Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Direktorin: Fr. Prof. Dr. med. Ingrid Moll

Connexin 43 in der Wundheilung

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ann-Catherine Pfeiffer

aus Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen von dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 03.11.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. I. Moll

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. J. Brandner

Meinen Eltern gewidmet

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Professor Moll für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas, für das Gewähren der großzügigen Arbeitsmöglichkeiten an der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UKE sowie die jederzeit freundliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Johanna Brandner, Leiterin des Zellbiologischen Institutes der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UKE, die mir mit unermüdlichem Einsatz zu jeder Zeit mit Rat und Tat sowie aufbauender Kritik freundschaftlich zur Seite gestanden hat. Gerade in schwierigen Situationen haben mir ihre wertvollen Anregungen und konstruktiven Vorschläge immer wieder weiter geholfen. Ohne sie wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin bedanke ich mich bei den MTAs Frau Pia Houdek, Frau Sabine Vidal y Si und Frau Ewa Wladykowski für die Einarbeitung in die Methoden der Immunhistologie und die vielen weiteren Hilfen und Hinweise.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und bei meinem Freund Christoph Dibbert, der mich stets ermutigte und unterstützte sowie mir zahlreiche Hilfestellungen für die Ausarbeitung am Computer gab.

Ann-Catherine Pfeiffer

Inhaltsverzeichnis

Dar	nksagi	ung	I			
Inh	altsve	rzeichnis	II			
Abl	oildun	gsverzeichnis	IV			
Tab	ellenv	/erzeichnis	VI			
Abl	kürzur	igsverzeichnis	VII			
1	Einl	eitung	1			
1.1	Wun	dheilung	1			
1.2	Gap	junctions	2			
	1.2.1	Connexine	3			
	1.2.2	Connexin mimetische Peptide	4			
1.3	Gap	junctions bzw. Connexine in der Wundheilung	5			
1.4	Tigh	t junctions	8			
1.5	Fragestellung11					
2	Mate	erial	12			
2.1	Unte	rsuchungsgut	12			
2.2	Gerä	te	12			
2.3	Cher	nikalien und Verbrauchsmaterial	13			
2.4			15			
	Mate	rial Immunhistochemie				
	Mate 2.4.1	rial Immunhistochemie Primärantikörper				
	Mate 2.4.1 2.4.2	rial Immunhistochemie Primärantikörper Sekundärantikörper:				
	Mate 2.4.1 2.4.2 2.4.3	rial Immunhistochemie Primärantikörper Sekundärantikörper: DNA Färbung	15 15 			
	Mate 2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4	rial Immunhistochemie Primärantikörper Sekundärantikörper: DNA Färbung Puffer und Lösungen	15 			
	Mate 2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4 2.4.5	Primärantikörper Sekundärantikörper: DNA Färbung Puffer und Lösungen Cx 43 mimetische Peptide	15 			
3	Mate 2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4 2.4.5 Met	Primärantikörper Sekundärantikörper: DNA Färbung Puffer und Lösungen Cx 43 mimetische Peptide				
3 3.1	Mate 2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4 2.4.5 Met Vorb	Primärantikörper Sekundärantikörper: DNA Färbung Puffer und Lösungen Cx 43 mimetische Peptide hoden ereitung und Anlegen der porcinen Wundheilungsmo				
3 3.1 3.2	Mate 2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4 2.4.5 Met Vorb Histo	Primärantikörper Sekundärantikörper: DNA Färbung Puffer und Lösungen Cx 43 mimetische Peptide hoden ereitung und Anlegen der porcinen Wundheilungsmo blogische Techniken				

	3.2.2	HE Färbung	19
	3.2.3	Immunfluoreszenzfärbung	19
3.3	Ausv	vertung der Färbungen	21
	3.3.1	HE Färbungen	21
	3.3.2	Immunfluoreszenzfärbungen	21
3.4	Stati	stische Auswertung	22
4	Erge	ebnisse	23
4.1	Wun	dheilungsfortschritt	23
	4.1.1	GAP27	23
	4.1.2	GAP26	25
4.2	Proli	feration von Keratinocyten	26
4.3	Gap	junction Proteine	32
	4.3.1	Connexin 43	32
	4.3.2	Connexin 26	37
4.4	Tight	t junction- assoziierte Proteine	42
	4.4.1	Protein ZO-1	42
	4.4.2	Occludin	44
5	Disk	ussion	48
6	Zusa	ammenfassung	55
7	Lite	raturverzeichnis	56
8	Erklärung 66		
9	Veröffentlichungen 67		
10	Lebe	enslauf	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Hämatoxilyn-Eosin gefärbter Querschnitt			
	durch ein Wundmodell	23		
Abbildung 2:	Wundheilungsfortschritt in GAP27 Modellen	24		
Abbildung 3:	Wundheilungsfortschritt in GAP26 Modellen	25		
Abbildung 4:	Anteil proliferativer Zellen in den			
	regenerierenden Epidermen	27		
Abbildung 5:	Anteil proliferativer Zellen in den Wundrändern	28		
Abbildung 6:	Anteil proliferativer Zellen in den benachbarten			
	Epidermen	29		
Abbildung 7:	Immunfluoreszenz und Phasenkontrast von			
	positiv anti-Ki 67 gefärbten Gewebeschnitten	30		
Abbildung 8:	Immunfluoreszenz und Phasenkontrast von			
	schwach positiv anti-Ki 67 gefärbten			
	Gewebeschnitten	31		
Abbildung 9:	Wundheilungsfortschritt bei Cx 43 gefärbten			
	Wundrändern	33		
Abbildung 10:	Wundheilungsfortschritt bei Cx 43 gefärbten			
	regenerierenden Epidermen	35		
Abbildung 11:	Immunfluoreszenz und Phasenkontrast eines			
	Cx 43 positiv gefärbten Wundrandes und			
	regenerierender Epidermis	36		
Abbildung 12:	Immunfluoreszenz und Phasenkontrast eines			
	Cx 43 negativ gefärbten Wundrandes und			
	regenerierender Epidermis	37		
Abbildung 13:	Wundheilungsfortschritt bei Cx 26 gefärbten			
	regenerierenden Epidermen	39		
Abbildung 14:	Immunfluoreszenz und Phasenkontrast eines			
	Cx 26 positiv gefärbten Wundrandes,			
	regenerierender Epidermis und leading edges	40		

Abbildung 15:	Immunfluoreszenz und Phasenkontrast einer	
	am Wundrand Cx 26 positiv regenerierenden	
	Epidermis	41
Abbildung 16:	Immunfluoreszenz und Phasenkontrast einer	
	ZO-1positiv regenerierenden Epidermis	43
Abbildung 17:	Wundheilungsfortschritt bei Occludin gefärbten,	
	regenerierenden Epidermen	46
Abbildung 18:	Immunfluoreszenz und Phasenkontrast eines	
	Occludin positiv gefärbten Wundrandes und	
	regenerierender Epidermis	46
Abbildung 19:	Immunfluoreszenz und Phasenkontrast einer	
	am Wundrand Occludin positiv	
	regenerierenden Epidermis	47

Tabellenverzeichnis

Cx 43 gefärbte Wundränder	33
Cx 43 gefärbte regenerierende Epidermen	34
Cx 26 gefärbte Wundränder	38
Cx 26 gefärbte regenerierende Epidermen	38
ZO-1 gefärbte Wundränder	42
ZO-1 gefärbte regenerierende Epidermen	43
Occludin gefärbte Wundränder	45
Occludin gefärbte regenerierende Epidermen	45
	Cx 43 gefärbte Wundränder Cx 43 gefärbte regenerierende Epidermen Cx 26 gefärbte Wundränder Cx 26 gefärbte regenerierende Epidermen ZO-1 gefärbte Wundränder ZO-1 gefärbte regenerierende Epidermen Occludin gefärbte regenerierende Epidermen

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AS	antisense
Сх	Connexin
Da	Dalton
DAPI	4`,6`-Diamidino-2`-phenylindol-dihydrochlorid
dest.	destilliert
DNA	"Desoxyribonucleic acid", Desoxyribonukleinsäure
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HE	Hämatoxylin- Eosin
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
NGS	Normal Goat Serum
PBS	"Phosphate buffered saline", phosphatgepufferte Kochsalzlösung
reg.	regenerierend
TJ	Tight junction
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	Zonula Occludens Protein 1
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Wundheilung

Die akute Wundheilung gliedert sich klassischerweise in vier Phasen, die zum Teil ineinander übergehen.

In der ersten, der Exsudationsphase wird nach einer Verletzung die Gerinnung aktiviert und es entsteht mithilfe von Thrombin und anderen Wachstumsfaktoren ein Blutgerinnsel, welches die Blutung aufhält und die Wunde sowohl bedeckt, als auch die Wundränder verbindet und zusammenhält. Nach sechs Stunden wandern Granulozyten ein, welche der Abwehr dienen. In der sich anschließenden Resorptionsphase phagozytieren Makrophagen das nekrotische Material. In der folgenden Proliferationsphase werden Fibroblasten aktiviert, welche einwandern und Granulationsgewebe bilden, das in den Gewebedefekt einsprießt, dort kommt es zur Angiogenese. Neue extrazelluläre Matrix lagert sich an. Es kommt zur Epithelialisierung und schließlich zum Wundverschluss. In der abschließenden Reparationsphase normalisiert sich die epidermale Hyperproliferation und Keratinisierung. Bindegewebsneubildung und umbauprozesse führen oft zur Narbenbildung.

Die Wundheilung spielt eine wichtige Rolle für das Überleben des Menschen.

Durch unterschiedliche Grunderkrankungen kann es zu einer Verzögerung der Wundheilung oder gar zu keinem Verschluss der Wunde kommen. Dies ist häufig der Fall bei Patienten mit Durchblutungsstörungen oder Patienten mit Diabetes mellitus.

Eine wichtige Rolle für den geordneten Ablauf der Wundheilung spielt die Kommunikation zwischen den beteiligten Zellen. Diese kann sowohl direkt über sogenannte Gap junctions, als auch indirekt, über Cytokine, verlaufen.

1.2 Gap junctions

Gap junctions sind Kanäle in der Plasmamembran, welche eine direkte Kommunikation zwischen zwei benachbarten Zellen ermöglichen und dadurch die Koordination zellulärer Aktivität in multizellulären Organismen sicherstellen (Evans & Martin 2002). Eine Zelle besitzt einen sogenannten "Halbkanal" (Connexon), der aus sechs Connexinen besteht. Mit einem Halbkanal bzw. Connexon der benachbarten Zelle, bildet er einen Kanal durch die Plasmamembranen. Eine Ansammlung dieser interzellulären Kanäle bezeichnet man als Gap junction Plagues. Die Halbkanäle werden im endoplasmatischen Retikulum gebildet und anschließend in die Plasmamembran integriert, um dann an einen Halbkanal der benachbarten Zelle anzudocken (Musil et al, 1991). Gap junctions können aus verschiedenen Connexin Protein Subtypen aufgebaut sein und werden, je nach Zusammensetzung, als homotypisch (beide Connexone sind vom selben Connexin Subtyp aufgebaut), heterotypisch (jedes Connexon ist aus einem unterschiedlichen Connexin Subtyp aufgebaut) oder heteromerisch (jedes Connexon ist aus einem Mix von Connexin Subtypen aufgebaut) bezeichnet (Martin et al, 2005).

Der Durchmesser eines Kanals beträgt durchschnittlich 1,2 nm, Moleküle bis 1 kDa können durch ihn transportiert werden. Neben anorganischen Ionen (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, etc) werden eine Reihe von kleinen Molekülen, wie cAMP und IP3 durch Gap junctions transportiert (Spray et al, 1994). Durch frühere Permeabilitätsstudien wurde deutlich, dass Gap junctions, je nachdem aus welchen Connexin Protein Subtypen sie aufgebaut sind, unterschiedliche Durchlässigkeiten für second messenger Moleküle, wie cAMP, cGMP, Ca²⁺ oder IP3 besitzen. Das Ziel des Vorhandenseins dieser Permeabilitätsunterschiede könnte sein, Kommunikationskompartimente aufzubauen, die einer selektiven Zellgruppe ermöglichen, über Veränderungen der Konzentrationen von spezifischen second messengern, reguliert zu werden (Kumar et al, 2000).

1.2.1 Connexine

Die Familie der bereits erwähnten Connexine (Cx) bestehen aus hoch konservierten Proteinen, von denen mindestens 20 verschiedene Subtypen in Säugetieren identifiziert wurden und welche entsprechend ihres Molekulargewichtes in kDa klassifiziert werden können (Willecke et al. 2002). In der menschlichen Epidermis werden Cx 26, Cx 30, Cx 30.1, Cx 31, Cx 32, Cx 40, Cx 43 und Cx 45 exprimiert (Richard 2000; Risek et al, 1992; Di et al, 2001). Die Connexin Untereinheiten enthalten vier Transmembrandomänen und bestehen aus zwei hochkonservierten extrazellulären Schleifen und einer interzellulären Schleife (Evans & Martin, 2001). Sowohl der NH₂- als auch COOH-Terminus liegen im Cytoplasma.

Jedes Connexin hat einzigartige funktionelle Eigenschaften, was darauf schließen lässt, dass der Connexinaufbau eines Gewebes die spezifischen physiologischen Gewebeanforderungen widerspiegelt (Saez et al, 2003).

Eine große Anzahl von menschlich vererbten Störungen resultiert aus Veränderungen in Connexin Genen. Dies unterstreicht die Bedeutung der Gap junctions für die Gewebefunktion (Hodgins, 2004). Unter den Störungen befindet sich das Vohwinkel Syndrom und weitere Palmoplantar Keratosen, die mit Taubheit assoziiert sind (OMIM 124500, 121011); darüber hinaus das Keratitis-Ichthyosis-Taubheit Syndrom (OMIM 148210), Erythrokeratoderma Variabilis (OMIM 133200) und Hidrotic Ectodermal Cloustons Dysplasia (OMIM 129500) (Kelsell et al, 2001; Richard, 2003).

In der Haut ist Connexin 43 das am häufigsten vorkommende Connexin. Es wird neben der Epidermis in dermalen Fibroblasten (Moyer et al, 2002) im Gefäßsystem (Pepper et al, 1992; Polacek et al, 1997) gebildet. In der menschlichen Epidermis ist es in allen Schichten lokalisiert, seine Intensität nimmt von basal nach suprabasal zu (Brandner et al, 2004).

Das C-terminale Ende von Cx 43 wird mit der Regulation der Öffnung der Gap junction Kanäle in Zusammenhang mit Wachstumsfaktoren gebracht. Das Cterminale Ende von Cx 43 besitzt drei interagierende Partner, die die Gap junction Kommunikation in unterschiedlicher Weise beeinflussen können. Zum einen die c-Src-Tyrosinkinase, welche das C-terminale Ende von Cx 43 phosphorylieren kann und in der G-Protein vermittelten Inhibierung der Gap junction Kommunikation involviert ist. Des Weiteren ZO-1, das Signalproteine zu den Gap junctions rekrutiert und schließlich Mikrotubuli, welche aus alpha/ beta-Tubulin-Dimeren bestehen. Sie erstrecken sich bis zu den aus Cx 43 aufgebauten Gap junctions, wobei vermutet wird, dass diese eine neuartige Rolle in der Regulation der Stabilität von Mikrotubuli in Zellverbänden spielen (Giepmans et al, 2001).

1.2.2 Connexin mimetische Peptide

Zur Erforschung der Funktion von Connexinen werden häufig Connexin mimetische Peptide verwendet. GAP26 und GAP27 sind mimetische Peptide für Connexin 43. Es handelt sich dabei um kurze synthetische Peptide, die den extrazellulären Sequenzen in Connexin 43 entsprechen und die sich neben der zweiten und vierten Transmembrandomäne befinden. GAP26 besitzt die Sequenz VCYDKSFPISHVR (extrazelluläre Schleife 1), GAP27 besitzt die Sequenz SRPTEKTIFII (extrazelluläre Schleife 2) (Evans et al, 2001). GAP27 enthält die Sequenz SRPTEK, welche in den meisten Connexinen vorhanden ist, z.B. Cx 37, Cx 40 und Cx 43 in Endothelzellen (Hutcheson et al, 1999), Cx 43 in Epithelzellen der Lunge (Boitano et al, 2000) sowie Cx 43 in menschlichen gingivalen Fibroblasten (Ko et al, 2001). GAP27 hemmt sowohl Cx 43 als auch Cx 37 spezifisch aufgrund der Sequenzendung TIFII, hingegen nicht Cx 40, welches die Sequenz SRPTEKNVFIV besitzt.

Es konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Connexin mimetischen Peptide den interzellulären Transfer von Fluoreszenzfarbstoffen in COS-7 Zellen (einer Fibroblastenzelllinie vom Affen) (Chaytor et al 1999), die Weitergabe von Calciumwellen über konfluierende alveoläre Epithelzellen von Ratten (Isakson et al, 2001) und in Atmungsorganen von Kaninchen befindlichen epithelialen Zellen (Boitano et al, 2000) sowie die elektrische Kommunikation von Zellen der glatten Muskulatur in Arterien von Kaninchen (Dora et al, 1999) beeinflussen. In murinen Keratinocyten konnte eine

Reduktion der Weitergabe des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa 594 in mit GAP27 behandelten Zellen beobachtet werden (Kandyba et al, 2007).

Der mutmaßliche Mechanismus basiert auf der Regulierung des Gap junction Auf- und Abbaus. Die Connexin mimetischen Peptide simulieren wichtige extrazelluläre Schleifensequenzen, reagieren so mit ungepaarten Halbkanälen in der Plasmamembran und reduzieren deshalb erfolgreich die interzelluläre Kommunikation der Gap junctions. Das Andocken eines komplementären Halbkanals wird gestört und die Anzahl funktionsfähiger Gap junctions reduziert. Wahrscheinlich können Connexin mimetische Peptide aber auch direkt mit Gap junctions interagieren und die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle verändern (Evans et al, 2001). Schließlich könnten Connexin mimetische Peptide auch mit dem interzellulären Raum der Gap junctions interagieren, möglicherweise mit Regionen am Rand der junktionalen Plaques, welches zur Dissoziation und Beschädigung führt. Elektrophysiologische Ansätze favorisieren die zweite Möglichkeit (Dora et al, 1999; Kwak, 1999).

1.3 Gap junctions bzw. Connexine in der Wundheilung

Im Wundheilungsprozess spielt die Regulation der Connexine eine wichtige Rolle. Während es in der gesunden Epidermis nach einer Verwundung zu einer Herunterregulation von Cx 43 kommt, bleibt Cx 43 in den Wundrändern von chronischen Wunden vorhanden. In den ersten 24 Stunden nach der Verwundung verschwindet Cx 43 in den Keratinocyten des Wundrandes und wird in der regenerierenden Epidermis zunächst nicht gebildet. Später (je nach Spezies nach mehreren Tagen) wird es reinduziert (Goliger et al, 1995; Saitoh et al, 1997; Coutinho et al, 2003; Brandner et al, 2004). In der Dermis ist Cx 43 vorübergehend ein paar Stunden nach dem Trauma in den Fibroblasten, Endothelzellen und in der glatten Muskulatur der Blutgefäße um die Wunde herum hochreguliert (Coutinho et al, 2003). In späteren Stadien der Wundheilung, während der Gewebserneuerung (ab dem siebten Tag), korreliert die Hochregulation von Cx 43 mit einem Anstieg der Gewebereifung, welches eine potentielle Rolle während dieser Phase ebenfalls nahe legt (Moyer et al, 2002). Die Bedeutung der Herunterregulation von Cx 43 während der Wundheilung konnte auch in zwei Mausstudien gezeigt werden, in denen die Reduktion der Expression von Cx 43 in der verwundeten Maushaut zu einer beschleunigten Wundheilung führte (Kretz et al, 2003; Qiu et al, 2003). Ein "knockdown" von Cx 43 durch Cx 43 antisense (AS) Gel reduzierte des Weiteren die Entzündung der Wunde, sowohl makroskopisch sichtbar, durch Reduzierung der Schwellung und Rötung, als auch mikroskopisch, durch einen signifikanten Abfall Neutrophiler im Gewebe um die Wunde (Qiu et al, 2003).

Kurz vor Beendigung dieser Doktorarbeit wurde in einer weiteren Mausstudie (Mori et al, 2006) gezeigt, dass bei einer akuten Herunterregulation von Cx 43 durch ein AS Gel die Proliferation von Keratinozyten und die Migration von Fibroblasten in die Wunde zu der Collagenmatrix hin gefördert wurde. Eine reduzierte Entzündungsantwort war durch eine stark reduzierte Anzahl ersichtlich. Neutrophiler und Makrophagen ebenso eine abnehmende Leukozyteninfiltration in das verwundete Gewebe. Demzufolge war auch die Cytokinproduktion erheblich herabgesetzt. Eine, im Vergleich zu der Kontrolle, früher einsetzende Differenzierung von Myofibroblasten führte zu einer schnelleren Kontraktion an den Wundrändern. Die Erhöhung von mRNAs für TGF ß1 sowie vermehrte Collagen a1 Produktion trugen ebenfalls zu der beschleunigten Wundheilung bei. Diese zeigte sich in einer schnelleren Reepithelialisierung und einer schnelleren Ausbildung von Granulationsgewebe sowie dessen Reifung und Entwicklung.

Man findet die Herunterregulation von Cx 43 nicht nur in kutanen, sondern auch in anderen epithelialen Wunden, wie z.B. in der Zunge und der Cornea (Matic et al, 1997; Saitoh et al, 1997). Somit kann man postulieren, dass die Herunterregulation von Connxin 43 ein "generelles Prinzip" ist (Brandner et al, 2004).

Cx 26 wird zwar in gesunder interfollikulärer menschlicher Epidermis nicht nachgewiesen, es scheint aber eine wichtige Rolle bei hyperproliferativen Prozessen zu spielen. So zeigten Labarthe und Lucke 1999 unabhängig

voneinander, dass Cx 26 in der Zellperipherie von Keratinozyten in psoriatischen Plaques intensiv exprimiert wird. In der Wundheilung findet man nach einer anfänglichen Ruhephase von ca. 18 Stunden eine Cx 26 Induktion. Danach bleibt es über die gesamte Wundreepithelialisierungsphase hinweg angeschaltet und wird später, während der terminalen Differenzierung herunterreguliert. In den Wundrändern chronischer Wunden findet man Cx 26 stark exprimiert (Brandner et al, 2004). Bei Mäusen, in denen Cx 26 experimentell in der Haut überexprimiert wurde, blieb die epidermale Entwicklung und die Wundheilung in einer hyperproliferativen Phase. Der Übergang zur Erneuerung des Gewebes war unterbrochen, und es kam zu einer Infiltration von Immunzellen. Somit lässt sich vermuten, dass die Regulation von Cx 26 bzw. der Gap junctions Voraussetzung für eine Barrierebildung der Haut und essentiell für die normale Differenzierung der Epidermis ist (Djalilian et al, 2006).

Die Herunterregulation bzw. die "noch nicht Induktion", die sich bei Cx 26 am Anfang des Wundheilungsprozesses finden lässt, lässt vermuten, dass die Isolation der Zellen aus dem Zellverband der konsekutiven Migration in die Wunde hinein, oder der Proliferation bestimmter Zellen am Wundrand dient.

Generell sollte bei den oben beschriebenen Experimenten an Mäusen bzw. mit Mauskeratinocyten allerdings bedacht werden, dass die Expression und Lokalisation von Cx 43 und Cx 26 in Menschen und Mäusen unterschiedlich ist. Während Cx 43 in menschlicher Epidermis in allen Schichten mit einer Zunahme der Intensität von basal zu suprabasal zu finden ist, wird es in der Epidermis von Mäusen in den unteren epidermalen Schichten gefunden. Cx 26, das in menschlicher interfollikulärer Epidermis normalerweise nicht exprimiert wird, wird in Mäusen schwach im Stratum granulosum, in Ratten im Stratum granulosum und in niedrigen Konzentrationen im Stratum spinosum exprimiert (Risek et al, 1992; Goliger und Paul, 1994). Somit ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das menschliche System nicht selbstverständlich.

1.4 Tight junctions

Tight junctions (TJ) kommen in Epithelien (z.B. Harnblasen-, Nieren-, Darmepithel) und Endothelien (z.B. Blut-Hirn-Schranke) von Wirbeltieren vor. Bei Invertebraten übernehmen vermutlich septate junctions eine analoge Funktion.

Die Struktur, Proteinanordnung und Regulation parazellulärer Durchlässigkeit von TJ wurde in vielen Arbeiten beschrieben (Cereijido et al, 2000; Madara, 1998; Mitic et al, 2000; Nusrat et al, 2000; Tsukita et al, 2001; Turner et al, 2000).

TJ bzw. Zonula occludens sind Proteinkomplexe, die benachbarte Epithelzellen gürtelartig miteinander verfestigen (Mitzscherling et al, 2006). Sie verbinden die Zellen in Epithelschichten so dicht miteinander, dass eine Barriere für die parazelluläre Diffusion von Wasser, Ionen und gelösten Stoffen entsteht. TJ befinden sich in der Regel im apikalen Bereich der lateralen Plasmamembran oberflächenbedeckender Epithelzellen und unterbinden eine Lateralverschiebung aller Anteile der Plasmamembran (Zaunfunktion) (Schiebler et al, 1999). Auf elektronenmikroskopischer Ebene stellen sich TJ als enge Kontakte von Plasmamembranen ohne extrazellulären benachbarten Spalt oder intermembranösen Material (kissing points) dar. In der Epidermis findet man TJ in der lateralen Membran der Keratinocyten des Stratum granulosums (Brandner et al, 2002, 2006).

TJ bestehen aus Transmembranproteinen und zytoplasmatischen Plaque-Proteinen, wobei letztere mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind. Occludin, die Familie der Claudine und die Familie der junktionalen Adhäsionsmoleküle molecules", ("junctional adhesion JAMs) sind die drei Typen von Transmembranproteinen, welche sich in den TJ befinden (Rajasekaran et al, 2003). Sie sind verbunden mit einer Reihe von cytoplasmatischen Plaque-Proteinen, z.B. ZO-1, ZO-2, ZO-3, MAGI, MUPP-1, Cingulin, Symplekin, Rab3, Rab8, (als Übersicht siehe Brandner und Proksch 2006; Fanning et al, 1998; Itoh et al, 1999b). Diese cytoplasmatischen Proteine sind involviert in Gerüstfunktionen, Aufbau, Erhalt und Abbau von TJ, Permeabilität der TJ,

Signaltransduktion, Vesikeltransport, Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Schneeberger et al, 2004; Hofmann et al, 2002). In dieser Arbeit wurde speziell das TJ Plaque Protein ZO-1, für das eine Assoziation mit Cx 43 beschrieben ist (siehe unten) und ein mit ZO-1 assoziiertes Transmembranprotein, Occludin, untersucht.

Occludin ist ein ~60 kDa großes Protein, das aus 504 Aminosäuren besteht (Furuse et al, 1993). Es besitzt vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre und eine kurze intrazelluläre Schleife. Die beiden extrazellulären Schleifen sind für die Zell-Zell-Verbindung verantwortlich und dienen der junktionalen Abdichtung (Ando-Akatsuka et al, 1996). Obwohl Occludin in fast allen TJ vorhanden ist, scheint es für ihre Ausbildung nicht essentiell zu sein. So kann beispielsweise in embryonalen Stammzellen, denen Occludin fehlt, eine normale Permeabilitätsbarriere ausgebildet werden (Saitou et al, 1998). Vielmehr scheint Occludin die TJ- Permeabilität und Zaunfunktion zu kontrollieren. Occludin wird in der interfollikulären Epidermis ausschließlich im Stratum granulosum gefunden (Brandner et al, 2002).

Der intrazelluläre COOH-Terminus von Occludin (Fanning et al,1998; Furuse et al,1994) ist mit dem zytoplasmatischen Plaque Protein ZO-1 assoziiert, Zonula occludens-1 (ZO-1) ist darüber hinaus mit den aktinbindenden Proteinen Catenin (Itoh et al,1999; Itoh et al,1997; Rajasekaran et al,1996) und Spectrin (Mattagajasingh et al, 2000) sowie mit weiteren TJ Proteinen verbunden und bindet die TJ Plaques an das Aktinzytoskelett.

Zonula occludens protein1 (ZO-1) ist ein 225 kDa schweres peripheres Membran assoziiertes Protein und ein Mitglied der Membran assoziierten Guanylatkinase Familie (MAGUKs) (Mitic et al, 1998). Es scheint eine zentrale Rolle in der Organisation und Anordnung von Transmembranproteinen zu spielen (Fanning et al, 1998).

Drei verschiedene Zonula occludens Proteine sind bisher bekannt: ZO-1, ZO-2 und ZO-3. Sie bestehen aus drei PDZ (PSD95/SAP90, Discs large, ZO-1) Domänen, einer SH3-Domäne, einer Guanylatkinase- Einheit und einer aktinbindenden Region. Man vermutet, dass diese ZO MAGUK Proteine verschiedene Komponenten der TJ durch direkte Bindung an spezifische Domänen oder Regionen zusammenfügt (Fanning et al, 1998). ZO-1 bindet mit seinen PDZ Domänen Claudine und JAMs, mit seiner Guanylatkinase homologen Domäne Occludin (Cereijido et al, 2000; Gonzalez-Mariscal et al, 2000) und verknüpft sie mit cytoplasmatischen Proteinen, z.B. Signalmolekülen und dem Aktinzytoskelett. ZO-1 wird deshalb auch als "Gerüst" Protein bezeichnet (Fanning et al, 2002; Zahraoui et al, 2000; Angst et al, 2001). In der Epidermis ist es in den oberen Schichten lokalisiert (Brandner et al, 2002, 2006).

Wie bereits erwähnt, wurde eine Interaktion zwischen Cx 43 und ZO-1 in mehreren Arbeiten beschrieben.

So rekrutiert das ZO-1 Protein möglicherweise Signalproteine in die aus Cx 43 aufgebauten Gap junctions (Giepmans et al, 2001). Diese Interaktion reguliert eventuell die Größe von Gap junction Plaques. Kleine Gap junction Plaques sind oft mit TJ Strängen verknüpft, was vermuten lässt, dass Gap junctions eng mit der Funktion der TJ, die Zellpolarität aufrechtzuerhalten, zusammenhängen (Kojima et al, 2002).

Generell scheinen Connexine auch die Permeabilität von TJ beeinflussen zu können. So führt die Transfektion von Cx 26 in intestinale epitheliale Zellen zu einer erniedrigten parazellulären Permeabilität, begleitet von einer Hochregulation von Claudin- 4, nicht aber von Occludin (Morita et al, 2004).

1.5 Fragestellung

Die Fragestellung in der vorliegenden Arbeit war, ob es durch Applizieren von Cx 43 identischen Peptiden (GAP26, GAP27) möglich ist. eine Wundheilungsbeschleunigung hervorzurufen. Hierbei sollte die körpereigene Herunterregulation in den ersten Stunden der Verwundung verstärkt werden. Die gegebenenfalls gefundene Beschleunigung der Wundheilung sollte mit der Zahl von proliferativen Zellen in verschiedenen Bereichen der Wunde assoziiert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit die Applikation dieser Peptide die Lokalisation der Connexine 26 und 43 sowie der Tight Junction Moleküle Occludin und ZO-1 beeinflusst. Für die Experimente wurde das bereits im Labor etablierte porcine ex-vivo Wundheilungsmodell verwendet (Brandner et al, 2006), das eine Beobachtung der Wundheilung über einen Zeitraum von fünf Tagen erlaubt.

Mit diesen Untersuchungen sollten Ergebnisse, die im Nager gefunden wurden (Kretz et al, 2003; Qiu et al, 2003) überprüft – wie bereits erwähnt ist die Verteilung der Connexine in normaler Haut zwischen Nagern und Mensch bzw. Schwein unterschiedlich; darüber hinaus ist der Ablauf der Wundheilung unterschiedlich - und weitergehende Erkenntnisse zur Wirkung der Cx 43 Herabregulation gefunden werden.

2 Material

2.1 Untersuchungsgut

Es wurden Hautbiopsien verwendet, die Schweineohren entnommen wurden. Die Schweine waren sechs Monate alt, weiblich oder im Alter von sechs Wochen kastriert und gehörten der Rasse crossbred Yorkshire/ deutsches Edelschwein an. Die Ohren wurden sofort nach der Schlachtung entnommen und per Kurier ins Labor transportiert.

2.2 Geräte

Biopsy Punch:	Durchmesser 6 und 3 mm (Stiefel Laboratorium AG, Offenbach)				
Brutschrank:	Sanyo CO2 Inkubator (Sanyo Electric Co., Japan)				
Digitalkamera:	Kodak dc 120 (Kodak GmbH, Stuttgart)				
Kryostat:	Leica CM 3050 (Leica Camera AG, Solms)				
Markierungsstift für Gefrierschnitte:	DAKO CYTOMATION PEN (Dako A/S, Denmark)				
Mikroskope:	Leica DM-SL, Leica Mikroskope& Systeme GmbH Wetzlar, Zeiss Axioplan 2, Immunfluoreszenzmikroskop (Zeiss GmbH, Jena) mit CCD-Kamera Hamamatsu C4742-95 (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching), Software: Openlab 2.0.4 (Imkprovision, Coventry, UK)				

Pipetten:	eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg)					
Ph Meter:	Knick 766 Calimatric (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin)					
Tischzentrifuge:	Heraeus Hanau)	Biofuge	pico	(Heraeus	Holding	GmbH,

2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Aceton:	(Biesterfeld Chemikaliendistribution, Hamburg)						
Deckgläser:	24 * 50 mm, No.1 Superior (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen)						
Einbettungsmedium:	Tissuecol tissue freezing medium (Jung, Leica Intruments GmbH, Nussloch)						
indeckungsmedium: Fluoromount-G Southern Biotechnology Associates,Inc. (Birmingham, AL, USA)							
Eosin:	2 g in 1000 ml aqua dest. + 20 µl Eisessig (Merck KGaA, Darmstadt)						
Eppendorf-Gefäße: Safe Lock Tubes 2,0, 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamb							
Ethanol:	(Walter -CMP GmbH & Co. KG, Kiel)						
Eukitt:	(O. Kindler GmbH &Co, Freiburg)						
Hämalaunlösung:	unlösung: (Merck KGaA, Darmstadt)						

HCL- Alkohol:	25 % HCL (Sigma- Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze); 25 ml 25 % HCL in 1 l 96% Ethanol					
Isopentan:	(Sigma- Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze)					
KCL:	(Merck KGaA, Darmstadt)					
KH2PO4:	(Merck KGaA, Darmstadt)					
Kompressen:	ES 10 * 20 (Hartmann AG, Heidenheim)					
Multiwell-Platten:	BD Falcon Multiwell Cell Culture Plates (BD Biosciences, CA, USA)					
NaCI:	(J.T. Baker Mallinckrodt, Deventer, Niederlande)					
Na2HPO4:	(Merck KGaA, Darmstadt)					
Objektträger:	Super Frost Assistent Glaswarenfels (K. Hecht KG, Sondheim)					
Petrischalen:	(Becton Dickinson tcomp, USA)					
Pipettenspitzen:	eppendorf T.I.P.S. Standart 0,1-10 μl, 2-200 μl, 20 μl, 50-100 μl, 5 ml (Eppendorf AG, Hamburg)					
Skalpel:	Cutfix (Braun aesculap AG und Co. KG, Tuttlingen)					
Sterilium:	(Bode Chemie GmbH & Co. KG, Hamburg)					
Triton:	(X-100 Sigma, Chemical Co., St. Louis, USA)					
Xylolersatz:	(Med. Technik GmbH, Elektronik Vogel, Giessen)					

2.4 Material Immunhistochemie

2.4.1 Primärantikörper

Protein	Antikörper, (Klon), Isotyp, Verdünnung, mit/ohne Block, Firma
Cx 43:	monoklonaler AK der Maus, (2), Catalog: c13720, Isotyp: IgG1, Endverdünnung 1:100, (Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA)
Cx 26:	polyklonaler AK des Meerschweinchens, Endverdünnung 1:200 (eigene Herstellung, Brandner et al., 2004)
Ki-67:	monoklonaler AK der Maus, (Mib-1), Isotyp: IgG1 Endverdünnung 1:50, DAKO (Denmark)
Occludin:	monoklonaler AK der Maus, (OC-3F10), Isotyp: IgG1 Endverdünnung 1:70, (Zymed Laboratoires, San Francisco, CA, USA)
ZO-1:	polyklonaler AK des Kaninchens, (ZR-1), Endverdünnung 1:250, NGS+ Tritron, (Zymed Laboratoires, San Francisco, CA, USA)

2.4.2 Sekundärantikörper:

Gerichtet gegen:

Maus-Antikörper:	lgG der	Ziege	, gekopp	elt mit Alexa Flu	or® 594, Klon:
	A11020	(Alex	a Fluor®	594 F(ab`) ₂ , (M	Nolecular Probes
	Europe	BV,	Leiden,	Netherlands),	Endverdünnung
	1:1250				

Kaninchen-Antikörper: IgG der Ziege gekoppelt mit Alexa Fluor® 594, Klon: A11072 (Alexa Fluor® 594 F(ab`)₂, (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Netherlands), Endverdünnung 1:1250

Meerschweinchen-

Antikörper:IgG der Ziege, gekoppelt mit Alexa Fluor® 594,Klon:A11076 (Alexa Fluor® 594), (Molecular Probes EuropeBV, Leiden, Netherlands), Endverdünnung 1:1250

2.4.3 DNA Färbung

Die DNA Färbung erfolgte mittels DAPI (4`,6-Diamidin-2`phenylindoldihydrochlorid) der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) in einer Verdünnung von 1:5000 in Aqua dest.

2.4.4 Puffer und Lösungen

Blocklösung: 10 µl Triton 10% (X-100 Sigma, Chemical Co., (St. Louis, USA) in 970 µl PBS, 20 µl NGS (normal goat serum, Dianova GmbH, Hamburg)

PBS (Phosphatgepufferte	
Kochsalzlösung)-	
Gebrauchslösung (1x):	200 ml PBS-Stammlösung in 1800 ml Aqua destilliert

PBS Stammlösung (10x): 160 g NaCl+ 4 g KCl+ 23.2 g Na₂HPO₄ * 2H₂O+ 4 g KH₂PO₄ ad 2 l H₂O, pH 7,3-7,5 einstellen und autoklavieren

2.4.5 Cx 43 mimetische Peptide

GAP26 und GAP27 wurden von der Firma Peptide Specialities, Heidelberg, Deutschland in unserem Auftrag gemäß der Sequenzen VCYDKSFPISHVR für GAP26 und SRPTEKTIFII für GAP27 hergestellt (Evans et al, 2001).

3 Methoden

3.1 Vorbereitung und Anlegen der porcinen Wundheilungsmodelle

Die Schweineohren wurden nach dem Empfang sofort bearbeitet. Als Erstes wurden sie mit Leitungswasser gereinigt, die Haare mit einer Schere entfernt und anschließend mit Sterilium gespült. Die Ohren wurden in eine Schale gelegt und auf den Bereich, von dem später Biopsien entnommen werden sollten, eine mit Sterilium getränkte Kompresse gelegt, welche für zehn Minuten einwirkte. Anschließend wurde das Ohr mit steriler Kochsalzlösung gespült. Im Verlauf der Einwirkungszeit wurden die Wells der Lochplatten mit Dulbecco`s modifiziertem Medium, das mit Hydrocortison, fetalem Kälberserum, Penicillin und Streptomycin substituiert war, gefüllt und in jedes Loch ein Stück Gaze gelegt.

Aus dem Ohr wurden nun 6 mm Stanzen entnommen und auf einen sterilen Objektträger gelegt. Von den Biopsien wurde das Fettgewebe, die Subkutis und Teile der unteren Dermis mit dem Skalpel entfernt. Danach wurde im Zentrum der Biopsien jeweils eine 3 mm Stanze gefertigt. Die Biopsien wurden nachfolgend mit der Dermis auf das vorbereitete Gazestück in die Lochplatten gesetzt. Das Medium bedeckte die Dermis der Biopsie, nicht hingegen die Epidermis, welche Kontakt zur Luft hatte.

In die 3 mm Wunden wurden nun 5 µl der Cx 43 mimetischen Peptide GAP27 und GAP26 in den Konzentrationen 0,6 mM und 0,06 mM appliziert. Die Kontrolle erhielt 5 µl PBS. Danach kamen die Modelle für 24 Stunden in den Brutschrank.

Nach 24 Stunden erfolgte eine weitere Applikation in die 3 mm Wunde.

Nach 48 Stunden wurde der Versuch durch Schockgefrieren der Modelle, in zuvor gekühltem flüssigen Isopentan, mit Stickstoff abgestoppt und die Modelle bei -80°C aufbewahrt.

Dieses Modell ist patentiert (Patent-Nr. DE 10317400).

3.2 Histologische Techniken

3.2.1 Herstellung und Fixierung der Kryoschnitte

Jedes tiefgefrorene Modell wurde mit "tissue freezing medium" eingebettet und dann mithilfe des Kryostaten bei -26°C in 6 µm dicke Scheiben geschnitten, die anschließend auf Objektträger übertragen wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Experimente wurde darauf geachtet, die Schnitte aus der Mitte der Modelle zu entnehmen. Anschließend wurden sie 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, die Schnitte zehn Minuten in Aceton fixiert und dann noch einmal bei Raumtemperatur zehn Minuten luftgetrocknet. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C aufbewahrt.

3.2.2 HE Färbung

Die Schnitte wurden sechs Minuten in Hämatoxylin und eine Minute in Leitungswasser inkubiert, danach wurden sie noch einmal kurz in Leitungswasser getaucht. Anschließend wurden die Objektträger mit den Schnitten 3-5mal in HCL Alkohol geschwenkt, um sie dann für zehn Minuten unter fließendes Leitungswasser zu stellen. Danach wurden sie abwechselnd kurz in Aqua dest., in 0,2% Eosin für 30 Sekunden und wieder in Aqua dest. getaucht. Darauf wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe 3-5mal kurz in Ethanol 70%, Ethanol 80%, Ethanol 96%, Ethanol absolut, Ethanol absolut und zwei Minuten in Xylolersatz 1 geschwenkt. Zuletzt wurden die Schnitte mit Eukitt eingebettet.

3.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Kryoschnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, luftgetrocknet und mit einem PAP Pen umkreist; danach die Primärantikörper in PBS verdünnt (Verdünnung der einzelnen Antikörper siehe Material), gemischt und drei Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand weiterverwendet und 25 µl Primärantikörper pro Schnitt aufgetragen und 30 Minuten inkubiert. Nach der Einwirkungszeit wurden die Objektträger für zehn Minuten mit PBS gespült. Es folgte ein weiteres PBS Bad für zehn Minuten. In der Zeit der PBS Spülung wurde der Sekundärantikörper in PBS verdünnt, gemischt und drei Minuten zentrifugiert, später die Objektträger nach dem PBS Bad kurz abgeschüttelt und der Sekundärantikörper aufgetragen, der weitere 30 Minuten in der feuchten geschlossenen Kammer einwirkte. Die Sekundärantikörper waren gegen die jeweilige Spezies der Primärantikörper (anti-mouse, anti-rabbit, antiguinea-pig) gerichtet. Anschließend wurden die Objektträger fünf Minuten mit PBS gespült, eine Minute mit DAPI (1:5000 in Aqua dest.) inkubiert, danach zweimal zehn Minuten wiederum mit PBS gespült und abschließend in Aqua dest. gespült. Die Objektträger wurden dann mit der Pinzette aus dem Behälter entnommen, abgeklopft, von unten abgetupft, in eine Mappe gelegt, Fluoromount auf die Schnitte aufgetragen und mit einem Deckplättchen versehen. Über Nacht blieb die Mappe mit den gefärbten Objektträgern bei Raumtemperatur liegen, um sie am nächsten Tag bei +4°C im Kühlraum zu lagern.

Bei der ZO-1 Färbung wurde vor dem Auftragen des Primärantikörpers eine Blocklösung auf die Schnitte appliziert, die 15 Minuten einwirkte. Sie bestand aus Triton X100, NGS und PBS (siehe Material (2.4.4)) und diente dazu, die Oberflächenspannung zu verändern und unspezifische Bindungsstellen im Schnitt abzusättigen. Dadurch werden Epitope z.T. freigelegt und unerwünschte Kreuzreaktionen vermieden.

3.3 Auswertung der Färbungen

3.3.1 HE Färbungen

Bei den HE Färbungen wurde die Länge der regenerierten Epidermis auf der rechten und linken Seite der Wunde bewertet und anschließend der Mittelwert gebildet.

Die Auswertung der HE Schnitte erfolgte nach folgender Einteilung:

- 0 = keine regenerierte Epidermis
- 1 = kurze regenerierte Epidermis
- 2 = längere regenerierte Epidermis
- 3 = einschichtig geschlossene Wunde
- 4 = mehrschichtig geschlossene Wunde

Es wurden jeweils zwei Schnitte pro Modell ausgewertet.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde das Mikroskop Axiophot 2 und die Software openlab 2.0.4 eingesetzt.

Die Auswertung der Intensität der Immunreaktion (Stärke der Antikörperfärbung) erfolgte nach folgender Einteilung:

- - keine Immunreaktion
- + schwache Immunreaktion
- ++ mittlere Immunreaktion
- +++ starke Immunreaktion

Bei der Auswertung der Färbung der proliferativen Zellen (Ki-67 positiv) wurden jeweils getrennt voneinander die regenerierende Epidermis, der Wundrand und die Epidermis nahe der Wunde (bis zwei Reteleisten entfernt) ausgewertet, jeweils auf der rechten und linken Seite der Wunde. In den Bereichen regenerierende Epidermis und Wundrand wurden die positiven Zellen jeweils addiert und anschließend der Quotient mit der Gesamtzahl der Zellen in diesem Bereich (die durch DAPI positive Kerne identifiziert wurden) berechnet. Im Bereich der Epidermis nahe der Wunde wurden die positiven Zellen ebenfalls addiert und anschließend der Quotient mit der Gesamtzahl der basalen DAPI-positiven Zellen gebildet. Anschließend wurde der Mittelwert aus linkem und rechtem Wundrand gebildet. Es wurden jeweils zwei Schnitte pro Modell ausgewertet.

3.4 Statistische Auswertung

Bei den HE Färbungen wurde der Einfluss von GAP26 und GAP27 auf den Wundheilungsfortschritt, bezogen auf PBS, statistisch ausgewertet.

Für die statistische Auswertung diente der Mittelwert jedes einzelnen Modells und ein Mittelwert für alle 14 Modelle der jeweiligen Applikation. Die Mittelwerte der einzelnen Modelle in der 0,6 mM und 0,06 mM Verdünnung wurden darüber hinaus auf den demselben Schwein zugehörigen PBS Mittelwert bezogen und somit normiert. Die Werte werden als Mittelwerte +/- SEM angegeben.

Abschließend wurde der gepaarten Student-T-Test angewendet, um die berechneten Ergebnisse statistisch als signifikant einschätzen oder verwerfen zu können.

Der Einfluss von GAP27 auf die Mitoserate wurde in die Abschnitte regenerierende Epidermis, Wundrand und Epidermis nahe der Wunde unterteilt und getrennt voneinander ausgewertet. Auch hier werden Mittelwerte +/- SEM angegeben. Um die errechneten Ergebnisse statistisch als signifikant hervorheben bzw. verwerfen zu können, wurde der gepaarte Student-T-Test eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Wundheilungsfortschritt

4.1.1 GAP27

Die nach dem in Material und Methoden beschriebenen Scoring-System ausgewerteten HE gefärbten Schnitte zeigten, dass die mit dem Connexin 43 mimetischen Peptid GAP27 behandelten Modelle sowohl in der Konzentration 0,6 mM als auch in der Konzentration 0,06 mM eine im Vergleich zu der Kontrolle beschleunigte Wundheilung aufwiesen (siehe Abbildung 1).



Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin gefärbter Querschnitt durch ein Wundmodell, das (A) mit PBS bzw. (B) mit 0,6 mM GAP27 behandelt worden war. Längenmaßstab: 50 µm

Die Ergebnisse der Kontrollmodelle wurden für die Auswertung gleich eins gesetzt, die Ergebnisse der mit GAP27 behandelten Modelle darauf normiert. Der Mittelwert des Wundheilungsfortschritts der Modelle, die mit 0,6 mM GAP27 behandelt wurden, bezogen auf die Kontrollmodelle, lag um den Faktor 11 höher (siehe Abbildung 2). Auch bei den mit 0,06 mM GAP27 behandelten Modellen konnte man eine, im Vergleich zu den Kontrollmodellen, beschleunigte Wundheilung beobachten (siehe Abbildung 2).



Abbildung 2: Darstellung des Wundheilungsfortschritts in Modellen, die mit 0,06 mM GAP27 (rot) bzw. 0,6 mM GAP27 (gelb) behandelt worden waren im Vergleich zu Modellen, die mit PBS (blau) behandelt worden waren (Mittelwerte + SEM) * markiert statistisch signifikante Unterschiede.

Im gepaarten Student-T-Test zeigte sich, dass der Unterschied zwischen den mit 0,6 mM GAP27 und den mit PBS behandelten Modellen (Kontrolle), statistisch signifikant war (p = 0,01). Der Unterschied, der zwischen den mit 0,06 mM GAP27 und den mit PBS behandelten Modellen (Kontrolle) gefunden wurde, erwies sich hingegen als statistisch nicht signifikant (p=0,07).

4.1.2 GAP26

Die ebenfalls nach dem in Material und Methoden beschriebenen Scoring-System ausgewerteten HE gefärbten Schnitte zeigten, dass die mit GAP26 behandelten Modelle sowohl in der Konzentration 0,6 mM als auch in der Konzentration 0,06 mM keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollmodellen hinsichtlich der Wundheilung aufwiesen. Zwar beobachtete man für 0,6 mM tendentiell eine vierfache Erhöhung der Wundheilungsgeschwindigkeit, aber aufgrund der hohen Schwankungen war dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 3). Bei den mit 0,06 mM GAP26 behandelten Modellen existierte ein um den Faktor 1,4 höherer Mittelwert, bezogen auf die Kontrollmodelle (siehe Abbildung 3). Auch diese marginale Erhöhung war statistisch nicht signifikant (p für 0,6 mM GAP26 = 0,17; p für 0,06 mM GAP26 = 0,18).



Abbildung 3: Darstellung des Wundheilungsfortschritts in Modellen, die mit 0,06 mM GAP26 (rot) bzw. 0,6 mM GAP26 (gelb) behandelt worden waren im Vergleich zu Modellen, die mit PBS (blau) behandelt worden waren (Mittelwerte + SEM).

4.2 Proliferation von Keratinocyten

Zur Überprüfung, ob die durch 0,06 mM GAP27 gefundene statistisch signifikante Wundheilungsförderung aus einer erhöhten Anzahl proliferativen Zellen resultierte, wurde in verschiedenen Bereichen des Wundmodells der Anteil der Ki-67 positiven Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl bestimmt (siehe Material und Methoden).

Es wurden die Wundränder, der Bereich hinter den Wundrändern sowie die regenerierende Epidermis ausgewertet. Mitotische Zellen sind in der normalen Haut auf die Basalzellschicht begrenzt, während der Wundheilung findet man sie an den Wundrändern und in der regenerierenden Epidermis auch suprabasal. Abbildung 7 zeigt Wundmodelle mit vielen Ki-67 positiven Zellen, Abbildung 8 hingegen zeigt Wundmodelle mit wenig Ki-67 positiven Zellen.

In der regenerierenden Epidermis fanden wir 48 Stunden nach Verwundung eine statistisch signifikant erhöhte Zahl von proliferativen Zellen in den Modellen, die mit 0,6 mM GAP27 behandelt wurden (siehe Abbildung 7), im Vergleich zu den Kontrollmodellen mit PBS (p=0,01) (siehe Abbildung 8). Die mit 0,06 mM GAP27 behandelten Modelle zeigten bei der Mitoserate zwar ebenfalls einen erhöhten Anteil proliferativer Zellen, allerdings wies dieses Ergebnis im gepaarten Student-T-Test keine statistische Signifikanz auf (p=0,13) (siehe Abbildung 4).


Abbildung 4: Darstellung des Anteils proliferativer Zellen in der regenerierenden Epidermis in Modellen, die mit 0,06 mM GAP27 (rot) bzw. 0,6 mM GAP27 (gelb) behandelt worden waren im Vergleich zu Modellen, die mit PBS (blau) behandelt worden waren (Mittelwerte + SEM) * markiert statistisch signifikante Unterschiede.

Auch am Wundrand war der Anteil proliferativer Zellen in den Modellen, die mit 0,6 mM GAP27 behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle, statistisch signifikant erhöht (p= 0,004). In den mit 0,06 mM GAP27 behandelten Modellen fand man ebenfalls eine Erhöhung proliferativer Zellen im Vergleich zur Kontrolle, allerdings war dies nicht statistisch signifikant (p= 0,08) (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5: Darstellung des Anteils proliferativer Zellen in den Wundrändern in Modellen, die mit 0,06 mM GAP27 (rot) bzw. 0,6 mM GAP27 (gelb) behandelt worden waren im Vergleich zu den Modellen, die mit PBS (blau) behandelt worden waren (Mittelwerte + SEM) * markiert statistisch signifikante Unterschiede.

In den Modellen, die mit 0,6 mM GAP27 behandelt wurden, zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Anzahl proliferativer Zellen in der regenerierenden Epidermis und in den Wundrändern.

In der den Wundrändern benachbarten Epidermis wurde weder bei den mit 0,6 mM GAP27 noch den mit 0,06 mM behandelten Modellen eine statistisch signifikante Erhöhung der Zahl proliferativer Zellen beobachtet (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: Darstellung des Anteils proliferativer Zellen in der benachbarten Epidermis in Modellen, die mit 0,06 mM GAP27 (rot) bzw. 0,6 mM GAP27 (gelb) behandelt worden waren im Vergleich zu den Modellen, die mit PBS (blau) behandelt worden waren.

Der Anteil proliferativer Zellen in den GAP26 behandelten Modellen wurde nicht untersucht, da dieses Peptid zu keiner signifikanten Veränderung der Wundheilungsgeschwindigkeit führte.



Abbildung 7: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von anti-Ki-67 (rot) gefärbten Gewebeschnitten. Darstellung eines intensiv angefärbten anti-Ki-67 (rot) positiv gefärbten Wundrandes (A) in Überlagerung mit Phasenkontrast (A`). Darstellung anti-Ki-67 (rot) positiv gefärbten Reteleisten (B) in einiger Entfernung zur Wunde in Überlagerung mit Phasenkontrast (B`). Darstellung einer intensiv angefärbten anti-Ki-67 (rot) regenerierenden Epidermis (C) in Überlagerung mit Phasenkontrast (C`). Längenmaßstab: 50 µm.



Abbildung 8: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von anti-Ki-67 (rot) gefärbten Gewebeschnitten. Darstellung eines schwachen und wenig Mitosen enthaltenen anti-Ki-67 (rot) positiv gefärbten Wundrandes (A) in Überlagerung mit Phasenkontrast (A`). Darstellung schwach ausgeprägter anti-Ki-67 (rot) positiv gefärbter Reteleisten (B) in einiger Entfernung zur Wunde in Überlagerung mit Phasenkontrast (B`). Darstellung einer kaum anti-Ki-67 (rot) positiv gefärbten regenerierenden Epidermis (C) in Überlagerung mit Phasenkontrast (C`).Längenmaßstab: 50 µm.

4.3 Gap junction Proteine

4.3.1 Connexin 43

Cx 43 ist das Hauptprotein der Gap junctions in der Epidermis, wo es in allen Schichten lokalisiert ist. Seine Intensität nimmt von basal nach suprabasal zu (Brandner, 2006).

In den Kontrollmodellen sah man 48 Stunden nach Verwundung bei 12 von 14 Modellen eine Abwesenheit von Cx 43 an den Wundrändern (siehe Abbildung 12). Ein Modell zeigte Cx 43 positiv gefärbte Wundränder und ein Modell besaß sowohl einen Cx 43 positiv als auch einen Cx 43 negativ gefärbten Wundrand (siehe Tabelle 1). Die regenerierende Epidermis der Kontrollmodelle war in sechs Modellen komplett Cx 43 negativ, drei wurden im Verlauf Richtung Wundmitte negativ (siehe Tabelle 2).

Die dem Wundrand benachbarte, nicht verwundete Epidermis hingegen war in allen Schichten intensiv Cx 43 positiv.

Bei den mit 0,6 mM GAP27 behandelten Modellen waren in acht von 14 Modellen die Wundränder Cx 43 negativ, bei vier hingegen positiv (siehe Abbildung 11). Zwei Modelle zeigten sowohl positive als auch negative Wundränder (siehe Tabelle 1). Die regenerierende Epidermis war in drei Modellen positiv (siehe Abbildung 11), in fünf negativ und in zwei Modellen positiv, im Verlauf Richtung Wundmitte allerdings negativ werdend (siehe Tabelle 2). Genau wie bei der Kontrolle war die Epidermis der benachbarten Haut in den mit 0,6 mM GAP27 behandelten Modellen in allen Schichten intensiv Cx 43 positiv.

Bei den mit 0,06 mM GAP27 behandelten Modellen waren bei zehn der 14 Schweinemodelle die Wundränder Cx 43 negativ, bei vier Modellen hingegen positiv (siehe Tabelle 1). Die regenerierende Epidermis war in sechs Modellen Cx 43 negativ (siehe Abbildung 12), keine durchgehend positiv und fünf wurden im Verlauf Richtung Wundmitte negativ (siehe Tabelle 2).

	Wundrand positiv	Wundrand negativ
	-	_
Kontrolle*	1/14	12/14
0,06 mM	4/14	10/14
0,6 mM**	4/14	8/14

Tabelle 1: Darstellung der Cx 43 positiv und negativ gefärbten Wundränder der Kontrollmodelle sowie der mit 0,6 mM und 0,06 mM GAP27 behandelten Modelle.

* Ein Modell auf einer Seite positiv, auf der anderen negativ.

** Zwei Modelle auf einer Seite positiv, auf der anderen negativ.

Von den insgesamt neun Modellen, welche positive Wundränder besaßen, waren sieben Modelle weiter in der Wundheilung fortgeschritten als Modelle mit negativem Wundrand (siehe Abbildung 9), wobei sich allerdings keine statistische Signifikanz ergab (p= 0,08).



Abbildung 9: Darstellung des Wundheilungsfortschrittes bei Cx 43 positiv gefärbten Wundrändern (blau) im Vergleich zu Cx 43 negativ gefärbten Wundrändern (rot) (Mittelwerte + SEM).

Tabelle 2: Darstellung der Cx 43 positiv, negativ und Cx 43 positiv- im Verlauf zur Wundmitte negativ werdenden- regenerierenden Epidermen der Kontrollmodelle sowie der mit 0,6 mM und 0,06 mM GAP27 behandelten Modelle.

	Regenerierende	Regenerierende	Regenerierende
	Epidermis positiv	Epidermis zur Mitte	Epidermis negativ
		hin negativ	
Kontrolle	0/9	3/9	6/9
0,06 mM**	0/13	5/13	6/13
0,6 mM*,***	3/12	2/12	5/12

* Ein Modell zeigte sowohl eine negative als auch eine positive regenerierende Epidermis, die Richtung Wundmitte negativ wurde.

** Zwei Modelle zeigten sowohl eine negative als auch eine positive regenerierende Epidermis, die Richtung Wundmitte negativ wurde.

*** Ein Modell zeigte sowohl eine negative als auch eine positive regenerierende Epidermis Die restlichen Modelle zeigten noch keine regenerierende Epidermis.

Modelle mit einer durchgehend Cx 43 positiv regenerierenden Epidermis zeigten tendentiell einen stärkeren Wundheilungsfortschritt im Vergleich zu Modellen mit regenerierenden Epidermen, die Cx 43 positiv am Rand waren, im Verlauf Richtung Wundmitte jedoch negativ wurden (p=0,15) bzw. solchen mit Cx 43 negativ regenerierenden Epidermen (p=0,14) (siehe Abbildung 10). Allerdings zeigten die Unterschiede keine statistische Signifikanz.



Abbildung 10: Darstellung des Wundheilungsfortschrittes bei Cx 43 positiv gefärbter regenerierender Epidermis (blau) im Vergleich zu Cx 43 negativ gefärbter regenerierender Epidermis (rot) sowie zu Cx 43 positiver gefärbter regenerierender Epidermis in der Nähe des Wundrandes, welche in Richtung Wundmitte hin negativ wird (gelb) (Mittelwerte + SEM).



Abbildung 11: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von einem mit anti-Cx 43 (rot) gefärbten Gewebeschnitt. Darstellung eines Cx 43 (rot) positiv gefärbten Wundrandes (A) in Überlagerung mit dem Phasenkontrast (A`). Darstellung einer Cx 43 (rot) positiv gefärbten regenerierenden Epidermis (B) in Überlagerung mit dem Phasenkontrast (B`). Längenmaßstab: 50 μm.



Abbildung 12: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von einem mit anti-Cx 43 (rot) gefärbten Gewebeschnitt. Darstellung eines Cx 43 negativ gefärbten Wundrandes mit Cx 43 negativ gefärbter regenerierender Epidermis (A) in Überlagerung mit dem Phasenkontrast (A`). Längenmaßstab: 50µm.

4.3.2 Connexin 26

In gesunder, nicht verwundeter interfollikulärer Epidermis ist Cx 26 mittels immunhistochemischer Färbungen im Regelfall nicht nachweisbar.

In unseren Untersuchungsergebnissen wiesen alle Modelle Cx 26 negativ Färbungen in Bereichen, die den Wundrändern benachbart sind, auf. Die Modelle der PBS Kontrolle wiesen alle einen Cx 26 positiv gefärbten Wundrand auf (siehe Tabelle 3). Die regenerierenden Epidermen waren bei acht Kontrollmodellen in der Nähe des Wundrandes Cx 26 positiv, im weiteren Verlauf Richtung Wundmitte wurden sie, einschließlich der vordersten Zellen, negativ (siehe Abbildung 15). Eine regenerierende Epidermis war komplett Cx 26 negativ (siehe Tabelle 4).

Bei den mit 0,6 mM GAP27 behandelten Modellen beobachtete man, genau wie in den Kontrollenmodellen einen Cx 26 positiven Wundrand (siehe Abbildung 14). Überall dort, wo es zu einer Wundheilung kam, zeigten sich Cx 26 positive regenerierende Epidermen, wobei acht Modelle in Richtung Wundmitte Cx 26 negativ wurden und vier Modelle bis zu den leading edges Cx 26 positiv blieben (siehe Abbildung 14). Zwei dieser Modelle zeigten bereits geschlossene Wunden (siehe Tabelle 4).

Bei den mit 0,06 mM GAP27 behandelten Modellen zeigten ebenfalls alle Modelle einen Cx 26 positiven Wundrand (siehe Tabelle 3). Bei 13 regenerierenden Epidermen waren zwei Cx 26 negativ, eine Cx 26 positiv und neun regenerierende Epidermen wurden im Verlauf Richtung Wundmitte negativ. Ein Modell zeigte eine Cx 26 negativ regenerierende Epidermis auf einer Seite, auf der anderen Seite hingegen eine Cx 26 positiv regenerierende Epidermis, die Richtung Wundmitte negativ wurde (siehe Tabelle 4).

Tabelle 3: Darstellung der Cx 26 positiv und negativ gefärbten Wundränder der Kontrollmodelle sowie der mit 0,6 mM und 0,06 mM GAP27 behandelten Modelle.

	Wundrand positiv	Wundrand negativ
Kontrolle*	13/14	0/14
0,06 mM	14/14	0/14
0,6 mM	14/14	0/14

* Ein Modell auf einer Seite positiv, auf der anderen negativ.

Tabelle 4: Darstellung der Cx 26 positiv, negativ und im Verlauf zur Wundmitte hin negativ werdenden regenerierenden Epidermen der Kontrollmodelle sowie der mit 0,6 mM und 0,06 mM GAP27 behandelten Modelle.

	Regenerierende	Regenerierende	Regenerierende
	Epidermis positiv	Epidermis zur Mitte	Epidermis negativ
		hin negativ	
Kontrolle	0/9	8/9	1/9
0,06 mM*	1/13	9/13	2/13
0,6 mM	4/12	8/12	0/12

* Ein Modell zeigte sowohl eine Cx 26 negativ als auch eine Cx 26 positiv regenerierende Epidermis, die Richtung Wundmitte negativ wurde. Die restlichen Modelle zeigten noch keine regenerierende Epidermis.

Tendentiell zeigten Modelle mit einer durchgehend Cx 26 positiv Färbung der regenerierenen Epidermis (p= 0,25) als auch Modelle, deren Cx 26 positiv regenerierenden Epidermen im Verlauf Richtung der leading edges negativ

wurden (p= 0,49), einen weiteren Wundheilungsfortschritt als Modelle mit Cx 26 negativ regenerierenden Epidermen (siehe Abbildung 13), ohne jedoch eine statistische Signifikanz aufzuweisen.



Abbildung 13: Darstellung des Wundheilungsfortschrittes bei Cx 26 positiv gefärbter regenerierender Epidermis (blau) im Vergleich zu Cx 26 negativ gefärbter regenerierender Epidermis (rot) sowie zu Cx 26 positiv gefärbter regenerierender Epidermis in der Nähe des Wundrandes, welche Richtung Wundmitte hin negativ wird (gelb) (Mittelwerte + SEM).



Abbildung 14: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von anti-Cx 26 (rot) gefärbten Gewebeschnitten. Darstellung eines Cx 26 positiv gefärbten (rot) Wundrandes (A) in Überlagerung mit Phasenkontrast (A`). Darstellung einer Cx 26 positiv gefärbten (rot) regenerierenden Epidermis (B) in Überlagerung mit Phasenkontrast (B`) sowie Cx 26 positiv

gefärbten (rot) leading edges (C) in Überlagerung mit Phasenkontrast (C`). Längenmaßstab: 50µm.



Abbildung 15: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von einem anti-Cx 26 gefärbten Gewebeschnitt. Darstellung einer zunächst am Wundrand Cx 26 positiv gefärbten (rot) regenerierenden Epidermis (A) in Überlagerung mit Phasenkontrast (A`), welche in Richtung der Wundmitte in den vorderen Zellen Cx 26 negativ wurde. Längenmaßstab: 50µm.

4.4 Tight junction- assoziierte Proteine

4.4.1 Protein ZO-1

Das Tight junction assoziierte Plaque-Protein ZO-1 liegt auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran und dient den TJ als wichtiges Gerüstprotein. In der Epidermis ist ZO-1 auf die oberen Schichten begrenzt (Brandner et al, 2006). In verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass ZO-1 mit Cx 43 assoziieren kann (Toyofuku et al, 1998; Giepmanns et al, 2001; van Zeijl et al, 2007).

Unsere Untersuchungsergebnisse zeigten keine Unterschiede in der Verteilung von ZO-1 zwischen den mit GAP27 behandelten Modellen und der PBS Kontrolle. Die Lokalisation und Färbeintensität von ZO-1 war ähnlich der Kontrolle, so dass kein sichtbarer Einfluss der Cx 43 Hemmung auf die ZO-1 Anordnung beobachtet werden konnte.

Der Wundrand aller Modelle war ZO-1 positiv (siehe Tabelle 5). Dabei beobachtete man eine im Vergleich zu gesunder Haut verbreiterte Lokalisation. In der regenerierenden Epidermis zeigten alle, bis auf ein Kontrollmodell, eine positive ZO-1 Anfärbbarkeit (siehe Abbildung 16) inklusive der vordersten Zellen (siehe Tabelle 6). In der den Wundrändern benachbarten gesunden Epidermis zeigte sich ZO-1 im Stratum granulosum und teilweise im oberen Stratum spinosum.

Tabelle 5: Darstellung der ZO-1 positiv und negativ gefärbten Wundränder der Kontrollmodelle sowie der mit 0,6 mM und 0,06 mM GAP27 behandelten Modelle.

	Wundrand positiv	Wundrand negativ
Kontrolle	14/14	0/14
0,06 mM	14/14	0/14
0,6 mM*	13/14	0/14

* Ein Modell auf einer Seite positiv, auf der anderen negativ.

Tabelle 6: Darstellung der ZO-1 positiv, negatin und im Verlauf zur Wundmitte hin negativ werdenden regenerierenden Epidermen der Kontrollmodelle sowie der mit 0,6 mM und 0,06 mM GAP27 behandelten Modelle.

	Regenerierende	Regenerierende	Regenerierende
	Epidermis positiv	Epidermis zur Mitte	Epidermis negativ
		hin negativ	
Kontrolle*	7/9	1/9	0/9
0,06 mM*	12/13	0/13	0/13
0,6 mM*	11/12	0/12	0/12

* Ein Modell nicht anfärbbar.

Die restlichen Modelle zeigten noch keine regenerierende Epidermis.



Abbildung 16: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von einem anti-ZO-1 gefärbten Gewebeschnitt. Darstellung einer ZO-1 positiv gefärbten (rot) regenerierenden Epidermis (A) bis hin zu den vordersten Zellen, in Überlagerung mit Phasenkontrast (A`). Längenmaßstab: 50µm.

4.4.2 Occludin

Das TJ-Transmembranprotein Occludin ist sowohl in die Barriere als auch die Zaunfunktion der Zellen involviert. In gesunder Haut ist es auf das Stratum granulosum beschränkt.

In unseren Untersuchungsergebnissen zeigten alle 14 Kontrollmodelle am Wundrand im Stratum granulosum eine positive Occludin Färbung (siehe Tabelle 7). In der regenerierenden Epidermis konnte man in drei Modellen Occludin bis zu den vordersten Zellen nachweisen. In drei Wundmodellen war die regenerierende Epidermis komplett Occludin negativ, in drei Modellen war sie am Wundrand positiv und wurde im Verlauf zur Wundmitte negativ (siehe Tabelle 8). In der der Wunde benachbarten Epidermis war Occludin im Stratum granulosum aller 14 Modelle positiv.

Alle mit 0,6 mM GAP27 behandelten Modellen zeigten sich, ebenso wie die Kontrolle, am Wundrand im Stratum granulosum Occludin positiv (siehe Tabelle 7). In der regenerierenden Epidermis konnte in neun von zwölf 0,6 mM GAP27 Modellen Occludin positiv nachgewiesen werden, davon waren drei Wunden bereits geschlossen, in drei Modellen blieb sie bis zu den vordersten Zellen Occludin positiv (siehe Abbildung 18). In drei Modellen war die regenerierende Epidermis am Wundrand Occludin positiv und wurde zur Wundmitte hin negativ (siehe Tabelle 8). Eine Wundzunge war negativ. Die benachbarte Epidermis färbte sich in allen Modellen im Stratum granulosum Occludin positiv an.

Bei den mit 0,06 mM GAP27 behandelten Modellen ergaben sich ähnliche Resultate. So waren die Wundränder aller 14 Modelle im Stratum granulosum Occludin positiv (siehe Tabelle 7), die regenerierende Epidermis in zehn Fällen Occludin positiv. Davon zeigten sich sechs regenerierende Epidermen Occludin positiv, welche zur Wundmitte hin negativ wurde (siehe Abbildung 19). In vier Modellen blieb hingegen die regenerierende Epidermis bis zu den leading edges Occludin positiv, ein Modell war bereits verschlossen (siehe Tabelle 8). Drei Modelle zeigten sowohl eine Occludin negativ als auch eine Occludin positiv regenerierende Epidermis. Alle Modelle zeigten in der benachbarten Epidermis im Stratum granulosum eine intensive Occludin Färbung.

Tabelle 7: Darstellung der Occludin positiv und negativ gefärbten Wundränder der Kontrollmodelle sowie der mit 0,6 mM und 0,06 mM GAP27 behandelten Modelle.

	Wundrand positiv	Wundrand negativ
Kontrolle	14/14	0/14
0,06 mM	14/14	0/14
0,6 mM	14/14	0/14

Tabelle 8: Darstellung der Occludin positiv, negativ und Occludin positiv- im Verlauf zur Wundmitte hin negativ werdenden-regenerierenden Epidermis der Kontrollmodelle sowie der mit 0,6 mM und 0,06 mM GAP27 behandelten Modelle.

	Regenerierende	Regenerierende	Regenerierende
	Epidermis positiv	Epidermis zur Mitte	Epidermis negativ
		hin negativ	
Kontrolle	3/9	3/9	3/9
0,06 mM**	4/13	6/13	0/13
0,6 mM*	6/12	3/12	1/12

* Zwei Modelle zeigten sowohl eine negativ als auch eine positiv regenerierende Epidermis.

** Drei Modelle zeigten sowohl eine negativ als auch eine positiv regenerierende Epidermis. Die übrigen Modelle zeigten noch keine regenerierende Epidermis.

Es zeigte sich, dass alle Modelle mit einer durchweg Occludin positiv regenerierenden Epidermis (siehe Abbildung 17) deutlich weiter in der Wundheilung fortgeschritten waren als die Modelle, die Occludin negativ regenerierende Epidermen aufwiesen und Modelle, in denen die regenerierende Epidermis im Verlauf zur Wundmitte negativ wurde (siehe Abbildung 17). Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant, sowohl für die Wundmodelle, die Occludin positiv in der regenerierenden Epidermis waren im Vergleich zu denen, die Occludin negativ blieben (p= 0,04) als auch zu denen, die im Verlauf Richtung Wundmitte negativ wurde (p= 0,03).



Abbildung 17: Darstellung des Wundheilungsfortschrittes bei Occludin positiv gefärbter regenerierender Epidermis (blau) im Vergleich zu Occludin negativ gefärbter regenerierender Epidermis (rot) sowie zu Occludin positiv gefärbter regenerierender Epidermis in der Nähe des Wundrandes, welche in Richtung Wundmitte hin negativ wird (gelb) (Mittelwerte + SEM). *markiert statistisch signifikante Unterschiede.



Abbildung 18: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von einem anti-Occludin gefärbten Gewebeschnitt. Darstellung eines Occludin positiv gefärbten (rot) Wundrandes mit positiv gefärbter (rot) regenerierender Epidermis (A) bis hin zu den vordersten Zellen, in Überlagerung mit Phasenkontrast (A`). Längenmaßstab: 50µm.



Abbildung 19: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von einem anti-Occludin gefärbten Gewebeschnitt. Darstellung einer Occludin positiv gefärbten (rot) regenerierenden Epidermis (A), welche zum Wundrand im Verlauf Occludin negativ wird, in Überlagerung mit Phasenkontrast (A`). Längenmaßstab: 50µm.

5 Diskussion

Gap junctions sind Zell-Zell-Verbindungen, die für den Stoffaustausch und damit auch für die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen wichtig sind. Sie sind Prozesse wie in verschiedene zelluläre Proliferation. Migration und Differenzierung von Keratinozyten involviert (Risek et al, 1998; Lucke et al, 1999; Brandner et al, 2004). Gap junctions können aus unterschiedlichen Connexinen aufgebaut sein, die Connexin-Zusammensetzung bestimmt ihre Selektivität. Die Bedeutung der Gap junctions und ihrer Connexine, Verbindungen von Connexinen zu Bestandteilen anderer Zell-Zell-Verbindungen (Morita et al, 2004; Kojima et al, 2002; Giepmans et al, 2001) und Gen-Mutationen in unterschiedlichen Connexinen mit konsekutiven, zum Teil schwerwiegenden Erkrankungen, auch in der Epidermis, wurden in den letzten Jahren eingehend erforscht (Paznekas et al, 2003; Kelsell et al, 2001; Richard et al, 2005). Auch ihre Bedeutung für die Wundheilung wurde in den letzten Jahren hervorgehoben. Vor allem beobachtete man während der spontanen Wundheilung eine Herabregulation von Cx 43 an den Wundrändern (siehe Einleitung).

Um die Bedeutung von Cx 43 in der Wundheilung höherer Säugetiere besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit Cx 43 mimetische Peptide nach Verwundung appliziert. Da Cx 43 mimetische Peptide die Kommunikation über Gap junctions, die aus Cx 43 aufgebaut sind, stören (Evans et al, 2001), sollte dies die natürliche Cx 43 Herunterregulation nach Verwundung zusätzlich verstärken. Anschließend wurde der Einfluss auf den Wundheilungsfortschritt, die Proliferationsraten in verschiedenen Bereichen der Wunde und die Immunreaktivität verschiedener Gap junction- und Tight junction Proteine untersucht.

Anhand von HE Färbungen konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass es sowohl bei der Applikation von 0,6 mM GAP27 als auch bei Applikation von 0,06 mM GAP27 in die Wundmodelle zu einer- im Vergleich zu den Kontrollmodellen, bei denen PBS appliziert wurde- schnelleren Wundheilung kam. Eine statistische Signifikanz ergab sich allerdings nur für die mit 0,6 mM GAP27 behandelten Modelle. Unsere Ergebnisse gleichen denen von Qiu und Kollegen (2003) sowie

denen von Mori und Kollegen (2006). Diese behandelten zuvor verwundetes Gewebe von neonatalen und adulten Mäusen mit einem Cx 43 antisense (AS) Gel. Die Mäuse, die mit dem AS Gel behandelt wurden, zeigten eine beschleunigte Wundheilung im Vergleich zu der Kontrolle. Somit führt eine Herabregulation von Cx 43 auf mRNA Ebene (AS-Gel) genauso wie eine Hemmung der Gap junction Kommunikation über Kanäle, die aus Cx 43 aufgebaut sind, zu einer Beschleunigung der Wundheilung. Dies spricht für einen ursächlichen Einfluss von Cx 43 auf die Wundheilung. Diese Hypothese wird auch von der Tatsache unterstützt, dass chronische Wunden eine starke Expression von Cx 43 an den Wundrändern zeigen (Brandner et al, 2004) und somit die für die Inititation einer Wundheilung nötige Herabregulation von Cx 43 nicht vorliegt. Darüber hinaus zeigen auch Mäuse mit einer Defizienz für Cx 43 in der Epidermis eine beschleunigte Wundheilung (Kretz et al, 2003). Die Ähnlichkeit der Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass trotz der unterschiedlichen Verteilung der Connexine in der Epidermis zwischen Mensch und Maus (Brandner et al, 2004) und des unterschiedlichen Wundheilungsverlaufs zwischen diesen Spezies (bei Maus eine viel stärkere Betonung der Wundkontraktion), die Herabregulation von Cx 43 wichtig ist. Dies spricht für eine speziesübergreifende Rolle der Herabregulation von Cx 43 in der Wundheilung. Wang und Kollegen konnten zeigen, dass die Applikation von Cx 43 AS Gel bei diabetischen Mäusen zu einer beschleunigten Wundheilung führt (Wang et al, 2007).

Anhand immunhistochemischer Färbungen konnte ich zeigen, dass die Applikation von 0,6 mM GAP27 in das porcine ex-vivo Wundheilungmodell zu einer signifikanten Steigerung der proliferierenden Keratinocyten sowohl in der regenerierenden Epidermis als auch am Wundrand führte. Man kann vermuten, dass die erhöhte Proliferationsrate im Wundgebiet für den beschleunigten Wundheilungsprozess bzw. das beschleunigte Verschließen der Wunde zumindest zum Teil verantwortlich ist. Im Vergleich dazu konnte in der Epidermis in einiger Entfernung zur Wunde keine erhöhte Proliferation nachgewiesen werden, was zeigt, dass die erhöhte Proliferation nicht aufgrund der Kulturbedingungen beobachtet werden kann. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Applikation eines Cx 43 AS Gels in der verwundeten Epidermis von Mäusen ebenfalls zu einem Anstieg der Proliferation der Keratinocyten an den Wundrändern führte (Mori et al, 2006). In dieser Arbeit wurde auch eine erhöhte Proliferation und Migration von Fibroblasten sowie Veränderungen im Collagengehalt und in der Granulation beobachtet. Darüber hinaus zeigte sich ein vermindertes Rekrutieren von Neutrophilen und Makrophagen. Da es sich bei unserem Modell um ein ex-vivo Modell handelte, fehlte eine Versorgung mit Neutrophilen und Makrophagen, so dass der Einfluss von Cx 43 mimetischen Peptiden auf diese Zellen in diesem Modell nicht untersucht werden konnte. Unsere Ergebnisse zeigten aber, dass die verminderte Rekrutierung von Entzündungszellen nicht ursächlich für die Bedeutung der beschleunigten Wundheilung ist, da auch in unserem Modell eine beschleunigte Heilung deutlich nachgewiesen werden konnte. Der Einfluss von Cx 43 mimetischen Peptiden auf Fibroblasten und Granulation soll in einer Folgearbeit untersucht werden.

Interessanterweise konnten wir keinen Einfluss von GAP26 auf Cx 43 in der Wundheilung finden. Dieses könnte möglicherweise daran liegen, dass die Sequenz von GAP26 auf der ersten extrazellulären Schleife lokalisiert ist, GAP27 hingegen auf der zweiten extrazellulären Schleife von Cx 43. Eventuell ist erstere für die Kommunikation über Cx 43 Kanäle in der Haut nicht relevant. Des Weiteren können wir nicht ausschließen, dass die falsche Konzentration für GAP26 gewählt wurde. Allerdings benutzten wir für die Behandlung der Modelle mit beiden mimetischen Peptiden, GAP26 und GAP27, die gleichen Konzentrationen (Konzentrationen 0,6 mM und 0,06 mM) und es handelte sich dabei um Konzentrationen, die bereits in der Literatur beschrieben worden waren (Chaytor et al, 1999). Es sollten aber gegebenenfalls weitere Konzentrationen für GAP26 ausgetestet werden. Schließlich ist die Sequenz SRPTEK, welche GAP27 enthält auch in Cx 37 und Cx 40 vorhanden. Es konnte gezeigt werden, dass GAP27 sowohl Cx 43 als auch Cx 37 spezifisch aufgrund der Sequenzendung -TIFII hemmt, hingegen nicht Cx 40, welches die Sequenz SRPTEKNVFIV besitzt. Da auch Cx 37 in der Epidermis vorhanden ist, könnte auch diese zusätzliche Hemmung durch GAP27 eine Rolle für seine Wirksamkeit spielen.

Bei Applikation von GAP27 zeigten nach 48 Stunden Inkubationszeit mehr Modelle eine Re-Induktion von Cx 43 an den Wundrändern, als in den Kontrollmodellen. Vergleicht man Modelle mit Cx 43 Expression an den Wundrändern nach 48 Stunden mit solchen ohne Cx 43 Expression so zeigt sich, dass Modelle mit Cx 43 positiv gefärbten Wundrändern tendentiell eine fortgeschrittenere Wundheilung aufwiesen. Eine leichte Tendenz zu einer beschleunigteren Wundheilung wiesen ebenfalls die Modelle mit einer durchgehend positiv regenerierenden Epidermis und einer regenerierenden Epidermis auf, die positiv am Rand war und im Verlauf zur Wundmitte hin negativ wurde, im Vergleich zu den Modellen, mit einer Cx 43 negativ regenerierenden Epidermis.

Es kann aus unseren Ergebnissen nicht geschlossen werden, ob eine frühere Re-Induktion von Cx 43 zur beschleunigten Wundheilung beiträgt, oder obaufgrund der Herabregulation von Cx 43 zu Beginn der Wundheilung durch die Cx 43 mimetischen Peptide – die beschleunigte Wundheilung zu einer schnelleren Re-Induktion führt. Auch nach einer Beschleunigung der Wundheilung durch die Transplantation von kultivierten Kerationcyten konnte eine schnellere Re-Induktion von Cx 43 beobachtet werden (Brandner et al, 2004). Generell ist die Expression von Cx 43 in bestimmten Phasen der Wundheilung bedeutend für die Ausbildung einer korrekten Barriere, da sie ein wichtiger Teil der Wundheilung ist. Mäuse, mit einer Deletion des C-terminalen Bereichs von Cx 43 und damit einer unkorrekten Expression, zeigten massive Barriereschäden in der Haut (Maass et al, 2004).

Kandyba und Kollegen (2007) konnten in einem dreidimensionalen Mäuseäquivalent-Model zeigen, dass die Funktion von GAP27 vermutlich auf einer Inhibierung der Gap junctions in den Keratinocyten und nicht auf einer Veränderung der Expressionsrate beruht. Dies würde dafür sprechen, dass die Gabe von GAP27 in unserem Modell wenig Einfluss auf die Expression von Cx 43 hat und damit die beobachtete erhöhte Re-Induktion durch die beschleunigte Wundheilung hervorgerufen worden ist.

Die verstärkte Herunterregulierung von Cx 43 durch GAP27 führte zu keiner deutlichen Beeinflussung der Expression und Lokalisation von Cx 26. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass tendentiell die Modelle mit einer durchgehend Cx 26 positiv gefärbten regenerierenen Epidermis, als auch Modelle mit einer Cx 26 positiv gefärbten regenerierenden Epidermis am Wundrand, welche im Verlauf Richtung Wundmitte negativ wurde, einen größeren Wundheilungsfortschritt zeigten, als Modelle mit Cx 26 negativ regenerierender Epidermis.

Wie bei Lucke et al bereits 1999 beschrieben, ist Cx 26 in menschlicher, normaler, nicht verwundeter Haut nicht auffindbar. Cx 26 ist limitiert auf die palmoplantare Epidermis. Dieses deckt sich mit unseren Ergebnissen, in denen ebenfalls in der gesunden Peripherie in allen unserer Modelle kein Cx 26 auffindbar war. In normaler verwundeter Haut wird Cx 26 in dem verwundeten Gebiet nach ca. 18 Stunden hochreguliert, die Peripherie dagegen bleibt Cx 26 negativ (Brandner et al, 2004). Man kann vermuten, dass die Zellen im Wundgebiet durch ihre aus Cx 26 aufgebauten Gap junctions Signalmoleküle und andere Botenstoffe, wie Wachstumsfaktoren, austauschen und miteinander kommunizieren. Dieses scheint für den Wundheilungsprozess eine entscheidende Bedeutung zu haben. Ist die Reepithelialisierung abgeschlossen, wird Cx 26 wieder herunterreguliert wie in normaler Haut. In hyperproliferativen Hauterkrankungen, wie z.B. Psoriasis, ist Cx 26 eines der am stärksten hochregulierten Gene. Es konnte gezeigt werden, dass Сх die 26 Herunterregulierung im späteren Verlauf der Wundheilung Voraussetzung für eine epidermale Barrierebildung ist. Ein Fehlen dieser Herunterregulation führt zu einer Verzögerung der Wundheilung (Djalilian et al., 2006). Die positive Korrelation von Cx 26 Expression in der regenerierenden Epidermis mit einer weiter fortgeschrittenen Wundheilung legt nahe, dass wir uns noch in einer Phase befinden, in der die Hyperproliferation von Keratinocyten, für die die Cx 26 Expression ein Zeichen ist, zur Wundheilungsbeschleunigung beiträgt.

Es ist bekannt, dass das zytoplasmatische Tight junction Plaque Protein ZO-1 Assoziationen mit Cx 43 eingehen kann. In unseren Experimenten zeigte die verstärkte Herunterregulation von Cx 43 durch GAP27 aber keinen Einfluss auf die Expression und Lokalisation des Proteins ZO-1. ZO-1 zeigte sich in den Kontroll- und in den mit GAP27 behandelten Modellen im Stratum granulosum und im oberen Stratum spinosum in der Epidermis. ZO-1 war in unseren Modellen in einiger Entfernung zur Wunde, in den Wundrändern und der regenerierenden Epidermis auffindbar. Die vordersten Zellen der ZO-1 positiv angefärbten regenerierenden Epidermis waren ebenfalls in allen Modellen ZO-1 positiv.

In Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von ZO-1 mit einer verstärkten Migration der Zellen einhergeht, die durch das Ausschalten dieses Moleküls vermindert werden (Smalley et al, 2005). Auch in der regenerierenden Epidermis könnte somit die Expression von ZO-1 auch in den vordersten Zellen ein wichtiger Faktor für die Migration der Zellen sein.

Wir konnten ebenfalls keinen deutlichen Unterschied zwischen den Kontroll- und den mit GAP27 behandelten Modellen in Bezug auf die Lokalisation und Immunreaktivität von dem Tight junction Transmembranprotein Occludin finden. So war in allen Gruppen in der umgebenden gesunden Haut Occludin in allen Modellen im Stratum granulosum auffindbar. Die Wundränder waren ebenfalls in allen Modellen im Stratum granulosum Occludin positiv. Häufig war die regenerierende Epidermis durchgehend Occludin positiv bis hin zu den vordersten Zellen oder sie war am Rand stark Occludin positiv und wurde im weiteren Verlauf negativ. Dies bestätigt Ergebnisse, die auch im humanen Wundheilungsmodell gefunden wurden (Brandner et al. 2002). Interessanterweise konnten wir beobachten, dass alle Modelle mit einer durchweg positiv regenerierenden Epidermis deutlich weiter in der Wundheilung fortgeschritten waren als die Modelle, die eine Occludin negativ regenerierende Epidermis aufwiesen sowie Modelle, in denen die regenerierende Epidermis im Verlauf zur Wundmitte hin negativ wurde. Es gibt bisher keine Berichte, dass Occludin an einer Steigerung der Proliferation oder Migration von Zellen beteiligt und somit ursächlich für die beschleunigte Wundheilung verantwortlich sein könnte. Somit liegt auch hier die Vermutung nahe, dass der weitergehende Wundheilungsfortschritt die verstärkte Expression von Occludin bedingt. Eine wichtige Funktion der Wundheilung ist, wie bereits oben erwähnt, die Wiederherstellung der Barrierefunktion der Haut und eine verstärkte Expression von Occludin könnte dies widerspiegeln. Man findet eine verstärkte Expression von Occludin generell immer in Hautzuständen, bei denen das Stratum corneum gestört und deshalb ggf. ein erhöhter Bedarf an Barrierefunktion durch Tight junctions vorhanden ist. Dies zeigt sich zum Beispiel bei Psoriasis (Yoshida et al,

2001; Pummi et al, 2001; Brandner et al, 2006) und bei bakterieller Besiedelung der Haut (Ohnemus et al, 2007).

Es stellt sich die Frage, ob durch die initiale Herunterregulation der Connexine lädiertes Gewebe abgegrenzt wird, um z. B. Apoptosesignale nicht in die gesunde Peripherie wandern zu lassen oder ob stattdessen die wichtigen Stoffe für den Stoffwechsel der Zelle und Aufrechterhaltung der Homöostase in der gesunden Peripherie bleiben sollen. Für die Zukunft ist es sicherlich interessant, chronische Wunden mit Connexin mimetischen Peptiden oder AS Gel zu behandeln. Weiterhin wäre es auch interessant, die Cx 26 Hochregulation nach 18 Stunden zu verstärken- dann aber wieder herabzuregulieren-, um zu sehen, ob man auch damit einen Wundheilungsfortschritt erzielt.

6 Zusammenfassung

Gap junctions sind kommunizierende Zell-Zell-Verbindungen, die eine wichtige Rolle in der Proliferation, Differenzierung und Migration von Keratinocyten spielen. Sie werden von Connexinen (Cx) aufgebaut. Das vorherrschende Connexin der Haut ist Cx 43. Während der spontanen Wundheilung kann man eine Herunterregulation von Cx 43 an den Wundrändern beobachten. In chronischen Wunden kann Cx 43 an den Wundrändern nachgewiesen werden. Cx 43 mimetische Peptide (GAP26, GAP27) verhindern die reguläre Funktion von Gap junctions, die aus Cx 43 aufgebaut sind. Durch die Applikation des Cx 43 mimetischen Peptids GAP27 auf porcine ex-vivo Wundmodelle konnte in dieser Arbeit eine konzentrationsabhängige statistisch signifikante Beschleunigung der Wundheilung beobachtet werden. GAP26 hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Wundheilung. Die beschleunigte Wundheilung beruht, zumindest zum Teil, auf einer Erhöhung der Anzahl proliferativer Zellen im Wundrand und in der regenerierenden Epidermis in Modellen. Auch dieses Ergebnis war konzentrationsabhängig.

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Behandlung von Wundmodellen mit GAP27 in einer erhöhten Zahl von Modellen mit einer erhöhten Expression von Cx 43 an den Wundrändern und der regenerierenden Epidermis einherging. Diese Modelle wiesen meist einen verstärkten Wundheilungsfortschritt auf, was für eine frühere Reinduktion von Cx 43 sprechen könnte. Oft geht die beschleunigte Wundheilung mit einer verstärkten Expression des Gap junction Proteins Cx 26 und des Tight junction-Proteins Occludin in der regenerierenden Epidermis einher.

Dahingegen konnte keine Veränderung in der Lokalisation und in der Färbeintensität des Tight junction Proteins ZO-1 beobachtet werden.

Zukünftige Einsatzmöglichkeiten von GAP27 könnten in Form der topischen Applikation bei chronischen Wunden, wie z.B. Ulcus cruris, liegen, da in diesen keine Connexin 43 Regulation erkennbar ist.

7 Literaturverzeichnis

Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, and Tsukita S (1996) Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol* **133**: 43–47.

Angst BD, Marcozzi C, and Magee AI (2001) The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* **114**: 629-641.

Benedetti EL, Dunia I, Recouvreur M, Nicolas P, Kumar NM, Bloemendal H (2000) Structural organization of gap junctions as revealed by freeze-fracture and SDS fracture-labeling. *Eur J cell Biol* **79(8)**: 575-82.

Boitano S, Evans WH (2000) Connexin mimetic peptides reversibly inhibit Ca²⁺ signaling through gap junctions in airway cells. *Am J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol.* **279**: L623-L630.

Brandner JM, Kief S, Grund C, Rendl M, Houdek P, Kuhn C, Tschachler E, Franke WW, Moll I. (2002) Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol* **81(5**): 253-263.

Brandner JM, Houdek P, Hüsing B, Kaiser C, Moll I (2004) Connexins 26, 30 and 43: Differences Among Spontaneous, Chronic and Accelerated Human wound Healing. *J Invest Dermatol* **122**:1310-1320.

Brandner JM, Kief S, Wladykowski E, Houdek P, Moll I (2006); Tight junction proteins in the skin. Skin Pharmacol Physiol.**19(2)**: 71-7.

Cereijido M, Shoshani L, and Contreras RG (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G477-G482.

Chaytor AT, Martin PM, Randall TM, Evans WH, Griffith TM (1999) The endothelial component of cannabinoid-induced relaxation in rabbit mesenteric artery depends on gap junctional communication. *J. Physiol.(London)* **520**: 539-550.

Coutinho P, Qiu C, Frank S,Tamber K and Becker D (2003) Dynamic changes in connexin expression correlate with key events in the wound healing process. *Cell Biol Int* **27**: 525-541.

Di WL, Rugg EL, Leigh IM, Kelsell DP (2001) Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. *J. Invest. Dermatol.* **117**: 958-64

Djalilian AR, McGaughey D, Patel S, Seo EY, Yang C, Cheng J, Tomic M, Sinha S, Ishida- Yamamoto A, Segre JA (2006) Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and prompotes psoriasiform response *J.Clin. Invest.* **116**: 1243-1253

Dora KA, Martin PM, Chaytor AT, Evans WH, Garland CJ, Griffith TM (1999) Role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: inhibition by a connexin-mimetic peptide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **254**: 27-31.

Evans WH, Boitano S (2001) Connexin mimetic peptides :specific inhibitors of gap junctional intercellular comunication. *Biochem.Soc.Trans.* **29**: 606-612.

Evans WH, Martin PE (2002) Gap juntions: structure and function. *Mol.Membr.Biol.* **19**: 121-136.

Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, and Anderson JM (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **273**: 29745-29753.

Fanning AS, Ma TY and Anderson JM (2002) Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J.* **16**: 1835-1837.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, and Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**: 1777-1788.

Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, and Tsukita S (1994) Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* **127**: 1617-1626.

Giepmans BN, Verlaan I, Moolenaar WH (2001), Connexin -43 interactions with ZO-1 and alpha- and beta-tubulin. *Cell Common Adhes* **8(4-6)**: 219-23.

Goliger JA, Paul DL (1994) Expression of gap junction proteins Cx 26, Cx 31.1, Cx 37, and Cx 43 in developing and mature rat epidermis. *Dev. Dyn.* **200**: 1-13.

Goliger JA, Paul DL (1995) Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol. Biol. Cell* **6**:1491-1501.

Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, and Avila-Flores A (2000) MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**:315-324.

Hodgins MB (2004) Connecting Wounds with Connexins. *J Invest Dermatol* **122**: 1-2.

Hofmann I, Schnölzer M, Kaufmann I, and Franke WW (2002) Symplekin, a Constitutive Protein of Karyo- and Cytoplasmic Particles Involved in mRNA Biogenesis in *Xenopus laevis* Oocytes. *Molecular biology of the cell* **13(5)**: 1665-1676.

Hutcheson IR, Andrew T, Chaytor W, Evans H, Griffith TM (1999) Nitric Oxide– Independent Relaxations to Acetylcholine and A23187 Involve Different Routes of Heterocellular Communication Role of Gap Junctions and Phospholipase A₂. *Circulation Research*. **84**: 53-63.

Isakson BE, Evans WH, Boitano S (2001) Intercellular Ca2+ signaling in alveolar epithelial cells through gap junctions and by extracellular ATP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280 (2)**: L221-L228.

Itoh M, Morita K, and Tsukita S (1999) Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem* **274**: 5981-5986.

Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, andTsukita S (1999b) Direct Binding of Three Tight Junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH Termini of Claudins. *The Journal of Cell Biology* **147(6)**: 1351-1363.

Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, and Tsukita S (1997) Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* **138**: 181-192.

Kandyba EE, Hodgins MB, Martin PE (2007) A Murine Living Skin Equivalent Amenable to Live-Cell Imaging: Analysis of the Roles of Connexins in the Epidermis. J Invest Dermatol.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed&uid=17960178&c md=showdetailview&indexed=google

Kelsell DP, Di WL, and Houseman MJ (2001) Connexin Mutations in Skin Disease and Hearing Loss. *Am J Hum Genet.* **68(3)**: 559–568.

59

Ko KS, Arora PD, and McCulloch CAG (2001) Cadherins Mediate Intercellular Mechanical Signaling in Fibroblasts by Activation of Stretch-sensitive Calciumpermeable Channels⁻ *J. Biol. Chem* 276 **(38)**: 35967-35977.

Kojima T, Spray DC, Kokai Y, Chiba H, Mochizuki Y, Sawada N (2002) Cx 32 Formation and/or Cx 32 Intercellular Communication Induces Expression and Function of Tight Junctions in Hepatocytic Cell Line. *Experimental Cell Research* **276(1)**: 40-51

Kretz M, Euwens C, Hombach S, Eckardt D, Teubner B, Traub O, Willecke K, Ott T (2003) Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J Cell Sci* **116**: 3443-3452.

Kumar NM, Gilula NB (1996) The Gap Junction Communication Channel. *Cell* **84**: 381-388.

Kwak BR, Jongsma HJ (1999) Selective inhibition of gap junction channel activity by synthetic peptides. *J. Physiol (London)* **516**: 679-685.

Labarthe MP, Bosco D, Saurat JH, Meda P, and Salomon D (1998) Upregulation of connexin 26 between keratinocyts of psoriatic lesions. *J. Invest. Dermatol.* **111**: 72-76.

Lucke T, Choudhry R, Thom R, Selmer IS, Burden AD, Hodgins MB (1999) Upregulation of connexin 26 is a feature of keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis, vaginal epithelium, and buccal epithelium. *J Invest Dermatol.* **112(3)**: 354-61.

Maass K, Ghanem A, Kim JS, Saathoff M, Urschel S, Kirfel G, Grümmer R, Kretz M, Lewalter T, Tiemann K, Winterhager E, Herzog V, Willecke K (2004) Defective epidermal barrier in neonatal mice lacking the C-terminal region of connexin43. *Mol Biol Cell* **15**: 4597-608.

Madara JL (1998) Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol* **60**: 143-159.

Martin PEM, Wall C, GriffithTM (2005), Effects of connexin-mimetic peptides on gap junction functionality and connexin expression in cultured vascular cells. *British Journal of Pharmacology* **144**: 617-627.

Matic M, Petrov IN, Rosenfeld T, Wolosin JM (1997) Alterations in connexin expression and cell communication in healing corneal epithelium. *Invest.Ophtalmol.Vis.Sci.* **38**: 600-609.

Mattagajasingh SN, Huang SC, Hartenstein JS, and Benz EJ Jr (2000) Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **275**: 30573-30585.

Mitic LL, Anderson JM (1998) Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol.* **60**:121–142.

Mitic LL, Van Itallie CM, and Anderson JM (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G250 -G254.

Mitzscherling K, Bode C, Parlesak A (2006), Regulation der Tight Junction Proteine im Verlaufe der Differenzierung von Enterozyten. *Akt Ernähr Med* **31**

Mori R, Power KT, Wang CM, Martin P, Becker DL (2006) Acute downregulation of connexin43 at wound sites leads to a reduced inflammatory response, enhanced keratinocyte proliferation and wound fibroblast migration. *Journal of Cell Science* **119**: 5193-5201.

Morita H, Katsuno T, Hoshimoto A, Hirano N, Saito Y, Suzuki Y (2004), Connexin 26-mediated gap junctional intercellular communication suppresses paracellular

permeability of human intestinal epithelial cell monolayers. *Experimental Cell Research* **298**:1-8.

Moyer KE (2002) Wound healing: the role of gap junctional communication in rat granulation tissue maturation. *Exp.Mol. Pathol.* **72**: 10-16

Musil LS, Goodenough DA (1991) Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J.Cell. Biol.* **115 (5)**: 1357-1374.

Nusrat A, Turner JR, and Madara JL (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G851-G857.

Ohnemus U, Kohrmeyer K, Houdek P, Rohde H, Wladykowski E, Vidal S, Horstkotte M, Aepfelbacher M, Kirschner N, Behne MJ, Moll I and Brandner JM (2007) Regulation of Epidermal Tight-Junctions (TJ) during Infection with Exfoliative Toxin-Negative Staphylococcus Strains. *Journal of Investigative Dermatology* advance online publication 4 October 2007; doi: 10.1038/sj.jid.5701070

http://www.nature.com/jid/journal/vaop/ncurrent/abs/5701070a.html

Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC, Jabs EW (2003) Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet.* **72(2)**:408-18.

Pepper MS, Montesano R, El Aoumari A, Gros D, Orci L, Meda P(1992) Coupling and connexin 43 expression in microvascular and large vessel endothelial cells. *Am.J.Physiol.* **262**: C1246-C 1257.
Pepper MS, Meda P (1992) Basic fibroblast growth factor increases junctional communication and connexin 43 expression in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **153(1):** 196-205.

Polacek D, Bech F., Mckinsey JF, Davies PF(1997) Connexin 43 gene expression in the rabbit arterial wall:effects of hypercholesterolemia, balloon injury and their combination. *J.Vasc. Res.* **34**: 19-30.

Pummi K, Malminen M, Aho H, Karvonen SL, Peltonen J and Peltonen S (2001) Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol*.**117(5)**: 1050-8.

Qiu C,Coutinho P, Frank S, Franke S, Law L,Martin P, Green C,Becker D (2003) Targeting Connexin 43 Expression Accelerates the Rate of Wound Repair. *Curr. Biol.* **13**:1697-1703.

Rajasekaran AK, Hojo M, Huima T, and Rodriguez-Boulan E (1996) Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol* **132**: 451-463.

Rajasekaran AK, Rajasekaran SA (2003) Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight junctions. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**: F388-F396.

Richard G (2000) Connexins: a connection with the skin. Exp. Dermatol. 9:77-96.

Richard G, Brown N, Rouan F, Van der Schroeff JG, Bijlsma E, Eichenfield LF, Sybert VP, greer KE, Hogan P, Campanelli C, Compton JG, Bale SJ, DiGiovanna JJ, Uitto J (2003) Genetic heterogeneity in erythrokeratodermia variabilis: novel mutations in the connexin gene GJB4 (Cx 30.3) and genotype-phenotype correlations. *J Invest Dermatol* **120(4)**: 601-9.

Richard G (2005) Connexin disorders of the skin. Clin Dermatol. 23(1): 23-32.

Risek B, Klir FG, Gilula NB (1992) Multiple gap junction genes are utilized during rat skin and hair development. *Development* **116**: 639-651.

Risek B, Pozzi A, Gilula NB (1998) Modulation of gap junction expression during transient hyperplasia of rat epidermis. *J Cell Sci.* **111(Pt 10)**:1395-404.

Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol.Rev.* **83**: 1359-1400.

Saitoh M, Oyamada M, Oyamada Y, Kaku T, Mori M (1997) Changes in the expression of gap junction proteins (connexins) in hamster tongue epithelium during wound healing and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **18**:1319-1328.

Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, and Tsukita S (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* **141**: 397-408.

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, and Tsukita S (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* **11**: 4131–4142.

Schneeberger EE and Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**: C1213-C1228.

Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (1999) Anatomie. Springer 8. Auflage, Seite 37

Smalley KS, Brafford P, Haass NK, Brandner JM, Brown E, Herlyn M. (2005) Upregulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol.***166(5)**:1541-54.

Spray DC (1994) Physiological and pharmacological regulation of gap junction channels. In: Molecular Mechanisms of Epithelial Cell Junctions: From

Development to Disease, S. Citi, ed. (Austin, Texas: R.G. Landes Company), pp. 195–215.

Tsukita S, Furuse M, and Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol **2**: 285-293.

Turner JR (2000) "Putting the squeeze" on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin Cell Dev Biol* **11**: 301-308.

Wang CM, Lincoln J, Cook JE, Becker DL (2007) Abnormal connexin expression underlies delayed wound healing in diabetic skin. *Diabetes* **56(11)**: 2809-17.

Willecke K, Eilerger J, Degen J, Eckhardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem* **383**: 725-737.

Yoshida Y, Morita K, Mizoguchi A, Ide C, Miyachi Y (2001) Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* **293(5)**: 239-44.

Zahraoui, A, Louvard, D, and Galli, T (2000). Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. *J. Cell Biol.* **151**: F31-36.

8 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....

Ann-Catherine Pfeiffer

9 Veröffentlichungen

Paper (251) : Cx 43 plays a central role during early wound healing (J.M. Brandner, A. Pfeiffer, P. Houdek, I.Moll), 2007

Vortrag: vor Dermatologen und Ärzten aller Fachrichtungen: Bedeutung von Connexinen für die Wundheilung, Hamburg 02/2006