOS Proteinexpression in Wunden identifiziert werden. Die eNOS Färbung zeigte sich dabei begrenzt auf die suprabasal gelegenen Keratinozyten der benannten Epithelien. Die Expression der eNOS in Keratinozyten konnte schließlich auch in kultivierten primären humanen Keratinozyten und HaCaT Keratinozyten auf mRNA-Ebene bestätigt werden.

Darüber hinaus zeigte sich ein funktioneller Zusammenhang zwischen eNOS Expression und epithelialer Proliferation: So bildeten eNOS-defiziente Mäuse deutlich reduzierte Wundrandepithelien aus, die durch eine verminderte Proliferation der Keratinozyten charakterisiert waren. Untersuchungen an diabetischen Mäusen (db/db) stützten diesen funktionellen Zusammenhang. In den Expressionskinetiken in diabetischen Tieren zeigte sich eine deutlich reduzierte Expression von eNOS mRNA und Protein vor allem in den späten Wundheilungsphasen.

In der vorliegenden Arbeit werden die zeitliche Expression der eNOS, die Detektion der eNOS in Wunden sowie deren Alteration in diabetischen Mäusen mit Bezug auf ihre funktionelle Bedeutung in der kutanen Wundheilung abschließend diskutiert.

## 5.2 ENGLISCHE VERSION

Cutaneous wound repair aims for the functional recovery and integrity of damaged tissue after injury. Skin repair represents a coordinated sequential cascade of events. These embrace blood clot formation, inflammation, granulation tissue formation, neo-epithelialization, and a remodeling phase of repair. The underlying processes are driven by an increasing number of pro-inflammatory cytokines and growth factors. These proteinaceous, tissue-active factors are not unique in driving wound repair, as evidence is present for the action of small diffusible molecules such as nitric oxide (NO) for healing.

NO is a free gaseous radical, which is produced from the amino acid L-arginine by a family of three distinct isoforms of nitric oxide synthases (NOS).

Nitric oxide provides a broad spectrum of physiological and pathophysiological properties. An important role of inducible NOS (iNOS) for epithelial action during skin repair has been well established. FRANK et al [1998] observed a large induction of iNOS upon skin injury and functionally connected NO actions to keratinocyte biology. These processes were connected to iNOS enzymatic function.

Although a delayed healing of skin wounds has been formerly described for endothelial NOS (eNOS)-deficient mice, a participation of eNOS in skin repair largely remains unclear. This study was established to analyze expression patterns of eNOS during wound healing in healthy and in diabetic mice.

Based on an established wound healing model in mice, the presence of eNOS mRNA and protein could be demonstrated in healthy mice using several controls. Expression pattern in normal healing was characterized by a moderate induction of its eNOS mRNA and protein

levels in the early stages of repair. Interestingly, using CD31 as a pan-endothelial marker, eNOS protein elevation could be demonstrated to be most likely not due to an endothelial-derived expression.

Immunohistochemistry revealed the endothelial lining of blood vessels within the granulation tissue, and also keratinocytes of the wound margins, the developing neo-epithelium, and the hair follicles to express eNOS protein. Remarkably, eNOS staining was restricted to the suprabasal keratinocytes of the abovementioned epithelia. Keratinocyte-derived expression of eNOS could be confirmed at the mRNA level *in vitro* for human primary keratinocytes and the keratinocyte cell line HaCaT.

Furthermore, eNOS enzymatic activity is associated with epithelial proliferation, as eNOS-deficient animals exhibited reduced wound margin epithelia associated with reduced keratinocyte proliferation.

Moreover, observations in genetically diabetic mice (db/db) supported a functional role of eNOS in healthy animals. These time-course studies in diabetic animals revealed a disturbed eNOS mRNA expression with a decline below control skin level in the late stages of repair. Diabetes-impaired healing was associated with a clearly reduced eNOS protein expression as well.

In summary, spatial and temporal expression patterns of eNOS and its alteration in diabetic wound healing are discussed in this study with respect to its functional role in wound healing.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

**ALBINA JE, MILLS CD, HENRY WL, CALDWELL MD.**

*Temporal expression of different pathways of l-arginine metabolism in healing wounds.*  
J Immunol 1990. **144**: 3877-3880.

**ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG.**

*Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.*  
Biochem J 2001. **357**: 593-615.

**ANDERS J, HEINEMANN A, LEFFMANN C, LEUTENEGGER M, PRÖFENER F, VON RENTELN-KRUSE W.**

*Dekubitalgeschwüre – Pathophysiologie und Primärprävention.*  
Dtsch Ärztebl Int 2010. **107**: 371–382.

**ANHOLD M, STALLMEYER B, WETZLER C, KAHLINA K, PFEILSCHIFTER J, FRANK S.**

*Regulation of eNOS in normal and diabetes-impaired skin repair: implications for tissue regeneration.*  
Nitric Oxide 2002. **6**: 168-177.

**ARNAL JF, DINH-XUAN AT, PUEYO M, DARBLADE B, RAMI J.**

*Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology.*  
Cell Mol Life Sci 1999. **55**: 1078-1087.

**BARBUL AS, LAZAROU A., EFRON DT, WASSERKRUG HL, EFRON G.**

*Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans.*  
Surgery 1990. **108**: 331–336.

**BECKERT S, KÖNIGSRAINER A.**

*Die Physiologie der Wundheilung. Bedeutung der Grundlagenwissenschaft für die klinische Praxis.*  
Med Welt 2009. **60**: 217-220.

**BEDBROOK JR, LEHRACH H, AUSUBEL FM.**

*Directive segregation in the basis of colE1 plasmid incompatibility.*  
Nature 1979. **281**: 447-452.

**BIRNBOIM HC, DOLY J.**

*A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.*  
Nucleic Acids Res 1978. **7**: 1513-1523.

**BOGDAN C, ROLLINGHOFF M, DIEFENBACH A.**

*The role of nitric oxide in innate immunity.*  
Immunol Rev 2000. **173**: 17-26.

**BOUKAMP P, PETRUSSEVSKA RT, BREITKREUTZ D, HORNUNG J, MARKHAM A, FUSENIG NE.**

*Normal keratinization in spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.*  
J Cell Biol 1988. **106**: 761-771.



**BRADFORD MM.**

*A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding.*

Analytical Biochemistry 1976. **72**: 248-254.

**BREEN AM, DOCKERY P, O'BRIEN T, PANDIT AS.**

*The use of therapeutic gene eNOS delivered via a fibrin scaffold enhances wound healing in a compromised wound model.*

Biomaterials 2008. **29**: 3143-3151.

**BROWN GL, NANNEY LB, GRIFFEN J, CRAMER AB, YANCEY JM, CURTSINGER LJ, HOLTZIN L, SCHULTZ, GS, JURKIEWICZ MJ, LYNCH JB.**

*Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor.*

N Engl J Med 1989. **321**: 76-79.

**BUSSE R, MÜLSCH A.**

*Die wundersame Karriere von Stickstoffmonoxid: Vom Umweltgift zum biologischen Botenstoff.*

Forschung Frankfurt 1996. **4**: 4-19.

**CARTER EA, DEROJAS-WALKER T, TAMIR S, TANNENBAUM SR, YU YM, TOMPKINS RG.**

*Nitric oxide production is intensely and persistently increased in tissue by thermal injury.*

Biochem J 1994. **304**: 201-214.

**CHOMCZYNSKI P, SACCHI N.**

*Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.*

Anal Biochem 1987. **162**: 156-159.

**CLARK RAF.** *Wound repair: overview and general considerations.*

In: **CLARK RAF (ED.)**. *The molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. 2<sup>nd</sup> ed.

New York, London: Plenum Press 1996. pp. 3-50.

**CLARK RAF, LANIGAN JM, DELLAPELLE P, MANSEAU E, DVORAK HF, COLVIN RB.**

*Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound re-epithelialization.*

J Invest Dermatol 1982. **79**: 264-269.

**COLEMAN DL.**

*Diabetes-obesity syndromes in mice.*

Diabetes 1982. **31**: 1-6.

**COX KH, DELEON DV, ANGERER LM, ANGERER RC.**

*Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridisation using asymmetric RNA probes.*

Dev Biol 1984. **101**: 425-439.

**DEBUS ES, WINKLER M, LARENA-AVELLANEDA A, BÜLTEMANN A, DAUM H, LINGENFELDER M, SCHULENBURG B, GROSS-FENGELS W**

*Medizinische und ökonomische Aspekte der Zentrumsbildung in der Wundbehandlung.*

Gefäßchirurgie 2003. **8**: 259-268.

**DIMMELER S, FLEMING I, FISSLTHALER B, HERMANN C, BUSSE R, ZEIHNER AM.**

*Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.*

Nature 1999. **399**: 601-605.

**DREWS U.**

*Taschenatlas der Embryologie*  
Stuttgart, New York: Thieme 1993.

**DUBAY DA, FRANZ MG.**

*Acute wound healing: The biology of acute wound failure.*  
Surg Clin N Am 2003. **83**: 463-481.

**FALANGA V.**

*Chronic wounds – pathophysiologic and experimental considerations.*  
J Invest Dermatol 1993. **100**: 721-725.

**FLEMING I, SCHULZ C, FICHTLSCHERER B, KEMP BE, FISSLTHALER B, BUSSE R.**

*AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates the insulin-induced activation of the nitric oxide synthase in human platelets.*  
Thromb Haemost 2003. **90**: 863-871.

**FÖRSTERMANN U, BOISSEL J-P, KLEINERT H.**

*Expressional control of the ‘constitutive’ isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III).*  
FASEB J 1998. **12**: 773–790.

**FÖRSTERMANN U, KLEINERT H.**

*Nitric oxide synthase: expression and expressional control in the three isoforms.*  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1995. **352**: 351-364.

**FÖRSTERMANN U, POLLOCK JS, SCHMIDT HHHW, HELLER M, MURAD F.**

*Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells.*  
Proc Natl Acad Sci USA 1991. **88**: 1788-1792.

**FRANK S, KÄMPFER H.** *Excisional Wound Healing: An Experimental Approach.*

In: **DIPIETRO LA, BURNS AL** (EDS.). *Methods in Molecular Medicine, vol. 78: Wound healing: Methods and Protocols.*  
Totowa, USA: Humana Press Inc 2002. pp. 3-15.

**FRANK S, KÄMPFER H, PODDA M, KAUFMANN R, PFEILSCHIFTER J.**

*Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: Implications for keratinocyte proliferation.*  
Biochem J 2000a. **346**: 719–728.

**FRANK S, KÄMPFER H, WETZLER C, STALLMEYER B, PFEILSCHIFTER J.**

*Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: A regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression.*  
Biochem J 2000b. **347**: 265–273.

**FRANK S, MADLENER M, PFEILSCHIFTER J, WERNER S.**

*Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP cyclohydrolase I during cutaneous wound repair.*  
J Invest Dermatol 1998. **111**: 1058–1064.

**FRANK S, STALLMEYER B, KÄMPFER H, KOLB N, PFEILSCHIFTER J.**

*Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair.*

FASEB J 1999. **13**: 2002–2014.

**FRITSCH P.**

*Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas. (Springer-Lehrbuch)*

Berlin, Heidelberg: Springer 1998. pp. 3-16.

**FUCHS E, RAGHAVAN S.**

*Getting under the skin of epidermal morphogenesis.*

Nat Rev Genet 2002. **3**: 199-209.

**GERDES J, LEMKE H, BAISCH H, WACKER HH, SCHWAB U, STEIN H.**

*Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67.*

J Immunol 1984. **133**: 1709–1715.

**GERMANN G.**

*Die chronische Wunde – ein unlösbares Problem?*

Chirurg 2008. **79**: 517.

**GNANAPANDITHEN K, CHEN Z, KAU CL, GORCZYNSKI RM, MARSDEN PA.**

*Cloning and expression of murine endothelial constitutive nitric oxide synthase.*

Biochem Biophys Acta 1996. **1308**: 103-106.

**GOREN I, MÜLLER E, PFEILSCHIFTER J, FRANK S.**

*Severely impaired insulin signaling in chronic wounds of diabetic ob/ob mice: a potential role of tumor necrosis factor-alpha.*

Am J Pathol 2006. **168**: 765-77.

**GRISHAM MB, JOURD'HEUIL D, WINK DA.**

*Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation.*

Am J Physiol 1999. **276**: G315-321.

**GROSE R, HUTTER C, BLOCH W, THOREY I, WATT FM, FASSLER R, BRAKEBUSCH C, WERNER S.**

*A crucial role of beta 1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair.*

Development 2002. **129**: 2303-2315.

**ISH-HOROWICZ D, BURKE JF.**

*Rapid and efficient cosmid cloning.*

Nucleic Acids Res 1981. **9**: 2989-2998.

**JACKSON M, FRAME F, WELLER R, MCKENZIE RC.**

*Expression of nitric oxide synthase III (eNOS) mRNA by human skin cells: Melanocytes but not keratinocytes express eNOS mRNA.*

Arch Dermatol Res 1998. **290**: 350–352.

**JAFFÉ EA, NACHMANN RL, BECKER CG, MINICK CR.**

*Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification by morphologic and immunologic criteria.*

J Clin Invest 1973. **52**: 2745-2756.

**JANBEN H, BECKER R.**

*Qualität und Kosten in der chronischen Wundversorgung – Widerspruch oder vereinbar?*

Orthopädie-Technik 2008 **12**: 920-924.

**JANSSENS SP, SHIMOUSHI A, QUERTERMOUS T, BLOCH DB, BLOCH KD.**

*Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase*

J Biol Chem 1992. **267**: 14519-14522.

**KÄMPFER H, PFEILSCHIFTER J, FRANK S.**

*Expression and activity of arginase isoenzymes during normal and diabetes-impaired skin repair.*

J Invest Dermatol 2003. **121**: 1544-1551.

**KÄMPFER H, PFEILSCHIFTER J, FRANK S.**

*Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the Tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: A comparative study of normal and impaired repair.*

Lab Invest 2001. **81**: 361-373.

**KEEFER LK, SMITH DJ, PULFER S, HANSON SR, SAAVEDRA JE, BILLIAR TR, ROLLER PP.**

*Tissue-selective Delivery of Nitric Oxide Using Diazeniumdiolates (formerly "NONOates")*

Portland Press Proc 1996. **10**: 335.

**KIRK SJ, HURSON M, REGAN MC, HOLT DR, WASSERKRUG HL, BARBUL A.**

*Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings.*

Surgery 1993. **114**: 155-159.

**KRISCHEL V, BRUCH-GERHARZ D, SUSCHEK C, KRÖNCKE KD, RUZICKA T, KOLB-BACHOFEN V.**  
*Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts.*

J Invest Dermatol 1998. **111**: 286-291.

**KRÖNCKE KD, FEHSEL K, KOLB-BACHOFEN V.**

*Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities.*

Biol Chem Hoppe Seyler 1995. **376**: 327-343.

**KRÜGER U.** *Wunde.*

In: **HENNE-BRUNS D, DÜRIG M, KREMER B (EDS.).** *Chirurgie. (MLP Duale Reihe)*

Stuttgart: Thieme 2001. pp. 1-22.

**KULLO IJ, MOZES G, SCHWARTZ RS, GLOVICZKI P, TSUTSUI M, KATUSIC ZS, O'BRIEN T.**

*Enhanced endothelium-dependent relaxation after gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to rabbit carotid arteries.*

Hypertension 1997. **30**: 314-320.

**LAEMMLI UK.**

*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*  
Nature 1970. **227**: 680-685.

**LANDI F, ALOE L, RUSSO A, CESARI M, ONDER G, BONINI S, CARBONIN P, BERABEI R.**

*Topical treatment of pressure ulcers with nerve growth factor - a randomized clinical trial.*  
Ann Intern Med 2003. **139**: 635-641.

**LEE PC, SALYAPONGSE AN, BRAGDON GA, SHEARS LL 2ND, WATKINS SC, EDINGTON HD, BILLIAR TR.**

*Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice.*  
Am J Physiol 1999. **277**: H1600-H1608.

**LEONHARDT H.**

*Taschenatlas der Anatomie: für Studium und Praxis. In 3 Bänden. Band 2: Innere Organe. 6., überarb. Aufl.*  
Stuttgart, New York: Thieme 1991. pp. 338-349.

**LI H, MEININGER CJ, HAWKER JR JR, HAYNES TE, KEPKA-LENHART D, MISTRY SK, MORRIS SM JR, WU G.**

*Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells.*  
Am J Physiol Endocrinol Metab 2001. **280**: E75-82.

**LUO JD, WANG YY, FU W, WU J, CHEN AF.**

*Gene therapy of eNOS and MnSOD restores delayed wound healing in type 1 diabetic mice.*  
Circulation 2004. **110**: 2484-2493.

**MARGOLIS DJ, LEWIS VL.**

*A literature assessment of the use of miscellaneous topical agents, growth factors, and skin equivalents for the treatment of pressure ulcers.*  
Dermatol Surg 1995. **21**: 145-148.

**MARLETTA MA.**

*Approaches toward selective inhibition of nitric oxide synthase.*  
J Med Chem 1994. **37**: 1899-1907.

**MARTIN P.**

*Wound healing-aiming for perfect skin regeneration.*  
Science 1997. **276**: 75-81.

**MELTON DA, KRIEG PA, REBAGLIATI MR, MANIATIS T, ZINN K, GREEN MR.**

*Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter.*  
Nucleic Acids Res 1984. **12**: 7035-7056.

**MILLER JH.**

*Experiments in Molecular Genetics.*  
New York: NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1972.

**MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA.**

*Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology.*  
Pharmacol Rev 1991. **43**: 109-141.

**MOST D, EFRON DT, SHI HP, TANTRY US, BARBUL A.**

*Characterization of incisional wound healing in inducible nitric oxide synthase knockout mice.*  
Surgery 2002. **132**: 866-876.

**Moulin V.**

*Growth factors in skin wound healing.*  
Eur J Cell Biol 1995. **68**: 1-7.

**MÜLLER-ESTERL W, OESS S, SMOLENSKI A, GROSS S, KIEB S.**

*Molekulare Boten auf verschlungenen Pfaden. Signaltransduktion am Endothel.*  
Forschung Frankfurt 2002. **4**: 14-20.

**MULLIS KB, FALOONA FA.**

*Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction.*  
Methods Enzymol 1987. **155**: 335-350.

**NAKAI K, FUJII S, YAMAMOTO A, IGARASHI J, KUBOTA Y, KOSAKA H.**

*Effects of high glucose on NO synthesis in human keratinocyte cell line (HaCaT).*  
J Dermatol Sci 2003. **31**: 211-218.

**NATHAN C, XIE Q-W.**

*Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls.*  
Cell 1994. **78**: 915-918.

**NILL MR, OBERYSZYN TM, ROSS MS.**

*Quantification of inducible nitric oxide gene expression during incisional wound healing.*  
Surg Forum 1995. **46**: 753-755.

**NOIRI E, HU Y, BAHOU WF, KEESE CR, GIAEVER I, GOLIGORSKY MS.**

*Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells.*  
J Biol Chem 1997. **272**: 1747-1752.

**NOIRI E, PERESLENI T, SRIVASTAVA N, WEBER P, BAHOU WF, PEUNOVA N, GOLIGORSKY MS.**

*Nitric oxide is necessary for a switch from stationary to locomoting phenotype in epithelial cells.*  
Am J Physiol 1996. **270**: C794-C802.

**ORMEROD AD, WELLER R, COPELAND P, BENJAMIN N, RALSTON SH, GRABOWSKI P, HERRIOT R.**

*Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis.*  
Arch Dermatol Res 1998. **290**: 3-8.

**PANKOW S, BAMBERGER C, KLIPPEL A, WERNER S.**

*Regulation of epidermal homeostasis and repair by phosphoinositide 3-kinase.*  
J Cell Sci 2006. **119**: 4033-4046.

**POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U, TRACEY WR, NAKANE M.**

*Nitric oxide synthase isozymes antibodies.*  
Histochem J 1995. **27**: 738-744.

**RUCKLEY CV.**

*Socioeconomic impact of chronic venous insufficiency and leg ulcers.*  
Angiology 1997. **48**: 67-69.

**SABATH DE, BROOME HE, PRYSTOWSKY MB.**

*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA is a major interleukin-2-induced transcript in a cloned T-helper lymphocyte.*

Gene 1990. **91**: 189-191.

**SAKAI M, SHIMIZU Y, NAGATSU I, UEDA H.**

*Immunohistochemical localization of NO synthases in normal human skin and psoriatic skin.*

Arch Dermatol Res 1996. **288**: 625-627.

**SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA.**

*Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.*

Science 1988. **239**: 487-491.

**SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T.**

*Molecular cloning: A laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> edition.*

New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

**SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR.**

*DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.*

Proc Natl Acad Sci USA 1977. **74**: 5463-5467.

**SCHÄFFER MR, EFRON PA, THORNTON FJ, KLINGEL K, GROSS SS, BARBUL A.**

*Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function.*

J Immunol 1997. **158**: 2375-2381.

**SCHÄFFER MR, TANTRY U, THORNTON FJ, BARBUL A.**

*Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice.*

Eur J Surg. 1999. **165**: 262-267.

**SCHWENTKER A, SALYONGSE AN, VODOVOTZ Y, BILLIAR TR.**

*Effect of adenoviral inducible nitric oxide synthase transfection on healing of steroid-treated murine wounds.*

Surg Forum 2001. **52**: 540-542.

**SCHWENTKER A, VODOVOTZ Y, WELLER R, BILLIAR TR.**

*Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?*

Nitric oxide 2002. **7**: 1-10.

**SEIFTER E, RETTURA G, BARBUL A, LEVENSON SM.**

*Arginine: an essential amino acid for injured rats.*

Surgery 1978. **84**: 224-230.

**SEN CK, GORDILLO GM, ROY S, KIRSNER R, LAMBERT L, HUNT TK, GOTTRUP F, GURTNER GC, LONGAKER MT.**

*Human Skin Wounds: A Major and Snowballing Threat to Public Health and the Economy.*

Wound Repair Regen 2009. **17**: 763-771.

**SHI HP, EFRON DT, MOST D, TANTRY US, BARBUL A.**

*Supplementary dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knock-out mice.*

Surgery 2000. **128**: 374-378.

**SINGER AJ, CLARK RAF.**

*Cutaneous wound healing.*

N Engl J Med 1999. **341**: 738–746.

**SMITH DJ, CHAKRAVARTHY D, PULFER S, SIMMONS ML, HRABIE JA, CITRO ML, SAAVEDRA JE, DAVIES KM, HUTSELL TC, MOORADIAN DL, HANSON SR, KEEFER LK.**

*Nitric Oxide-releasing Polymers Containing the [N(O)NO]- Group.*

J Med Chem 1996. **39**: 1148-1156.

**SOUTHAN GJ, SZABO C.**

*Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms.*

Biochem Pharmacol 1996. **51**: 383-394.

**SOUZA K, MADDOCK DA, ZHANG Q, CHEN J, CHIU C, MEHTA S, WAN Y.**

*Arsenite activation of P13K/AKT cell survival pathway is mediated by p38 in cultured human keratinocytes.*

Mol Med 2001. **7**: 767-772.

**STALLMEYER B, KÄMPFER H, KOLB N, PFEILSCHIFTER J, FRANK S.**

*The function of nitric oxide in wound repair: Inhibition of inducible nitric oxide synthase severely impairs wound reepithelialization.*

J Invest Dermatol 1999. **113**: 1090–1098.

**THORNTON FJ, SCHÄFFER MR, WITTE MB, MOLDAWER LL, MACKAY SL, ABOUHAMZE A, TUNNAHILL CL, BARBUL A.**

*Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wound.*

Biochem Biophys Res Commun 1998. **246**: 654-659.

**TOKUNAGA K, NAKAMURA Y, SAKATA K, FUJIMORI K, OHKUBO M, SAWADA K, SAKIYAMA S.**

*Enhanced expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancer.*

Cancer Res 1987. **47**: 5616-5619.

**TOWBIN HT, STAEHELIN T, GORDON J.**

*Electrophoretic transfer of proteins from poly-acrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications.*

Proc Natl Acad Sci 1979. **76**: 4350-4354.

**VALENCIA IC, FALABELLA A, KIRSNER RS, EAGLSTEIN WH.**

*Chronic venous insufficiency and venous leg ulceration.*

J Am Acad Dermatol 2001. **44**: 401-421.

**WEHNER R, GEHRING W, KÜHN A.**

*Zoologie.*

Stuttgart: Thieme 1995.

**WERNER S, PETERS KG, LONGAKER MT, FULLER-PACE F, BANDA MJ, WILLIAMS LT.**

*Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing.*

Proc Natl Acad Sci USA 1992. **89**: 6896-6.



**WETZLER C, KÄMPFER H, PFEILSCHIFTER J, FRANK S.**

*Keratinocyte-derived chemotactic cytokines: Expressional modulation by nitric oxide in vitro and during cutaneous wound repair in vivo.*

Biochem Biophys Res Commun 2000. **274**: 689–696.

**WETZLER C, KÄMPFER H, STALLMEYER B, PFEILSCHIFTER J, FRANK S.**

*Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: Prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair.*

J Invest Dermatol 2000. **115**: 245–253.

**WITTE MB, KIYAMA T, BARBUL A.**

*Nitric oxide enhances experimental wound healing in diabetes.*

Br J Surg 2002b. **89**: 1594-1601.

**WITTE MB, THORNTON FJ, TANTRY U, BARBUL A.**

*L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways.*

Metabolism 2002a. **51**: 1269-1273.

**YAGER DR, CHEN SM, WARD S, OLUTOYE OO, DIEGELMANN RF, COHEN IK.**

*The ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors.*

Wound Rep Reg 1997. **5**: 23-32.

**YAMASAKI K, EDINGTON HDJ, MCCLOSKEY C, TZENG E, LIZONOVA A, KOVESDI I, STEED DL, BILLIAR TR.**

*Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer.*

J Clin Invest 1998. **101**: 967-971.

## 7 ANHANG

### 7.1 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am *pharmazentrum frankfurt*, Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Josef Pfeilschifter für die Möglichkeit zu dieser Arbeit, seine Unterstützung und jegliche anregende Diskussion.

Mein ausgesprochener Dank geht an Herrn Professor Dr. Stefan Frank und Frau Dr. Birgit Stallmeyer für ihre engagierte Betreuung meiner Arbeit, ihre für exzellente Supervision und konsequente wissenschaftliche Anleitung. Ihr großes Engagement hat den erfolgreichen Abschluss des wissenschaftlichen Projekts ermöglicht.

Ich möchte weiterhin den Mitgliedern aus Prof. Dr. Stefan Franks Arbeitsgruppe, Frau Nicole Kämpfer-Kolb, Dr. Heiko Kämpfer-Kolb und Dr. Christian Wetzler für ihre Unterstützung bei der Laborarbeit sowie vielfältigem Rat bei der Laborarbeit danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rudi Busse und Herrn Prof. Dr. Ralf Brandes aus dem Institut der Physiologie der Universität Frankfurt am Main für die freundliche Überlassung von eNOS-defizienten Mäusen sowie zellulären Proben aus humanen umbilikal-venösen Endothelzellen. Auch geht Dank an Herrn Dr. Martin Kock für seine Hilfe bezüglich der Tierexperimente.

Ein großer Dank geht außerdem an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie und alle diejenigen, die ich während meiner Laborzeit kennenlernen durfte.

Ich danke in ganz besonderer Weise meinen Eltern für ihre stetige und große Unterstützung. Ich danke Ihnen zusammen mit meinen Brüdern Volker und Thorsten für ihren starken familiären Rückhalt. Mein großer Dank geht zudem an alle meine Freunde, auf die ich mich stets zu verlassen weiß.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 553) und Mittel der Adolf Messer-Stiftung unterstützt.

## 7.2 WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATION

Die vorliegende Arbeit wurde in Teilen in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

**ANHOLD M, STALLMEYER B, WETZLER C, KAHLINA K, PFEILSCHIFTER J, FRANK, S.**  
*Regulation of eNOS in normal and diabetes-impaired skin repair: implications for tissue regeneration.*  
Nitric Oxide 2002. **6**: 168-177.

### **7.3 CURRICULUM VITAE**

Für die Veröffentlichung als Online-Dokument entfernt.

## 7.4 SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Die Regulation der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthese in der normalen und der chronisch-diabetischen kutanen Wundsituation**

im *pharmazentrum frankfurt*, Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. Stefan Frank mit Unterstützung durch Frau Dr. Birgit Stallmeyer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

**ANHOLD M, STALLMEYER B, WETZLER C, KAHLINA K, PFEILSCHIFTER J, FRANK, S.**  
*Regulation of eNOS in normal and diabetes-impaired skin repair: implications for tissue regeneration.*  
Nitric Oxide 2002. **6**: 168-177.

Frankfurt am Main, den 02.10.2011

---

Manuel Anhold