

Aus der Klinik für
Dermatologie und Venerologie
des Kopf- und Hautzentrums
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktorin: Frau Prof. Dr. med. I. Moll

**Expression und Lokalisation
von Tight Junction-assoziierten Proteinen
in menschlichen Haarfollikeln**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg

von

Mareike S. McIntyre
aus Hamburg

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am:

7. September 2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende:

Prof. Dr. I. Moll

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in

Prof. Dr. O. Strauß

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in

Prof. Dr. U. Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Tight Junctions	1
1.1.1	Transmembranproteine	1
1.1.1.1	Occludin	1
1.1.1.2	Claudine	2
1.1.1.3	Junctional adhesion molecule (JAM)	3
1.1.2	Plaueproteine	4
1.1.3	Funktionen von Tight Junctions	5
1.1.4	Tight Junctions in der Haut	7
1.2	Der Aufbau des anagenen Haarfollikels	8
1.3	Fragestellung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Antikörper	13
2.1.2	Chemikalien	14
2.1.3	Puffer und Lösungen	15
2.1.4	Enzym	16
2.1.5	Kits	16
2.1.6	Oligonucleotide	16
2.1.7	Gewebe	17
2.1.8	Geräte	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Molekularbiologie	18
2.2.1.1	RNA-Extraktion aus Barthaaren	18
2.2.1.2	RNA-Messung	18
2.2.1.3	cDNA Synthese – Reverse Transkription	18
2.2.1.4	cDNA-Messung	20
2.2.1.5	PCR	20
2.2.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.2	Immunfluoreszenzmikroskopie	22
2.2.2.1	Gefrierschnitte	22
2.2.2.2	Paraffinschnitte	22
2.2.2.3	Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Identifizierung der mRNAs von verschiedenen Tight Junction Molekülen in epilierten Haaren	24
3.2	Immunlokalisation von Tight Junction-assoziierten Proteinen in menschlichen Anagen-Haarfollikeln	25
3.2.1	Protein ZO-1	25
3.2.2	Occludin	26
3.2.3	Claudine	27
3.2.3.1	Claudin 1	27
3.2.3.2	Claudin 4	30

3.2.3.3	Claudin 12	30
3.2.3.4	Claudin 17	31
3.2.3.5	Claudine 2, 3 und 5.....	31
3.2.3.6	Kolokalisation der Tight Junction-assozierten Proteine.....	31
3.3	Lokalisation von Tight Junction-assozierten Proteinen im Vergleich zu Markerproteinen für andere Zell-Zell-Verbindungen.....	34
3.3.1	Desmosomen	34
3.3.2	Adhärenzverbindungen.....	37
4	Diskussion.....	42
4.1	Tight Junctions an den Grenzflächen zur Außenwelt.....	43
4.2	Tight Junctions an der Grenze zwischen äußerer und innerer Wurzelscheide.....	47
4.3	Räumliche Beziehung der Tight Junctions zu anderen Zell-Zell-Verbindungen im Haarfollikel.....	48
5	Zusammenfassung	51
6	Literaturverzeichnis	53
7	Abbildungsverzeichnis	69
8	Abkürzungen.....	71
9	Danksagung.....	72
10	Lebenslauf	73
11	Veröffentlichungen	74
12	Erklärung	75

1 Einleitung

1.1 Tight Junctions

Tight Junctions sind abschließende Zell-Zell-Verbindungen, deren Struktur und Funktion in einschichtigen Epithelien und Endothelien intensiv untersucht worden sind (Farquhar und Palade, 1963; Übersichtsartikel: Staehelin, 1974; Stevenson and Keon, 1998; Mitic et al., 2000; Tsukita et al., 2001). Ultrastrukturell stellen sich Tight Junctions in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen als kleine, spezielle, subapikale Regionen dar, wo die Plasmamembranen der beiden Nachbarzellen einander berühren. An diesen Berührungsstellen ist weder intermembranöses Material noch eine extrazelluläre Lücke zu sehen. Tight Junctions werden deshalb auch als „sites of fusion“ oder „kissing points“ bezeichnet. Bei Verwendung der Gefrierbruchmethode stellen sich Tight Junctions als ein ununterbrochenes, stark verzweigtes Netzwerk von linearen Polymeren dar, die den interzellulären Kontakt bilden.

Die molekulare Zusammensetzung von Tight Junctions ist äußerst komplex (z.B. Furuse et al., 1993, 1998a, b; Itoh et al., 1999, 2001; Übersichtsartikel: Morita et al., 1999; Mitic et al., 2000; Tsukita and Furuse, 1999; Tsukita et al., 2001). Sie bestehen aus verschiedensten Transmembran- und Plaque- Proteinen. Letztere sind mit dem Actin-Zytoskelett verbunden.

1.1.1 Transmembranproteine

Zu den Transmembranproteinen gehören Occludin, sowie die Mitglieder der Claudin- und der JAM- (Junctional adhesion molecule) Familie (Furuse et al., 1998a, b; Tsukita und Furuse, 1999; Saitou et al., 2000; Tsukita et al., 2001).

1.1.1.1 Occludin

Occludin (ca. 65 kDa) wurde als erstes Tight Junction Transmembranprotein entdeckt (Furuse et al., 1993; Ando-Akatsuka et al., 1996). Es handelt sich dabei um ein phosphoryliertes Protein, welches vier Transmembrandomänen besitzt und dessen N- und C-Termini im Zytoplasma liegen. In den beiden extrazellulären Schleifen sind wenig geladene Aminosäuren vorhanden. Die erste extrazelluläre Schleife enthält einen bemerkenswert großen Anteil (61%) der Aminosäuren Tyrosin und Glyzin. Dieser Aminosäuregehalt spielt möglicherweise in der Zell-Zell-Kopplung eine Rolle. Ando-Akatsuka und Mitarbeiter (1996) stellten die Überlegung an, ob der hohe Anteil an

Glyzin eine flexible Struktur bildet, während der hohe Anteil an Tyrosinseitenketten zum Verknüpfen von sich gegenüberliegenden Schleifen führt. Diese beiden Charakteristika könnten dazu führen, dass die Schleifen von aneinander liegenden Zellen sich reißverschlussähnlich zusammenfügen (Mitic et al., 1998). Die C-terminalen 255 Aminosäuren stehen direkt mit Protein ZO-1 (Furuse et al., 1994) und mit Protein ZO-3 (Haskins et al., 1998) in Verbindung. Alternativ existiert eine Isoform von Occludin (Occludin 1B), deren Verteilung im Gewebe der von Occludin gleicht (Muresan et al., 2000).

Verschiedene Experimente machen deutlich, dass Occludin allein jedoch nicht ausreichend ist für die Bildung von Tight Junction Strukturen. Bei Fibroblasten, die ursprünglich keine Tight Junctions bilden, finden sich diese auch nach der Transfektion mit cDNA für Occludin nicht. Auch kann bei embryonalen Stammzellen gezeigt werden, dass ein Verlust von Occludin weder zum Verlust von Tight Junction Strängen noch zu einer Veränderung ihrer Morphologie führt (Saitou et al., 1998). Occludin Knock-out Mäuse weisen keine erkennbare Veränderung in der Barrierefunktion auf (Saitou et al., 2000). Sie zeigen allerdings eine Wachstumsretardierung und eine chronische Gastritis. Ein reduzierter aktiver Transport wird im Dünndarm und bei der Magensäuresekretion beobachtet. Gleichzeitig kommt es zu einer Störung der Parietalzell-Differenzierung. Der frühe Verlust von spezifischen Zellen deutet auf einen Defekt bei der Differenzierung als primärem Defekt hin. Occludin scheint eine Rolle bei der Signaltransduktion im epithelialen Transport und/oder Gewebewachstum und bei der Differenzierung zu spielen (Schulzke et al., 2005). Eine essentielle Rolle bei der Beteiligung der Barrierebildung wird ausgeschlossen.

1.1.1.2 Claudine

Bei den Claudinen handelt es sich ebenfalls um Proteine mit 4-Transmembran-Domänen. Sie haben eine ähnliche Membrantopologie wie Occludin, d.h., das N- und das C-terminale Ende befinden sich im Zytoplasma. Es besteht jedoch keine Sequenzähnlichkeit mit Occludin. Die Claudine sind deutlich kleiner als Occludin; ihr Molekulargewicht beträgt ca. 22-27 kDa. Intrazellulär besitzen diese Proteine mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen und eine PDZ-bindende Sequenz.

Claudin 1 ist 1998 zusammen mit Claudin 2 beschrieben worden (Furuse et al., 1998a). Bis heute konnten insgesamt 24 Mitglieder der Claudin Familie identifiziert werden

(Morita et al., 1999; Simon et al., 1999; Tsukita und Furuse, 1999; Übersichtsartikel: Turksen et al., 2004).

Claudin 1 findet man in Epithelien mit undurchlässigen Tight Junctions (dichte Epithelien) wie Dickdarm, distaler Nierentubulus und Epidermis. Es scheint eine abdichtende Funktion zu haben. Claudin 2 kommt im Gegensatz dazu eher in durchlässigen Tight Junctions, wie im Dünndarm und proximalen Nierentubulus, vor. Es konnte gezeigt werden, dass Claudin 2 einen extrazellulär verlaufenden Kanal für kleine Kationen bildet (Amasheh et al., 2002). Claudin 2 wird nicht in der Epidermis gefunden (Brandner et al., 2002). Claudin 3 und 4 finden sich eher in dichten Epithelien.

Alle Claudine weisen verschiedene Eigenschaften auf und sind unterschiedlich in den diversen Geweben verteilt. Die Claudin-Kombinationen und deren „Mischungsverhältnis“ beeinflusst die Selektivität und Festigkeit der Tight Junctions. Während in den Oligodendrozyten und Sertolizellen Tight Junctions vorkommen, in denen nur Claudin 11 (sog. „pure“ Tight Junctions) exprimiert wird (Gow et al., 1999), finden sich z.B. im Stratum granulosum der Epidermis Claudin 1, 4 und 7 (Brandner et al., 2002; Furuse et al., 2002).

1.1.1.3 Junctional adhesion molecule (JAM)

Die JAM Proteine (Junctional adhesion molecule) sind Mitglied einer Familie von integralen Membranproteinen mit nur einer Transmembrandomäne. Bis jetzt wurden JAM-A (= JAM-1; Martin-Padura et al., 1998), JAM-B (= JAM-2 = VE-JAM; Aurand-Lions et al., 2000) JAM-C (= JAM-3; Palmeri et al., 2000), JAM-D (=JAM-4; Hirabayashi et al., 2003) und die JAM-ähnlichen Proteine CAR (Cohen et al., 2001) und ESAM (Nasdala et al., 2002) identifiziert. Die JAM-Familie gehört zur IgG-Superfamilie und weist zwei extrazelluläre Ig-Domänen auf. JAMs werden im Endothel und Epithel in Tight Junctions exprimiert mit Ausnahme von JAM-C, bei dem es sich um ein desmosomales Protein handelt (Zen et al., 2004). Durch PDZ-Domänen können die JAM-Proteine andere Tight Junction-assoziierte Proteine, wie ZO-1, PAR-3 und MUPP1 binden (Itoh et al., 2001). Die JAMs besitzen vor allem zwei wichtige Funktionen: Sie regulieren die Zellpolarität und sie wirken als Mediatoren für Interaktionen von Leukozyten und Endothelzellen.

1.1.2 Plaqueproteine

Tight Junction Plaqueproteine sind verantwortlich für den Zusammenhalt der Tight Junctions („Gerüstproteine“), sie sind beteiligt an ihrem Aufbau und ihrer Aufrechterhaltung, sind Bestandteile von intrazellulären Signalkaskaden, sind in den Vesikeltransport involviert und verbinden die Tight Junctions mit dem Zytoskelett. Die Liste der Tight Junction Plaqueproteine wächst täglich, hier sollen nur die wichtigsten aufgeführt werden

Das Zonula Occludens-1 Protein (Protein ZO-1) ist ein intrazelluläres, membranständiges phosphoryliertes Protein. Es ist das erste Protein, das in Tight Junctions lokalisiert werden konnte (Stevenson et al., 1986). Seine relative Masse beträgt 210 – 225 kDa. ZO-1 gehört zur MAGUK-Familie (MAGUK; Membran assoziierte Guanylatkinase) und könnte eine Rolle bei der Tumorentwicklung spielen (Itoh et al., 1993; Willott et al., 1993; Smalley et al., 2005). Zur MAGUK-Familie gehören auch die Tight Junction-assoziierten Proteine ZO-2 (Jesaitis und Goodenough, 1994) und ZO-3 (Haskins et al., 1998). Die MAGUK Proteine haben eine PDZ-Domäne und eine Guanylatkinasedomäne gemeinsam. Die ZO-Proteine besitzen jeweils drei PDZ-Domänen (PDZ = PSD-95/SAP90, discs-large ZO-1). Ein Charakteristikum der PDZ-Domänen ist, dass sie mit anderen PDZ-Domänen dimerisieren können (Brenman et al., 1996). Eine weitere Eigenschaft ist, dass sie spezifische Aminosäuresequenzen am C-terminalen Ende von integralen Membranproteinen erkennen (Marfatia et al., 1994; Grootjans et al., 1997; Kim et al., 1995, 1998). Man geht somit davon aus, dass es sich bei den ZO-Proteinen unter anderem um Gerüstproteine handelt. ZO-1, wie auch ZO-3 interagieren mit dem C-terminalen Bereich von Occludin (Furuse et al., 1994), Protein ZO-1, ZO-2 und ZO-3 binden in Zellkulturexperimenten an Claudin 1-8 (Itoh et al., 1999). ZO-1 konnte auch in Zellen, die keine Tight Junction bilden, nachgewiesen werden. Dort ist es mit Cadherinen kolokalisiert (Itoh et al., 1991, 1993; Howarth et al., 1992; Tsukita et al., 1992; Smalley et al., 2005). Experimente deuten darauf hin, dass bei der Entstehung von Tight Junctions das Protein ZO-1 zunächst mit Komponenten von Adhärenzverbindungen assoziiert ist, bevor es seine endgültige Position in den Tight Junctions einnimmt (Rajasekaran et al., 1996). ZO-1, ZO-2 und Symplekin, ein weiteres Tight Junction Plaque-Protein, sind sowohl in den Tight Junctions als auch im Zellkern zu finden, was dafür spricht, dass sie an der intrazellulären Signalkaskade teilhaben.

MUPP1 (multi-PDZ domain protein 1) hat 13 PDZ-Domänen und bindet unter anderem an Claudin 1, Claudin 8 und an JAM-1 (Hamazaki et al., 2002; Jeansonne et al., 2003).

PAR-3, PAR-6 (partitioning defective proteins) und die aktivierte Proteinkinase C (aPKC) sind Mitglieder des PAR3/aPKC/PAR6 Polaritätskomplexes, welcher die späteren Stadien des Tight Junction Aufbaus mit zu regeln scheint und wichtig für die Zellpolarität ist (Suzuki et al., 2002).

Cingulin bildet in vivo einen Komplex mit Protein ZO-1, ZO-2 (Cordenonsi et al., 1999a) und JAM-1 (Bazzoni et al., 2000) und in vitro auch an F-Actin (D'Atri und Citi, 2001). Es scheint eine funktionale Rolle zwischen Tight Junctions und dem Actomyosin-Zytoskelett der Zelle zu übernehmen.

Es gibt über sechzig Small GTPase Rab Proteine, von denen besonders Rab 3B und Rab13 in Tight Junctions vorkommen. Sie spielen eine Rolle beim epithelialen Membrantransport (Yamamoto et al., 2003).

Die molekulare Zusammensetzung von Tight Junctions ist somit sehr komplex und unterscheidet sich je nach Zelltyp und Differenzierungsstadium einer Zelle.

1.1.3 Funktionen von Tight Junctions

Tight Junctions erfüllen in simplen Epithelien und Endothelien zwei wichtige Funktionen: Sie bilden eine selektive Barriere für den parazellulären Transport von Molekülen, vermutlich über die Ausbildung von parazellulären Kanälen oder wässrigen Poren (Barrierefunktion; Tsukita et al., 2000; Gumbiner, 1993), und sie tragen zum Aufbau und Erhalt der Zellpolarität zwischen dem apikalen und dem basolateralen Bereich der Plasmamembran bei (Zaunfunktion; Dragsten et al., 1981; van Meer und Simon, 1986).

Die Barrierefunktion der Tight Junctions trennt verschiedene Lumina des Körpers wie Pleura, Pericard, Peritoneum, Drüsen und das Gefäßsystem – z.B. Blut-Hirn-Schranke und Blut-Hoden-Schranke - von dem Rest des Körpers ab. Es ist bisher noch ungeklärt, welche der Tight Junction-assoziierten Proteine bzw. deren Domänen für die Bildung der abdichtenden Barriere und welche innerhalb dieser Barriere für eventuell durchlässige Lecks verantwortlich sind. Es wird aber vermutet, dass Claudin 2, 4 und 16 an der Bildung der wässrigen Poren beteiligt sind (Amasheh et al., 2002; Furuse et al., 2001; Van Itallie et al., 2001).

Bei verschiedenen Krankheiten wird eine Veränderung von Tight Junction-assoziierten Proteinen bzw. der von ihnen aufgebauten Strukturen beobachtet (Gasbarrini und Montalto, 1999; Sonoda et al., 1999; Fasano, 2000; Mitic et al., 2000; Übersichtsartikel: Sawada et al., 2003; Turksen et Troy, 2004; Brandner et al., 2005).

Die humane hereditäre Taubheit (rezessiver Erbgang) lässt sich auf eine Mutation im für Claudin 14 codierenden Gen zurückführen (Wilcox et al., 2001).

Bei der erblichen Hypomagnesämie ist durch Mutation des Gens, das für Claudin 16 codiert, die Rückresorption von Mg^{2+} im aufsteigenden Ast der Henle Schleife der Niere blockiert und Mg^{2+} wird verstärkt ausgeschieden. (Simon et al., 1999).

(Entero-)Toxine können spezifisch auf Tight Junctions einwirken und die Barrierefunktion zerstören. Claudin 3 und Claudin 4 sind hochspezifische Rezeptoren für das Enterotoxin von *Clostridium perfringens* (Katahira et al., 1997). Diese selektive Toxinbindung führt zu einer Öffnung der Tight Junctions, d.h. zu einer Durchlässigkeitszunahme in intestinalen Epithelien. Diese Schädigung der intestinalen Barriere führt zu einem starken Durchfall des Menschen, einer sog. Leckflux-Diarrhoe.

Die Analysen der Kolonmukosa von Patienten mit Kolitis ulcerosa und entzündeter Mukosa beim Morbus Crohn zeigt in den epithelialen Zellen in direkter Nachbarschaft zu den eingewanderten Neutrophilen eine dramatische Verminderung der Expression von Claudin 1 (Kucharzik et al., 2001).

Umweltgifte könnten über ähnliche Mechanismen wirken, was aber bisher noch nicht endgültig geklärt ist. Das Hausstaubmilbenallergen „Der p1“ (Dermatophagoides pteronyssinus) wird von der Hausstaubmilbe im Kot ausgeschieden. „Der p1“ bindet in Zellkulturen von bronchialen Epithelien selektiv an Tight Junction Proteine, wodurch es die bronchiale epitheliale Permeabilität erhöht (Wan et al., 1999; Wan et al., 2001). Die erhöhte Permeabilität erlaubt „Der p1“ die epitheliale Barriere zu durchdringen. Das transepitheliale Eindringen von „Der p1“ zu den dendritischen, antigenpräsentierenden Zellen könnte durch die proteolytischen Eigenschaften des Proteins erleichtert werden. Die Öffnung von Tight Junctions durch Proteinase der Umwelt könnte der erste Schritt in der Entwicklung einer asthmatischen Antwort auf eine Vielzahl von Allergenen sein. Wahrscheinlich handelt es sich um einen ersten Schritt für den Allergeneintritt durch die Bronchialbarriere und führt zu einer allergischen Sensibilisierung. Zusätzlich setzt „Der p1“ unter anderem durch Inaktivierung von Elastaseinhibitoren die „Lungenverteidigungsmechanismen“ herab (Brown et al., 2003).

1.1.4 Tight Junctions in der Haut

Die Haut ist eine der grössten Grenzflächen des Körpers zu seiner Umwelt und stellt eine wichtige Barriere dar. Sie schützt den Körper sowohl vor einem ungewollten Eindringen von Pathogenen und Chemikalien aus der Umgebung als auch vor einer unkontrollierten Abgabe von Wasser und Mineralstoffen.

Das Vorkommen von typischen Tight Junction Strukturen in der Epidermis von Fischen, Amphibien und Reptilien ist schon seit Jahrzehnten bekannt. Das Vorkommen von Tight Junctions oder funktionell äquivalenten Strukturen in der Epidermis von Säugetieren war hingegen lange umstritten (z.B. Breathnach, 1971; Elias und Friend, 1975, 1976; Elias et al., 1977; siehe auch Morita et al., 1998; Yoshida et al., 2001). Die Existenz und Bedeutung der Tight Junction-assoziierten Proteine, z.B. Claudine, Protein ZO-1 und Occludin, und der Tight Junction Strukturen in den Säugetierepithelien, besonders in der menschlichen Haut, wurde erst in den letzten Jahren nachgewiesen (Pummi et al., 2001; Brandner et al., 2002; Furuse et al., 2002; Langbein et al., 2002a; Tunggal et al., 2005). Die Verteilung der Tight Junction-assoziierten Proteine in der menschlichen Epidermis ist sehr heterogen. So findet man beispielsweise Claudin 1, Claudin 7, JAM-A und MUPP1 in allen Schichten der Epidermis, während Occludin und Cingulin auf das Stratum granulosum beschränkt und Claudin 4 und Protein ZO-1 in den oberen Schichten der Epidermis lokalisiert sind (Brandner et al., 2006). Alle Tight Junction-assoziierten Proteine kolokalisieren an den Zellgrenzen des Stratum granulosum (Brandner et al., 2002, 2006). Verschiedene experimentelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tight Junctions eine wichtige Rolle bei der Barrierefunktion der Haut spielen. Claudin 1 Knock-out Mäuse sterben am ersten Tag nach ihrer Geburt aufgrund eines sehr starken transepidermalen Wasserverlustes (Furuse et al., 2002). Dasselbe gilt für epidermale E-Cadherin Knock-out Mäuse, bei denen gezeigt werden konnte, dass die Abwesenheit von E-Cadherin in der Epidermis zu einem Verlust von Claudin-1 im Stratum granulosum und einer Mislokation von verschiedenen Tight Junction-assoziierten Proteinen führt. Auch die Überexpression von Claudin 6 bei Mäusen führt durch eine veränderte Barrierefunktion zu erhöhtem transepidermalen Wasserverlust und somit zum Tod der Mäuse (Turksen und Troy, 2002). Mäuse ohne die Kanal aktivierende Protease 1 (CAP1/Prss8) haben durchlässige Tight Junctions im Stratum granulosum und sterben ca. 60 Stunden nach der Geburt an erhöhtem transepidermalen Wasserverlust (Leyvraz et al., 2005). Die Mäuse weisen u.a. kein Occludin im Stratum granulosum auf und haben ein verändertes Stratum corneum.

Beim Menschen konnte eine Mutation von Claudin 1 bei der mit Ichthyosis assoziierten neonatalen sklerosierenden Cholangitis gefunden werden (Hadj-Rabia et al., 2004). Bei Erkrankungen, die mit einer (Zer-)Störung des Stratum corneum einhergehen, wie bei der Psoriasis oder bei Ekzemen, ebenfalls bei der Wundheilung, wird eine Kolokalisation der Tight Junction-assoziierten Proteine zusätzlich zum Stratum granulosum auch in den tieferen Schichten der Epidermis gefunden (Pummi et al., 2001; Yoshida et al., 2001; Brandner et al., 2002; Malminen et al., 2003; Übersichtsartikel: Brandner et al., 2006).

Diese Ergebnisse sprechen für eine Barrierefunktion von Tight Junctions in der Haut von Säugetieren. Um allerdings eine funktionelle Barriere in der Haut zu bilden, dürfen Tight Junctions nicht auf die interfollikuläre Epidermis beschränkt sein, sondern müssen auch ein kontinuierliches System in den Hautanhangsgebilden, d.h. den Haarfollikeln und den Drüsen, bilden. Die Anwesenheit von Tight Junctions in dermalen Drüsen konnte von Langbein und Kollegen (2002a) und Wilke und Kollegen (2006) gezeigt werden. Desweiteren wurde Occludin in der Henleschicht und schwächer in der Huxley Schicht und der Kutikula des Haarschaftes (Langbein et al., 2002), Claudin 1 in der äußeren Wurzelscheide (Tebbe et al., 2002) des Haarfollikels lokalisiert.

1.2 Der Aufbau des anagenen Haarfollikels

Der Haarfollikel entsteht während der Embryonalentwicklung aus epidermalen Keratinozyten, deren Kontinuität zu den Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide (ÄWS) des Haarfollikels auch später erhalten bleibt (Moll R et al., 1982; Heid et al., 1988; Moll I et al., 1988; Holbrook et al., 1991; Schirren et al., 1997; Kurzen et al., 1998). Nichtsdestotrotz ist der Haarfollikel wesentlich komplexer als eine einfache Einstülpung der Epidermis. Er besteht aus einer Vielzahl unterschiedlich differenzierter epithelialer Zellen, die viele unterschiedliche Funktionen erfüllen.

Die großen Haarfollikel reichen bis in das untere Dermisdrittel, häufig bis in die Subkutis und bilden ein jeweils 50-100 µm dickes Haar.

Man unterteilt den intradermalen Haarfollikel (Abb. 1) in eine bulbäre Region (Abb. 2e), in der die größte Proliferation stattfindet, eine suprabulbäre Region (Abb. 2d), eine zentrale Region (Abb. 2c), eine Isthmus Region (Abb. 2b) und das Infundibulum (apikal) (Abb. 2a), welches in die Epidermis einmündet.

Der Bulbus wird von der dermalen Papille mit Nährstoffen versorgt. In der der Papille zugewandten Seite sind viele undifferenzierte Matrixzellen vorhanden (Abb. 2e). Aus den Matrixzellen entwickeln sich die Trichozyten, die sich später in Haarschaftzellen – Kortex – und Medulla-Zellen – differenzieren, die durch ihre Haar- (harten) Keratine charakterisiert sind (Heid et al., 1988; Langbein et al., 1999, 2001).

Von innen nach außen betrachtet findet man im Haarfollikel das Mark (Medulla) (Abb. 2c-d), das aus lebenden, polygonalen Zellen besteht. Peripher schließt sich der nach oben hin verhornende Kortex an (Abb. 2c, d). Er hat längsorientierte, spindelförmige Zellen. Bedeckt wird der Kortex von der Kutikula (Oberhäutchen) des Haarschaftes (Abb. 2e). Hier handelt es sich um eine Schicht von Zellen, die in der Bulbusgegend eher kubisch aussehen, sich in der zentralen Region dachziegelartig, senkrecht an den Kortex anlegen und sich letztendlich zu Hornschuppen abflachen. Der Kutikula des Haares liegt die innere Wurzelscheide (IWS) an (Abb. 2b-e), die sich wiederum in drei Schichten unterteilen lässt. Innen ist die Kutikula der inneren Wurzelscheide. Die Zellen der Kutikula sind in der Bulbusgegend als kleine, kubische Zellen angeordnet. Weiter oben ordnen sich die Zellen der Kutikula der inneren Wurzelscheide so an, dass sie sich mit der Kutikula des Haares verzahnen. Peripher liegt die Huxley Schicht und außen die einschichtige Henle Schicht. Die innere Wurzelscheide verhornt in der oberen zentralen Region und schilfert in der Höhe der Mündung der Talgdrüse ab. Von den drei Schichten verhornt die Henle Schicht als erstes. Von dieser Höhe an bilden bestimmte Zellen der Huxley Schicht (Flügelzellen) pseudopodenartige Zellfortsätze aus, die durch die verhornte Henle Schicht hindurchreichen und durch viele Desmosomen mit der Companion Zellschicht verankert sind. Somit führen die Flügelzellen bis zu ihrer eigenen Verhornung die Verankerung der inneren mit der äußeren Wurzelscheide weiter. Die äußere Wurzelscheide beginnt am Bulbus und geht am Infundibulum in die Epidermis über (Abb. 2a-e). Die äußere Wurzelscheide besteht aus drei Bereichen: der inneren Companion Zellschicht, den mittleren zentralen Zellschichten und der äußeren, dem Stratum basale der Haut entsprechenden, basalen Zellschicht. Die Companion Zellschicht, auch „the innermost cell layer of the outer root sheath“ genannt, ist einschichtig, eng an die Henle Schicht geschmiegt und kann immunhistochemisch von der restlichen äußeren Wurzelscheide durch HKN5 (Ito et al., 1986) und Ki-67 (Miyachi et al., 1990) abgegrenzt werden.

Eine kräftige Basalmembran (Glashaut) grenzt die äußere Wurzelscheide von dem umliegenden bindegewebigen Haarbalg ab.

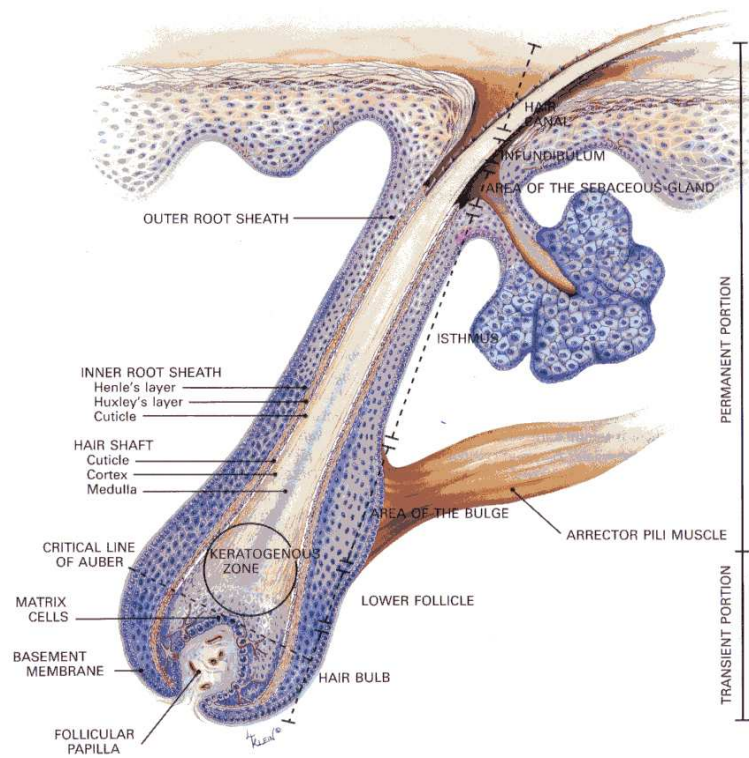


Abbildung: 1

Anatomie des anagenen Haarfollikels

(Lynn M und Klein MD, in: Bertolino AP et al., 1993)

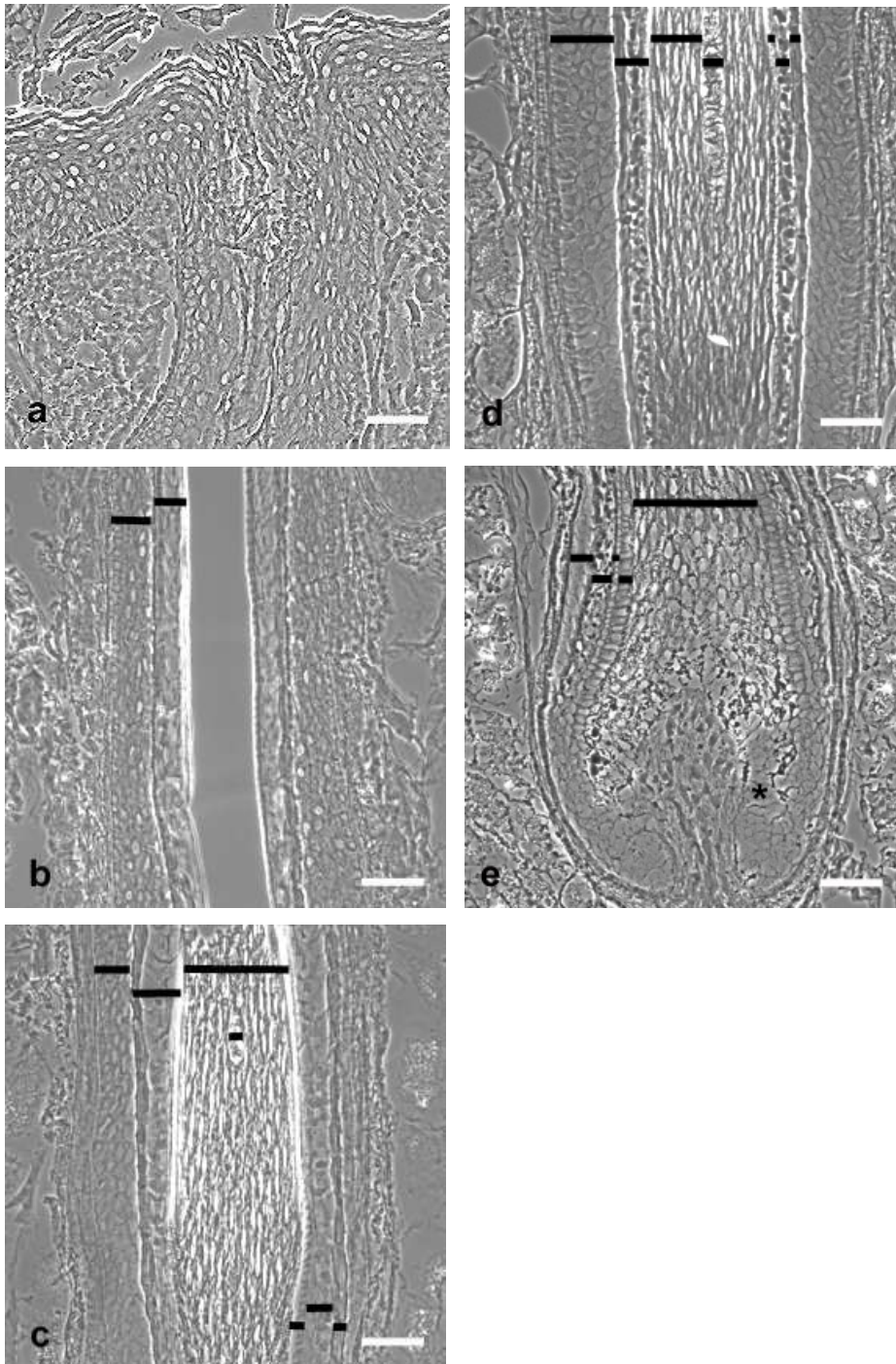


Abbildung: 2

Phasenkontrast-Aufnahme der unterschiedlichen Regionen des Haarfollikels:

- a** Infundibulum
 - b** Isthmus-Region, Balken von links nach rechts: äußere Wurzelscheide (AWS), innere Wurzelscheide (IWS)
 - c** zentrale Region, Balken von links nach rechts: AWS, IWS, Haarschaft (oben), Medulla (mittig), Kutikula des Haarschaftes und der IWS, Huxley Schicht, Henle Schicht
 - d** suprabulbäre Region, Balken von links nach rechts: AWS, IWS, Haarschaft, Medulla, Kutikula des Haarschaftes und der IWS, Huxley Schicht, Henle Schicht
 - e** bulbäre Region, Balken von links nach rechts: AWS, Henle und Huxley Schicht, Kutikula der IWS, Kutikula des Haarschaftes, Haarschaft, * Matrixzellen
- (Maßstab-Balken: 50 µm)

1.3 Fragestellung

Haarfollikel werden als ein Teil des Barriersystems der Säugetierhaut beschrieben (Übersichtsartikel: Lauer et al., 1995; Schäfer und Lademann, 2001). Durch dieses Barriersystem findet eine follikuläre Penetration in den Körper statt. Die exakten Mechanismen der follikulären Penetration sind jedoch noch nicht genügend geklärt. Eine Rolle von Tight Junctions bei der Barrierefunktion der Haut setzt ihre Kontinuität in den Hautanhangsgebilden, z.B. in Haarfollikeln, voraus. Um die These, dass Tight Junctions auch in der Haut eine Rolle bei der Barrierefunktion spielen, weiter zu erhärten, soll die Expression und die Verteilung von Tight Junction-assoziierten Proteinen in Haarfollikeln näher betrachtet werden.

In dieser Arbeit werden epilierte Haarfollikel anhand der RT-PCR-Methode auf die Expression verschiedener Tight Junction-assoziiierter Proteine untersucht. Des Weiteren werden aufbauend auf den Ergebnissen von Langbein und Kollegen (2002a) systematisch Lokalisationen bzw. Koloalisationen unterschiedlicher Tight Junction-assoziiierter Proteine in den verschiedenen Zelltypen und -schichten des Haarfollikels bestimmt und die räumliche Beziehung von Tight Junction-assoziierten Proteinen zu desmosomalen und Adhärenzverbindungsproteinen geprüft.

Die morphologische und funktionelle Rolle von Tight Junction-assoziierten Proteinen im Haarfollikel wird diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Primärantikörper

<u>Protein</u>	<u>Antikörper, (Klon), Verdünnung, mit/ohne Block,</u> <u>Firma</u>
Claudin 1	Kaninchen-AK, (MH25), Verdünnung: 1:400, ohne Block, Zymed Laboratoires (San Francisco, CA, USA)
Claudin 2	Kaninchen-AK, (MH22), Verdünnung: 1:2000, Magermilch, Zymed Laboratoires (San Francisco, CA, USA)
Claudin 3	Kaninchen-AK, (Z23.3M), Verdünnung: 1:800, ohne Block, Zymed Laboratoires (San Francisco, CA, USA)
Claudin 4	Meerschweinchen-AK, (aa Sequenz PPRTDKPYSAKYS), Verdünnung: 1:50, Magermilch, Speciality Laboratoires GmbH (Heidelberg, D)
Claudin5	Maus-AK, (4C3C2C), Verdünnung: 1:1000, NGS + Triton, Zymed Laboratoires (San Francisco, CA, USA)
Claudin 12	Meerschweinchen-AK, (aa Sequenz KSLPSPFWQPLYSH), Verdünnung:1:200, Magermilch, Speciality Laboratoires GmbH (Heidelberg, D)
Claudin 17	Meerschweinchen-AK, (aa Sequenz HTDKRRNTTMLSCTS), Verdünnung: 1:50, Magermilch + NGS + Triton, Trypsin, Speciality Laboratoires GmbH (Heidelberg, D)
Occludin	Kaninchen-AK, (Z-T22), Verdünnung: 1:2000, NGS + Triton, Zymed Laboratoires (San Francisco, CA, USA)
Protein ZO-1	Kaninchen-AK, (Z-R1), Verdünnung: 1:750, NGS + Triton, (Zymed Laboratoires, San Francisco, CA, USA)
Desmoplakin I und II	Maus-AK, (2.15/2.17/2.20), Verdünnung: 1:60, mit/ohne NGS + Triton, Progen (Heidelberg, D)

Desmocollin 3	Maus-AK, (Dsc3-U114), Verdünnung: 1:20, mit/ohne NGS + Triton, Progen (Heidelberg, D)
E-Cadherin	Maus-AK, Verdünnung: 1:10, mit/ohne NGS + Triton, Novo Castra (Newcastle upon Tyne, UK)
β-Catenin	Maus-AK, (14), Verdünnung: 1:400, mit/ohne NGS + Triton, Transduction Laboratories (Lexington, UK)

Die spezifischen Antikörper für Claudin 4, 12 und 17 wurden speziell hergestellt. Sie wurden durch Immunisierung von Meerschweinchen mit Peptiden gewonnen. Die Rohseren wurden über die an Säulen gekoppelten Peptide aufgereinigt. Die Herstellung der Peptide, die Kopplung an KLH und die Immunisierung der Tiere wurde von Peptide Speciality Laboratories GmbH (Heidelberg, D) durchgeführt.

Sekundärantikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung,</u>	<u>Code Nr.,</u>	<u>Firma</u>
Cy TM 2 gekoppelte Anti-Maus-Ak aus der Ziege,	Verdünnung: 1:50,	Code Nr. 111-165-144; Lot Nr. 49151,	JIR Dianova GmbH (Hamburg, D)
Cy TM 3 gekoppelte Anti-Kaninchen-Ak aus der Ziege,	Verdünnung: 1:500,	Code Nr. 115-225-062; Lot Nr. 48886,	JIR Dianova GmbH (Hamburg, D)
Cy TM 3 gekoppelte Anti-Meerschweinchen-Ak aus der Ziege,	Verdünnung: 1:500,	Code Nr. 106-165-003; Lot Nr. 34331,	JIR Dianova GmbH (Hamburg, D)

Kernfärbung

DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindol-dihydrochlorid),	Verdünnung: 1:5000,	Boehringer Mannheim (Mannheim, D)
--	---------------------	-----------------------------------

2.1.2 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Firma</u>
Aceton	Biesterfeld Chemikaliendistribution (Hamburg, D)
Chloroform	Merck (Darmstadt, D)

DEPC-H ₂ O	Diethyl Pyrocarbonate C ₉ H ₁₀ O ₅ , Sigma (Steinheim, D) in Wasser
Ethanol absolut	Apotheke UKE, (Hamburg, D)
Fluoromount	Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL, USA)
Phenol	Sigma (Steinheim, D)

2.1.3 Puffer und Lösungen

<u>Puffer/Lösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Blocklösung	10 µl Triton 10% (X-100, Serva, Heidelberg, D) 990 µl PBS
Citratpufferlösung	20 µl NGS (Normal Goat Serum) Dianova (Hamburg, D) pH 6,0 9 ml Stammlösung A (10 g Citronensäure-Monohydrat, 500 ml Aqua destilliert) Merck (Darmstadt, D) 41 ml Stammlösung B (14,7 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 500 ml Aqua destilliert) Merck (Darmstadt, D) 400 ml Aqua destilliert
Magermilchpulverlösung	4 g Magermilchpulver, Saliter (Obergrünzburg, D) 200 g PBS
PBS- Gebrauchslösung (1x)	100 ml PBS-Stammlösung 900 ml Aqua destilliert
PBS-Stammlösung (10x)	(Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) 10-fach, pH 7,3-7,5 einstellen und autoklavieren 80 g NaCl Mallinckrodt Baker B. V. (Denver, USA) 20 g KCl Merck (Darmstadt, D) 11,6 g Na ₂ HPO ₄ Merc, (Darmstadt, D) 2,0 g KH ₂ PO ₄ Merck (Darmstadt, D) 1000 ml Aqua destilliert
TBE-Laufpuffer (10x)	pH 8,3 108 g Tris-HCl Life Technologies (NY, USA) 55 g Borsäure Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz) 9,3 g EDTA Merck (Darmstadt, D)
Triton X-100	0,1% Triton in Aqua destilliert
Trypsin-Stammlösung	0,01 g Trypsin Biochrom AG (Berlin, D)

	0,01 g CaCl	Merck (Darmstadt, D)
	9 ml	Aqua destilliert
	1 ml	Tris HCl 0,5 M
Trypsin Gebrauchslösung	1 ml	Tris HCl 0,5 M
	9 ml	Aqua destilliert

aus diesem Ansatz 100 µl herausnehmen
dann 100 µl Trypsin Stammlösung hinzugeben
(Trypsin ist nur bei 37°C aktiv)

2.1.4 Enzym

Platinum® Taq DNA Polymerase Invitrogen (Karlsruhe, D)

2.1.5 Kits

InViSorb™ RNA Kit II InViTek (Berlin, D)

Komponenten: Adsorbin, Isopropanol (ultra pure), Puffer A,
Lysis Solution (choatropes Salz)

The Copy Kit™, Version F, Invitrogen BV (Karlsruhe, D)

2.1.6 Oligonucleotide

<u>PCR-Primer</u>	<u>Primersequenz</u>
Claudin 1 sense:	5'GCTCTAGAATTCCGAGCGAGTCATGGCCAACGC3'
Claudin 1 antisense:	5'GCTCTAGAATTCTCACACGTAGTCTTTCCCGCT3'
Claudin 2 sense:	5'GCTCTAGAATTCGTGTGCCTGGCACTGTTACAG3'
Claudin 2 antisense:	5'GCTCTAGAATTCCCCCTCAATGTATAAATTGC3'
Claudin 4 sense:	5'GCTCTAGAATTCGTTCTGCTCACACTTGCTGG3'
Claudin 4 antisense:	5'GCTCTAGAATTCCGCGCAGCACAGCATGACGG3'
Claudin 5 sense:	5'CACCAGGGCCCCGCCAGGC3'
Claudin 5 antisense:	5'CGCCAGGGTCACGAAGAGCG3'
Claudin7 sense:	5'GCTCTAGAATTCGTATCCTACTCCCTGTGCCG3'
Claudin 7 antisense:	5'GCTCTAGAATTCGGCCCGAATTGGCCATTTC3'
Claudin 8 sense:	5'GCTCTAGAATTCATGGCAACCCATGCCTTAGAA3'
Claudin 8 antisense:	5'GCTCTAGAATTCCTACACATACTGACTTCTGG3'
Claudin10 sense:	5'GCTCTAGAATTCGGAGATCATCGCCTTCATG3'
Claudin 10 antisense:	5'GCTCTAGAATTCATGCCTGTATATAACCGTC3'

Claudin 11 sense: 5'GGTGGTGGGCTTCGTCACGA3'
 Claudin 11 antisense: 5'GGCCCGCCTGTACTTAGCCA3'
 Claudin 12 sense: 5'GCTCTAGAATTCATGGGCTGTCGGGATGTCCAC3'
 Claudin 12 antisense: 5'GCTCTAGAATTCCCCAGATAGATGGGGAGAGGC3'
 Claudin 16 sense: 5'GCTCTAGAATTCCGGATAATGACCTCCAGGACC3'
 Claudin 16 antisense: 5'GCTCTAGAATTCCCAGAGAGTCATCAGCATTCA3'
 Claudin 17 sense: 5'GCTCATGAATTCATGGCATTATCCCTTGCAA3'
 Claudin 17 antisense: 5'GCTCATGAATTCTTAGACATAACTGGTGGAGGT3'

2.1.7 Gewebe

Menschliche Kopfhaut wurde während Routineoperationen von Hautzysten und Tumoren gewonnen. Das von uns verwandte Gewebe war mindestens 2 cm von jeglicher Läsion entfernt lokalisiert.

Die Proben wurden in mit flüssigem Stickstoff auf -120°C gekühltem Isopentan schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die Verwendung des Materials wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg Nr. 060900 genehmigt.

2.1.8 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Firma</u>
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot II (Fa. Zeiss Göttingen, D) mit CCD-Kamera Hamamatsu C4742-95 (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching D), Software: Openlab 2.0.4 (Fa. Imkprovision, Coventry, UK)
Gefrierschrank	Heraeus HfU586STD-V14 (Heraeus Holding GmbH, Hanau, D)
Gelkammern	Biometra (Göttingen, D)
Magnetrührer	Heidolph MR 3001 (Schwabach, D)
Gefrier-Mikrotom	Kryostat (Leica CM3050, Benzheim, D)
Mikrozentrifuge	(Heraeus, Hamburg, D)
Ultra-Mikrotom	(Leica, Benzheim, D)
PCR-Gerät UNO-Thermoblock	Biometra (Göttingen, D)
pH-Meter	Knick 766 Calimetric (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin, D)

Photometer	Pharma Biotech Ultrospec 200 (Regensburg, D)
Vortexer	Scientific Industries (New York, USA)
Wasserbad	Satorius (Göttingen, D)
Zentrifuge	Biofuge, Heraeus (Hanau, D)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologie

2.2.1.1 RNA-Extraktion aus Barthaaren

Es wurde der Invisorb RNA Kit II von Invitex, Berlin, Deutschland verwendet.

Die gezupften Barthaare wurden in 500 µl Lysis Solution DCT für 10 Minuten inkubiert und durch Mörsern zerkleinert. Zu dem Homogenat wurden 30 µl Absorbin zur Bindung der DNA hinzugefügt. Es wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 1 Minute bei 13.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine saure Phenol-Chloroform-Extraktion zur Isolierung der Gesamt-RNA durchgeführt. Dafür wurden 500 µl Phenol, 50 µl Puffer A (Komponente des InViSorb-Kits) und 100 µl Chloroform zugegeben, 15 sec gemischt, für 5 min auf Eis inkubiert und zur Phasentrennung für 10 min bei 13.000 Umdrehungen/min zentrifugiert.

Der RNA-haltige Überstand wurde in ein neues Zentrifugengefäß überführt. In einem Verhältnis von 1:1 wurde Isopropanol dazugegeben und kurz gemischt. Zur Präzipitation wurde dieser Ansatz in einem Gefrierschrank (-20°C) für 20 min gekühlt. Anschließend wurde bei 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun entfernt und das RNA Pellet zweimal mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen. Damit das restliche Ethanol verdunstet, wurde das Pellet bei 60°C getrocknet. Nun wurde das RNA Pellet in DEPC behandeltem H₂O gelöst. Die gelöste RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 RNA-Messung

Die RNA-Messung und die Bestimmung ihrer Reinheit wurde mit dem Photometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Regensburg, D) bei den Wellenlängen von 260 und 280 nm durchgeführt.

2.2.1.3 cDNA Synthese – Reverse Transkription

Es wurde zur cDNA Synthese Copy Kit Version F (Invitrogen, Karlsruhe, D) verwendet. Das Ziel der Reversen Transkription ist es, die mRNA in blunt endet cDNA umzuschreiben. (Bedeutung der Abkürzungen siehe Material-Teil)

Für die Herstellung der cDNA wurden 5 µg RNA eingesetzt und mit DEPC-H₂O auf ein Endvolumen von 32,5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde durch leichtes Antippen vermischt und kurz zentrifugiert, so dass sich das Reaktionsgemisch auf dem Boden des Gefäßes befand. Zur Denaturierung der RNA wurde der Ansatz bei 65°C inkubiert und anschließend für 2 min bei Raumtemperatur belassen. Es wurde noch einmal kurz zentrifugiert. In kurzer Abfolge wurden nun 1 µl RNase Inhibitor (10 units/µl), 10 µl 5X Reverse Transcriptase Puffer (500 mM Tris-HCl, pH 8,3, 200 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 2,5 mM Spermidine), 2 µl 100 mM dNTP (25 mM dGTP, 25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dTTP), 2,5 µl 80 mM Natriumpyrophosphat und 2 µl Reverse Transcriptase (25 units/µl) hinzugegeben. Nach leichtem Vermischen durch Antippen und kurzem Zentrifugieren wurde der Ansatz bei 42°C in einem Wasserbad für 60 min inkubiert. Während dieser Inkubation wurde der erste cDNA-Strang synthetisiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde der Ansatz danach für 2 min auf Eis gegeben. Für jede Synthese-Reaktion wurde die RNase H (3 U/µl) auf 0,3 U/µl verdünnt, indem 1 µl des Enzyms und 1 µl 1 M Dithiothreitol mit 8 µl RNase H Verdünnungs-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM KCl, 10 mM Mg Cl₂, 0,1 mM EDTA, 50 mM Dithiothreitol, 50 µg/µl BSA, pH 8,0 50% Glycerol) vermischt und auf Eis gegeben wurden. Zur ersten Kettenreaktion wurde in angegebener Reihenfolge 166,5 µl 1x Second Strand Buffer (191 mM KCl, 4,5 mM MgCl₂, 15 mM NH₄SO₄), 12,5 µl 1,0 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 5µl 10 mM β-NAD, 2,5 µl 1M Dithiothreitol (DTT), 10 µl Dilution RNase H (0,3 U/µl), 1 µl E. coli DNA Ligase (2,5 units/µl) und 2,5 µl E. coli DNA Polymerase I (10 units/µl) hinzugegeben. Der Inhalt wurde gemischt, zentrifugiert und bei 15°C für 90 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde der zweite cDNA Strang synthetisiert. Es wurde weitere 30 min in Raumtemperatur inkubiert, um die cDNA-Synthese zu vervollständigen. Danach wurde die Synthesereaktion durch Erhitzen des Ansatzes für 10 min bei 70°C gestoppt. Anschließend erfolgte ein erneutes, kurzes Mischen, Zentrifugieren, und die Abkühlung des Ansatzes für 2 min bei Raumtemperatur und 2 min auf Eis. 1 µl T4 DNA Polymerase (3 units/µl) wurde nun zu dem Ansatz hinzugefügt, gemischt und zentrifugiert. Es fand eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur statt, um eine blunt endet cDNA zu erhalten. Um die Reaktion zu stoppen und die cDNA zu fällen, wurden 2 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 und 250 µl Phenol-

Chloroform dazugegeben. Der Ansatz wurde für 1 min invertiert und für 5 min zentrifugiert. Der Überstand, der die doppelsträngige blunt endet cDNA enthielt, wurde in ein neues Gefäß überführt und zur Weiterverwendung mit 5 µl Mussel Glycogen (2,0 mg/ml), 250 µl 4 M Ammonium Azetat und 1 ml 100%igem Ethanol vermischt. Dadurch kam es zu einer Präzipitation der cDNA. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min in Flüssigstickstoff gegeben. In einer Mikrozentrifuge wurde der Ansatz für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die cDNA dreimal mit 80%igem Ethanol gewaschen. Zur vollständigen Entfernung des Ethanols wurde die cDNA bei 37°C getrocknet. Mit 50 µl DEPC-H₂O wurde die cDNA in Lösung gebracht und bei -20°C gelagert.

2.2.1.4 cDNA-Messung

Die cDNA-Messung wurde photometrisch (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Regensburg, D) bei der Wellenlänge von 260 nm und 280 nm durchgeführt.

2.2.1.5 PCR

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht eine in vitro Herstellung von Nukleinsäuresequenzen durch eine zyklische Amplifikation. Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion beruht auf der Nachahmung der natürlichen DNA-Replikation. Sie besteht aus drei Schritten. Durch eine höhere Temperatur wird die DNA denaturiert, so dass zwei Einzelstränge vorliegen. Im folgenden Schritt lagern sich synthetisch hergestellte Oligonucleotidsequenzen (Primer) an komplementäre Zielsequenzen an (Annealing). Im dritten Schritt setzt die Polymerase an dem 3'-Ende der Primer an und synthetisiert komplementäre DNA Stränge zur Matritze. Durch die Wiederholung dieser drei Schritte kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation eines gewünschten DNA Abschnittes.

Durchführung

Es wurden die folgenden Komponenten für die Durchführung der PCR gemischt:

<u>Komponenten</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
10facher PCR Puffer, ohne Mg ²⁺	5 µl	1fach
10 mM dNTP Mischung	5 µl	0,25 mM von jedem der 4 Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)

50 mM MgCl ₂	1,5 µl	1,5 mM
Primer mix (10 µM von jedem)	variabel	25 pmol von jedem
Template DNA	1 µl	nach Bedarf
Platinum Taq DNA Polymerase	0,5 µl	2,5 units (oder nach Bedarf)
Autoklaviertes H ₂ O	auf 50 µl auffüllen	

Die Lösung wurde kurz zentrifugiert.

Zur Amplifizierung der cDNA fand Folgendes im Thermocycler statt.

Programm:

1. 95°C 60 sec
2. 55°C 30 sec
3. 72°C 30 sec
4. 94°C 60 sec
5. 55°C 30 sec
6. 72°C 30 sec
7. Punkt 4. bis 6. 40 Zyklen
8. 4°C Abkühlungsphase

2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung und ggf. Reinigung von Nukleinsäuren.

200 ml TBE-Laufpuffer und 4g Agarose wurden in der Mikrowelle zur Lösung der Agarose erhitzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden 4 µl Ethidiumbromid (Konzentration 25mg/ml) hinzugegeben. Die klare Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen. Nach der Aushärtung der Lösung zu Gel wurde die Gelkammer in einem Behälter mit einfach verdünntem TBE-Laufpuffer versenkt. Die Gelelektrophorese wurde zunächst bei 30 Volt für 15 min und anschließend bei 60 Volt für 50 min laufen gelassen.

Daraufhin wurde das Gel analysiert. Das Ethidiumbromid, das im UV-Licht (bei einer Wellenlänge von 254 bzw. 312 nm) orange fluoresziert, interkaliert in die Nukleinsäuren und macht sie somit auf einem UV-Schirm sichtbar. Die Fluoreszenzbanden wurden fotografiert. Mit Hilfe eines Längenstandards, den man

gleichzeitig in der Gelelektrophorese hat mitlaufen lassen, kann man die Länge der Nukleinsäuren bestimmen.

2.2.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

2.2.2.1 Gefrierschnitte

Das zuvor bei -80°C gelagerte Gewebe wurde mit Hilfe des Kryostaten bei -24°C in $6\ \mu\text{m}$ dünne Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger übertragen, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und bei -20°C für 10 min in Aceton fixiert. Die Schnitte wurden erneut bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Nun konnten die Schnitte sofort verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

Zur Unterdrückung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz wurden bei allen Färbungen/Doppelfärbungen mit Protein ZO-1 und Occludin vor der Inkubation mit dem Primärantikörper für 15 min das Blockreagenz (Normal Goat Serum und Triton) aufgetragen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper fand für 30 min bei Raumtemperatur in einer befeuchteten Kammer statt. Es folgte ein 3 x 10-minütiger Waschgang in PBS. Danach wurden die Schnitte mit Cy2- und/oder Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Sekundärantikörper waren gegen die jeweilige Spezies des Primärantikörpers (Anti-Maus usw.) gerichtet und mit grün fluoreszierendem Cy2 bzw. rot fluoreszierendem Cy3 gekoppelt. Dem folgte ein weiterer 5-minütiger Waschschriff in PBS, für 1 min die Kernfärbung mit DAPI, zwei weitere 5-minütige Waschschriffe mit PBS, 5 min mit Aqua dest. und 3 min Inkubation in 100% Ethanol. Dann folgte die Lufttrocknung der Schnitte. Schließlich wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Flouromount und Deckgläsern eingedeckelt. Die Lagerung der Objektträger erfolgte im Dunkeln bei 4°C . Positivkontrollen (mit einer Einfachfärbung von jedem zu untersuchenden Protein) und Negativkontrollen (ohne Primärantikörper, jedoch mit Sekundärantikörper) wurden gleichzeitig angefertigt.

2.2.2.2 Paraffinschnitte

Für die gegen Claudin 17 gerichteten Antikörper wurden ergänzend auch Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe verwendet.

Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Ultra-Mikrotoms auf eine Dicke von $4\ \mu\text{m}$ geschnitten und auf beschichtete Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden im

Brutschrank bei 54°C getrocknet, um das Abschwimmen der Gewebeschnitte zu vermeiden.

Um die Färbungen durchführen zu können, wurden die Schnitte durch Xylolersatz und eine absteigende Alkoholreihe zunächst entparaffiniert und rehydriert (zweimal in Xylolersatz für jeweils 20 min, zweimal in absolutem Ethanol für jeweils 5 min, in 90%igem Ethanol 5 min, kurz in 80%igem Ethanol, kurz in 70%igem Ethanol und 5 min in Aqua destilliert). Durch die Formalinfixierung wurden die Antigene zum Teil maskiert. Um nun die Antigene zu demaskieren, wurden eine Mikrowellen- und eine Trypsinvorbehandlung durchgeführt. Die Schnitte wurden in einer Mikrowelle in 10 mM Natriumzitatpuffer (pH 6,0) dreimal für 4 min bei 600 W erhitzt. Zusätzlich erfolgte die Trypsinierung mit 0.001%igem Trypsin für 10 min bei 37°C. Um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, wurde 15 min mit Blocklösung (Normal Goat Serum, Triton und 2%ige Magermilchpulver-Lösung) inkubiert. Die Schnitte wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Primärantikörpern inkubiert.

Die weiteren Schritte wurden wie bei der Immunfluoreszenz-Färbung der Gefrierschnitte durchgeführt.

2.2.2.3 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurden das Mikroskop Axiophot II (Fa. Zeiss, Göttingen, D) und die Software Openlab 2.0.4 (Fa. Improvision, Coventry, UK) eingesetzt.

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

- keine Immunreaktion + schwache Immunreaktion
- ++ mittlere Immunreaktion +++ starke Immunreaktion
- (+) für Intensitäten, die sich zwischen den 4 Hauptklassen einordnen

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung der mRNAs von verschiedenen Tight Junction Molekülen in epilierten Haaren

Unter der Verwendung von spezifischen Primern (siehe Material und Methoden) konnten mit Hilfe der RT-PCR Technik aus cDNA von epilierten Haarfollikeln DNA-Fragmente mit der erwarteten Länge amplifiziert werden (Abb. 3 siehe folgende Seite; Tabelle 1). Die Fragmente wurden anschließend sequenziert und somit wurde bestätigt, dass es sich um Abschnitte der cDNAs handelt, die für Protein ZO-1 (Spur Z), Occludin (Spur O) und die Claudine 1, 4, 7, 8, 10, 11, 12 und 16 (Spuren 1, 4, 7, 8, 10, 11, 12 und 16) codieren (Abb. 3). Bei den zusätzlichen cDNA-Fragmenten, die mit Hilfe der Primer für ZO-1 amplifiziert wurden (Spur Z), handelt es sich um nicht verwandte Sequenzen.

Tabelle I: Länge der amplifizierten Proteine

Protein:	Erwartete Länge:
ZO-1	120bp
Occludin	229bp
Claudin 1	646bp
Claudin 4	249bp
Claudin7	239bp
Claudin 8	678bp
Claudin 10	219bp
Claudin11	340bp
Claudin 12	460bp
Claudin 16	327bp



Abbildung: 3

Expression der mRNAs von Tight Junction-assoziierten Proteinen in menschlichen Haarfollikeln. RT-PCR Analyse von mRNAs codierend für Protein ZO-1 (Spur **Z**), Occludin (Spur **O**), Claudine 1, 4, 7, 8, 10, 11, 12 und 16 (Spuren **1, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 16**) in epilierten menschlichen Haarfollikeln. Standard: 100-bp Leiter (Spur **R**), Negativkontrolle (Spur **-**). Alle PCR Banden wurden durch Sequenzierung bestätigt. Die oberen Banden in der Z-Spur sind nicht mit ZO-1 verwandte Sequenzen.

3.2 Immunlokalisierung von Tight Junction-assoziierten Proteinen in menschlichen Anagen-Haarfollikeln

Die Lokalisation der Tight Junction-assoziierten Proteine ZO-1, Occludin und Claudine 1, 4 und 12 in Anagen-Haarfollikeln wurde an Gefrierschnitten menschlicher Kopfhaut untersucht. Für Claudin 17 wurde Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Gewebe verwendet.

3.2.1 Protein ZO-1

Protein ZO-1 ist ein wichtiges Plaque-Protein der Tight Junctions. Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen eine schwache Expression von Protein ZO-1 in den Matrixzellen, während es in Trichozyten bis in die keratogene Zone des entstehenden Haares stärker gefunden wird (Abb. 4c, d). In der Haarmedulla (Mark) und der Kutikula des Haarschaftes kann es deutlich lokalisiert werden. In der inneren Wurzelscheide (IWS) des Haarfollikels ist die Färbung von Protein ZO-1 unterschiedlich intensiv. Während sie in der Henle Schicht von ihrem bulbären Beginn bis hin zur Keratinisierung stark konzentriert vorhanden ist, ist sie in der Huxley Schicht und der Kutikula der IWS (von der bulbären Region bis hin zum zentralen Bereich) etwas schwächer ausgeprägt (Abb. 4c, d). Die verhornten Zellen der Isthmus-Region sind negativ (Abb. 4b).

Auch in der äußeren Wurzelscheide (ÄWS) wird die Protein ZO-1-Färbung unterschiedlich intensiv gefunden. In der bulbären, der suprabulbären und der unteren zentralen Region wird ZO-1 in allen Schichten nur schwach synthetisiert (Abb. 4c, d). Nur an der Grenze zwischen ÄWS und IWS zeigt sich eine stärkere Expression (Abb. 4c). In der oberen zentralen und der Isthmus-Region wird es in der Companion Zellschicht stark synthetisiert, während es in den anderen beiden Schichten schwächer, aber deutlich nachweisbar ist (Abb. 4b). Generell findet man eine verbreiterte Syntheszone von Protein ZO-1 in der ÄWS von der beginnenden Verhornung der IWS an. ZO-1 wird sowohl im Infundibulum, als auch in der interfollikulären Epidermis im Stratum granulosum und oberen Stratum spinosum synthetisiert (Abb. 4a).

3.2.2 Occludin

Das Transmembranprotein Occludin wird nicht in Matrixzellen exprimiert. Auch in den undifferenzierten Trichozyten ist es nicht vorhanden. In den ausdifferenzierteren Trichozyten und der keratogenen Zone lässt es sich nur schwach anfärben (Abb. 4g, h), hingegen sind die Medullazellen und die Kutikula des Haarschaftes stärker positiv (Abb. 4g). In der Henle Schicht der IWS ist Occludin vom bulbären Beginn (Abb. 2h), weitergehend über die suprabulbäre Region (Abb. 4g) bis zur Verhornung sehr stark vorhanden (Tab II). Huxley Schicht und Kutikula der IWS sind in der bulbären Region ebenfalls klar gefärbt, wohingegen sie in höheren Regionen nur noch schwach positiv sind (Abb. 4g, h; Tab. II). In der verhornten Isthmus-Region der IWS wird Occludin nicht synthetisiert (Abb. 4f).

In der ÄWS wird Occludin in der Companion Zellschicht der suprabulbären, der zentralen und der Isthmus-Region stark exprimiert (Abb. 4f, g). In der oberen zentralen und der Isthmus-Region sind zusätzlich die an die Companion Zellschicht angrenzenden Zellschichten der ÄWS hinsichtlich des Vorkommens von Occludin positiv (Abb. 4f, g). Auch hier geht die verbreiterte Expression von Occludin in der ÄWS mit der Verhornung der Zellen in der IWS einher (Abb. 4f, g). Im Infundibulum wird Occludin ebenso wie in der interfollikulären Epidermis nur im Stratum granulosum gefunden (Abb. 4e).

3.2.3 Claudine

Von der Familie der Claudine wurden Claudin 1, 2, 3, 4, 5, 12 und 17 mit Hilfe der Immunfluoreszenz bezüglich ihrer Lokalisation im menschlichen anagenen Haarfollikel untersucht.

3.2.3.1 Claudin 1

Während Matrixzellen und undifferenzierte Trichozyten keine Claudin-1-Färbung zeigen, wird das Protein schwach in differenzierteren Trichozyten einschließlich der Zellen der keratogenen Zone und der Medulla gefunden (Abb. 4k, l; Tab. II). Auch die Kutikula des Haarschaftes ist schwach positiv. In der IWS wird Claudin 1 sowohl in der Henle, als auch in der Huxley Schicht stark, in der Kutikula schwächer synthetisiert (Abb. 4k). Die keratinisierten Zellen der IWS der oberen zentralen und der Isthmus-Region sind negativ (Abb. 4k, j). Claudin 1 wird über die gesamte Länge der ÄWS in allen Schichten sehr stark exprimiert, wobei die Färbung in der gesamten suprabulbären Region und in der basalen Zellschicht der ÄWS geringfügig schwächer ist (Abb. 4i-1). Darüber hinaus wird Claudin 1 sowohl im Infundibulum, als auch in der Epidermis in allen Zellschichten gefunden (Abb. 4i).

Claudin 1 kommt in mehr Schichten vor, als die anderen Tight Junction-assoziierten Proteine; es kann in fast allen Zellen des Haarfollikels lokalisiert werden (Abb. 4i-1).

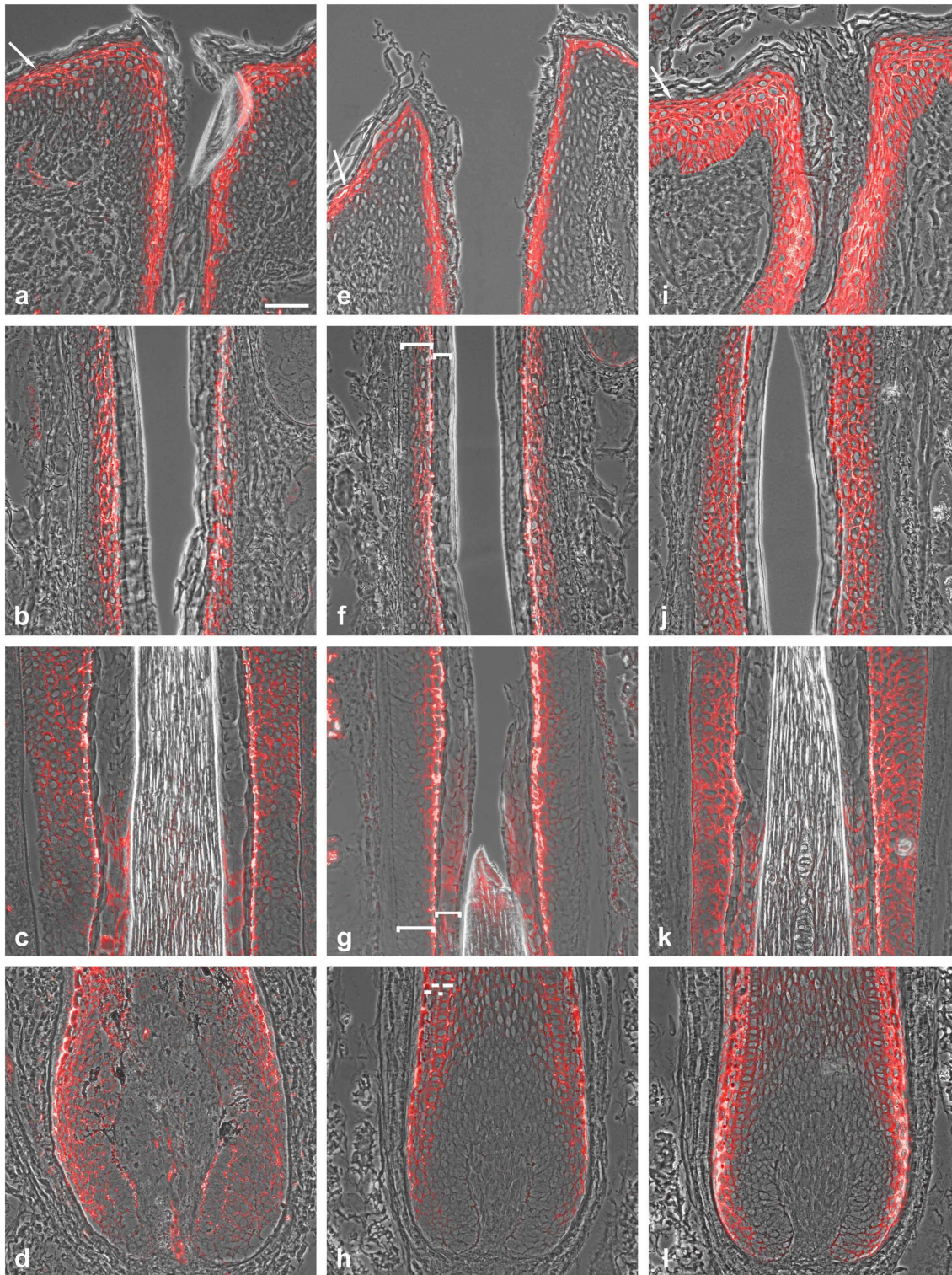


Abbildung: 4

Lokalisation Tight Junction-assoziierter Proteine im menschlichen anagenen Haarfollikel. Immunfluoreszenz-Lokalisation der Proteine ZO-1 (**a, b, c, d**), Occludin (**e, f, g, h**) und Claudin 1 (**i, j, k, l**) in Gefrierschnitten von anagenen menschlichen Haarfollikeln.

In den Abbildungen **a, e, i** wird das Infundibulum dargestellt, in **b, f, j** die Isthmus-Region, in **c, g, k** die zentrale Region und in **d, h, l** der Bulbus. Die Pfeile in **a, e, i** markieren die Epidermis; Die Balken in **f** und **g** markieren von links nach rechts die äußere Wurzelscheide und die innere Wurzelscheide, die Balken in **h** von links nach rechts Henle Schicht, Huxley Schicht, Kutikula der IWS und Kutikula des Haarschaftes; (Maßstab-Balken: 50µm)

Table II: Intensität des Vorkommens Tight Junction-assoziiierter Proteine, desmosomaler Proteine und Adhärenzverbindungsproteine in den unterschiedlichen Zelltypen des menschlichen Haarfollikels

Protein	AWS			AWS			AWS			AWS (Bulbus – untere zentrale Region)			Haarschaft				MZ			
	Infundibulum			Isthmus-Region			Zentrale Region			Suprabulbare R.			He	Hu	IKu	Tr		Ku	Ko	M
	Sba	Ssp	Sgr	BL	CCL	CL	BL	CCL	CL	BL	CCL	CL								
ZO-1	-	+(+)	+++	(+)	+(+)	+++ ^{1,3}	(+)	+(+)	+++ ^{1,3}	(+)	+	+	+++	+++ ³	+++ ³	++(+)	++	++	+	+
Oocl	-	(+)	+++	-	+	+++ ^{1,2}	-	+	+++ ³	-	-	-	+++	+++ ³	+++ ³	(+)	++	+	+	-
Cl-1	++	+++	+++	++(+)	+++	+++ ^{1,2}	++	+++	+++ ^{1,3}	++(+)	+	+	+++	+++ ³	+++ ³	+	+	(+)	(+)	(+)
Cl-4	-	+	+++	-	+	+++ ^{1,2}	-	+	+++ ^{1,3}	-	-	-	+++	+++ ³	+++ ³	+	+	+	+	++
Cl-12	-	-	(+)	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	+	+++	+++	(+)	-	-	-	-
Cl-17	-	-	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
Dpl/II	++	+++	+++	++	++(+)	+++	++	+++	+++ ³	+	+	+	+++	+++ ³	+++ ³	++(+)	++	++(+)	++(+)	++
Dsc3	++(+)	+++	+++	++	++(+)	+++ ³	+	++	+++ ³	+	+	+	+++	+++ ³	+++ ³	++(+)	++	++(+)	++(+)	++(+)
β-Cat	+++	+++	+++	+++	+++	+++ ³	+	+++	+++ ³	+	+	+	+++	+++ ³	+++ ³	++(+)	++	++	++	++
E-Cad	++(+)	+++	++(+)	++	+++	+++ ³	+	+	+++ ³	+	+	+	+++	+++ ³	+++ ³	++(+)	++	++	++	+

1: steigende Intensität von unterer zu oberer zentraler Region; Abstufung beschreibt Färbung der oberen zentralen Region

2: Färbung umfasst von unterer nach oberer zentraler Region mehr Zellschichten

3: besonders positive Färbung an der Membran, die der Henle Schicht benachbart ist

4: besonders die Seite, die der Companion Zellschicht anliegt

5: steigende Intensität von der bulbären zur suprabulbaren Region

6: besonders positive Färbung in der Membrannachbarschaft der Huxley Schicht

ÄWS	äußere Wurzelscheide	IKu	Kutikula der IWS	Proteinsynthese:
IWS	innere Wurzelscheide	Ku	Kutikula des Haarschaftes	+++ : sehr stark
BL	basale Zellschicht (basal cell layer)	Ko	Kortex	++(+): stark
CCL	zentrale Zellschicht (central cell layer)	M	Medulla	++ : mittel
CL	companion Zellschicht (comp. cell layer)	MZ	Matrixzellen	+(+) : mittel bis schwach
He	Henle Schicht	Tr	Trichozyten	+ : schwach
Hu	Huxley Schicht	Sba	Stratum basale	(+) : sehr schwach
Ssp	Stratum spinosum	Sgr	Stratum granulosum	- : negativ

3.2.3.2 Claudin 4

Claudin 4 wird in den Trichozyten und dem Kortex sehr schwach, der Kutikula des Haarschaftes schwach und in der Medulla mittelstark exprimiert. In den Matrixzellen ist es nicht vorhanden (Tab. II).

Die Henle und Huxley Schicht sind stark gefärbt, in der Kutikula der IWS ist Claudin 4 nur schwach zu finden. In der ÄWS wird Claudin 4 in der Isthmus- und oberen zentralen Region in der Companion Zellschicht und den suprabasalen Schichten synthetisiert, während es in der unteren zentralen und der suprabulbären Region sowie im Bulbus auf die Companion Zellschicht beschränkt ist (Abb. 5a; Tab. II).

Claudin 4 wird sowohl im Infundibulum als auch in der Epidermis, im Stratum granulosum und im oberen Stratum spinosum gefunden. Das Verteilungsmuster von Claudin 4 ist dem von Occludin ähnlich.

3.2.3.3 Claudin 12

Claudin 12 kann in der Companion Zellschicht der ÄWS mit besonderer Intensität an der Membran, die an die Henle Schicht grenzt, nachgewiesen werden (Abb. 5b). Im Infundibulum wird Claudin 12 jedoch nur sehr schwach synthetisiert. Eine sehr schwache Färbung kann auch in verschiedenen Schichten der IWS beobachtet werden (Tab. II).

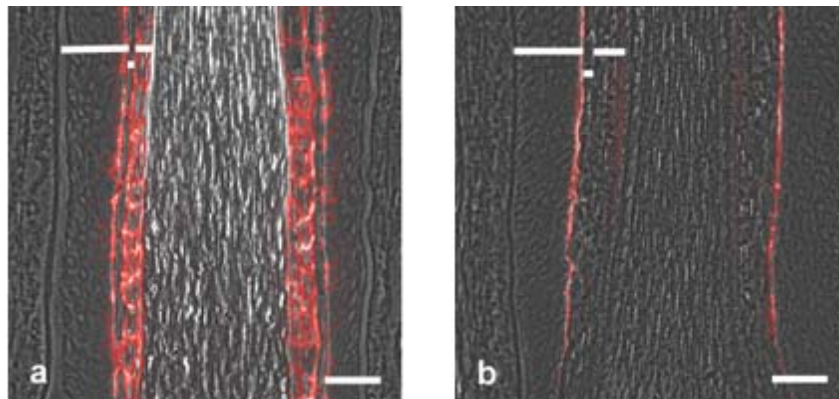


Abbildung: 5

Lokalisation von Claudin 4 und Claudin 12 in der suprabulbären Region des menschlichen Haarfollikels.

a Claudin 4 Balken von links nach rechts: äußere Wurzelscheide (ÄWS), Henle Schicht, Huxley Schicht

b Claudin 12 Balken von links nach rechts: ÄWS, Henle Schicht, Huxley Schicht
(Maßstab-Balken: 50 µm)

3.2.3.4 Claudin 17

Claudin 17, welches im Stratum granulosum der Epidermis und des Infundibulums zu finden ist, wird im restlichen Haarfollikel nicht synthetisiert (Tab. II).

3.2.3.5 Claudine 2, 3 und 5

Die Claudine 2, 3 und 5 sind im menschlichen Haarfollikel nicht lokalisiert.

3.2.3.6 Kolokalisation der Tight Junction-assozierten Proteine

In der IWS können von ihrem Beginn in der bulbären Region über die suprabulbäre Region bis zur zentralen Region ZO-1, Occludin, Claudin1, Claudin 4 und geringfügig auch Claudin 12 nachgewiesen werden. Von einer bestimmten Zone in der zentralen Region an sind in der IWS keine Tight Junction-assozierten Proteine mehr nachzuweisen (Abb. 6). Bei einem Vergleich mit der Kernfärbung DAPI ist zu sehen, dass oberhalb dieser Zone in der IWS auch keine Zellkerne mehr zu finden sind (Abb. 6), d.h. dass diese Zellen verhornt sind.

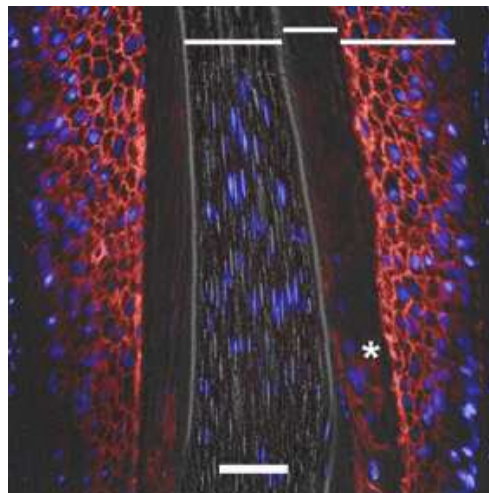


Abbildung: 6

Darstellung der Lokalisation von Claudin 1 im Vergleich zur Lokalisation von lebenden Zellen. Lokalisation von Claudin 1 (rot) in der zentralen Region des Haarfollikels im Vergleich zur Kernfärbung mit Hilfe von DAPI, die das Vorhandensein lebender Zellen widerspiegelt. Balken von links nach rechts: Haarschaft, innere Wurzelscheide (IWS), äußere Wurzelscheide (ÄWS). Im unteren Teil der inneren Wurzelscheide (unterhalb vom Stern *) ist sowohl die Färbung der lebenden Zellkerne, als auch der Nachweis von Claudin 1 positiv, während im oberen Teil (oberhalb vom Stern *) beide Färbungen negativ sind. Der Übergang ist abrupt und die Anfärbung der Zellkerne sowie die des Tight Junction-assozierten Proteins hören auf etwa der gleichen Höhe auf. An der Stelle, an der in der IWS keine Tight Junction-assozierten Proteine mehr in der IWS vorhanden sind, ist die Färbung der ÄWS um so stärker. (Maßstab-Balken: 50 µm)

Zusammenfassend findet man eine starke Koexpression von Occludin, Protein ZO-1 und Claudin 1 und 4 (d.h. alle Proteine werden stark synthetisiert) in der Henle Schicht der IWS, der Companion Zellschicht der ÄWS in der Isthmus- und oberen zentralen Region und im Stratum granulosum des Infundibulums. Eine graduell schwächere Expression aller vier genannten Tight Junction-assoziierten Proteine (d.h. ein oder mehrere Proteine werden schwächer synthetisiert) wird in der zentralen Zellschicht der ÄWS der Isthmus-Region und der oberen zentralen Region und der Huxley Schicht der IWS gefunden (Abb. 7 links). Eine schwächere Koexpression, in der ein oder mehrere Proteine nur sehr schwach synthetisiert werden, wird im Haarschaft, in den zentralen Zellschichten der unteren zentralen Region, der Companion Zellschicht der ÄWS in der bulbären und suprabulbären Region und dem Stratum spinosum des Infundibulums beobachtet (Abb. 7 rechts).

Claudin 12 wird nur in der Companion Zellschicht der ÄWS und schwächer in der Henle und Huxley Schicht und der Kutikula des Haarschaftes mit ZO-1, Occludin und Claudin 1 und 4 gemeinsam synthetisiert (Abb. 7 rechts).

Claudin 17 wird gemeinsam mit Protein ZO-1, Occludin und Claudin 1 und 4 im Stratum granulosum des Infundibulums exprimiert (Tabelle II).

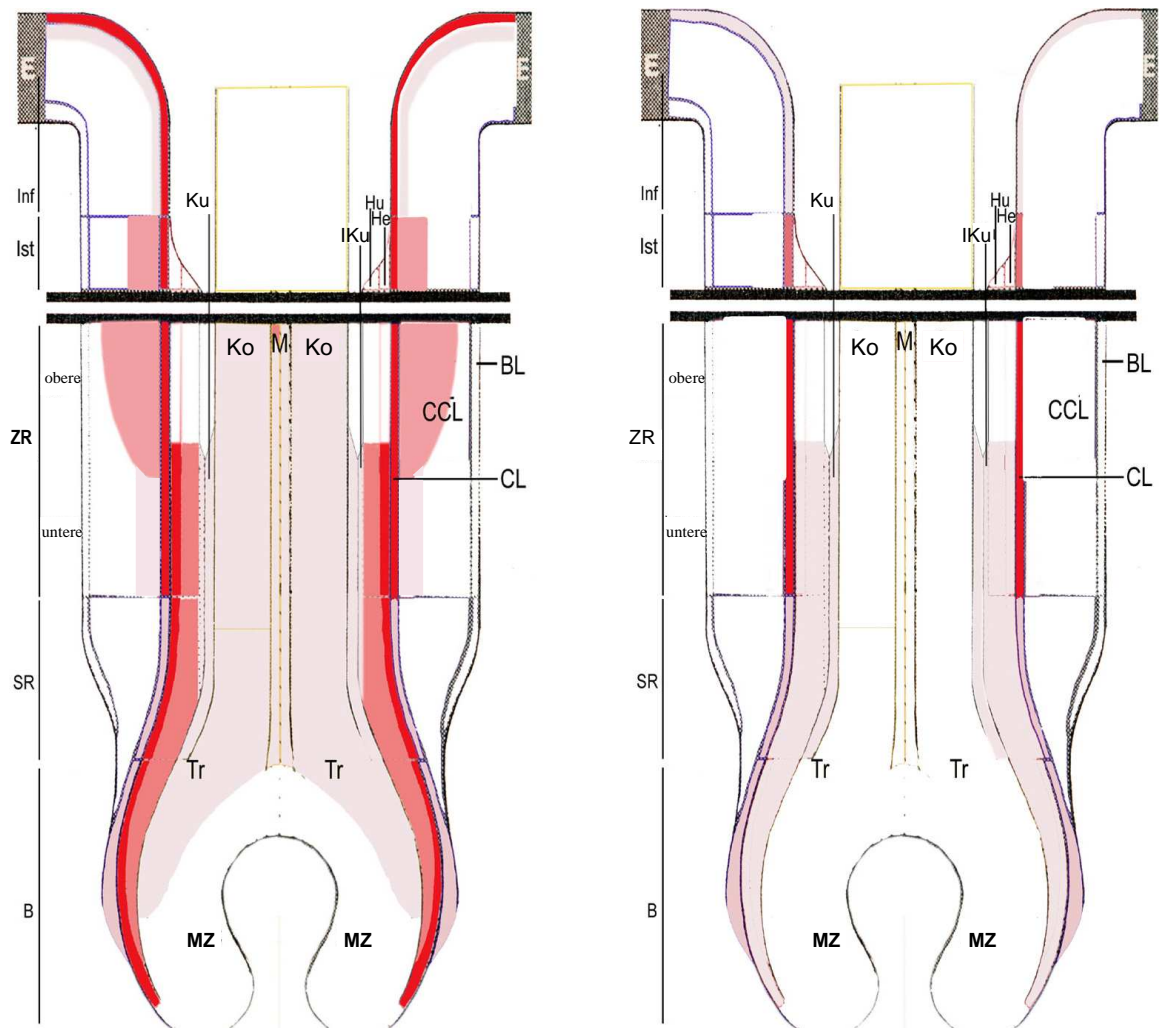


Abbildung: 7

Schematische Zeichnung des Haarfollikels, der die Koexpression unterschiedlicher Tight Junction-assoziierter Proteine zeigt: **links** Schichten positiv für Occludin, Protein ZO-1 und Claudin 1 und 4; **rechts** Schichten positiv für Occludin, Protein ZO-1 und Claudine 1, 4 und 12. Die Intensität der roten Farbe spiegelt die Stärke der Expression der Tight Junction-assozierten Proteine wider. Dunkelrot: alle genannten Proteine werden stark synthetisiert. Die Intensität der roten Farbe richtet sich jeweils nach der Expressionsstärke des am wenigsten synthetisierten Proteins in der jeweiligen Schicht.

Beispiel: linke Abbildung: in der Huxley Schicht ist Occludin nur mittel (bis niedrig) ausgeprägt, während die anderen Tight Junction-assozierten Proteine stark bis sehr stark ausgeprägt sind. Die Intensität der Färbung ist mittel.

(Abkürzungen siehe Tabelle II)

3.3 Lokalisation von Tight Junction-assoziierten Proteinen im Vergleich zu Markerproteinen für andere Zell-Zell-Verbindungen

3.3.1 Desmosomen

In der Epidermis können Tight Junctions, die durch eine Kolo­kalisierung von verschiedenen Tight Junction-assoziierten Proteinen, besonders Occludin, ZO-1 und mindestens einem Claudin, charakterisiert sind, in räumlicher Nähe zu Desmosomen gefunden werden (Pummi et al., 2001; Brandner et al., 2002; Furuse et al., 2002; Langbein et al., 2002a; Schlüter et al., 2004). Nun stellte sich die Frage nach der örtlichen Beziehung Tight Junction-artiger Strukturen mit Desmosomen im Haarfollikel.

Als Markerproteine für Desmosomen werden die desmosomalen Plaque-Proteine Desmoplakin I/II und das desmosomale Transmembranprotein Desmocollin 3 verwendet (Tab II).

Das Verteilungsmuster dieser Proteine im Haarfollikel ist sehr ähnlich: Im Haarschaft (in den Trichozyten, in der Kutikula des Haarschaftes, im Kortex und in der Medulla) werden sie schwach bis teilweise mittelstark exprimiert. In den Matrixzellen findet sich eine schwache Färbung für Desmoplakin I/II, eine sehr schwache für Desmocollin 3. Die Henle Schicht exprimiert die untersuchten desmosomalen Proteine – besonders an der Grenze zur Companionzellschicht – stark, während das Vorkommen von Desmoplakin I/II in der Huxley Schicht und in der Kutikula der IWS graduell schwächer, von Desmocollin 3 deutlich schwächer ist. In der ÄWS nimmt die Expression der untersuchten desmosomalen Proteine von der suprabulbären Region an bis hin zur infundibulären Region an Stärke zu, wobei im Infundibulum Desmocollin 3 mehr im Stratum basale und im unteren Stratum spinosum konzentriert ist, während Desmoplakin I/II leicht suprabasal betont gefunden wird.

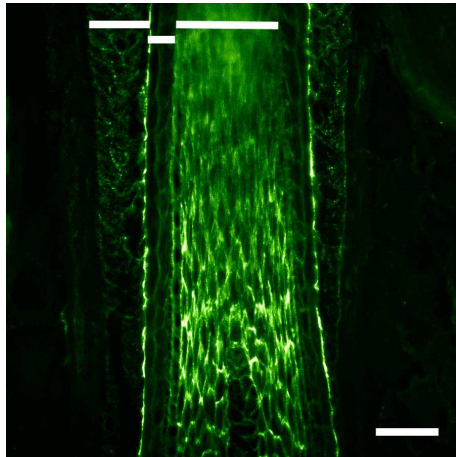


Abbildung: 8

Lokalisation von Desmocollin 3 (grün) in der suprabulbären Region des menschlichen Haarfollikels.
 Balken von links nach rechts: äußere Wurzelscheide, innere Wurzelscheide, Haarschaft
 (Maßstab-Balken: 50 µm)

Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen Occludin als Markerprotein für Tight Junctions und Desmoplakin I/II als Markerproteine für Desmosomen zeigen eine Koexistenz dieser beiden Proteine in verschiedenen Schichten, vor allem in der Companion Zellschicht und in manchen Abschnitten in den zentralen Zellschichten der ÄWS, im Stratum granulosum des Infundibulums, in der Henle, und in geringerem Maße in der Huxley Schicht der IWS, sowie in der Kutikula, der Medulla und in geringerem Maße in den Trichozyten des Haarschaftes (Abb. 9e).

Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 9d´) ist zu erkennen, dass Occludin und Desmoplakin I/II zwar in denselben Zellen koexprimiert werden, jedoch nicht kolokalisieren. Somit können wir keine Kolokalisation von Tight Junctions und Desmosomen im Haarfollikel nachweisen.

Interessanterweise gibt es eine Reihe von Zelllagen, in denen Desmoplakin I/II synthetisiert wird, in denen jedoch keine Tight Junction-artigen Verbindungen bestehen. Umgekehrt gibt es im Haarfollikel keine Zellschichten, in denen zwar Tight Junction-artige Verbindungen, aber keine Desmosomen bestehen.

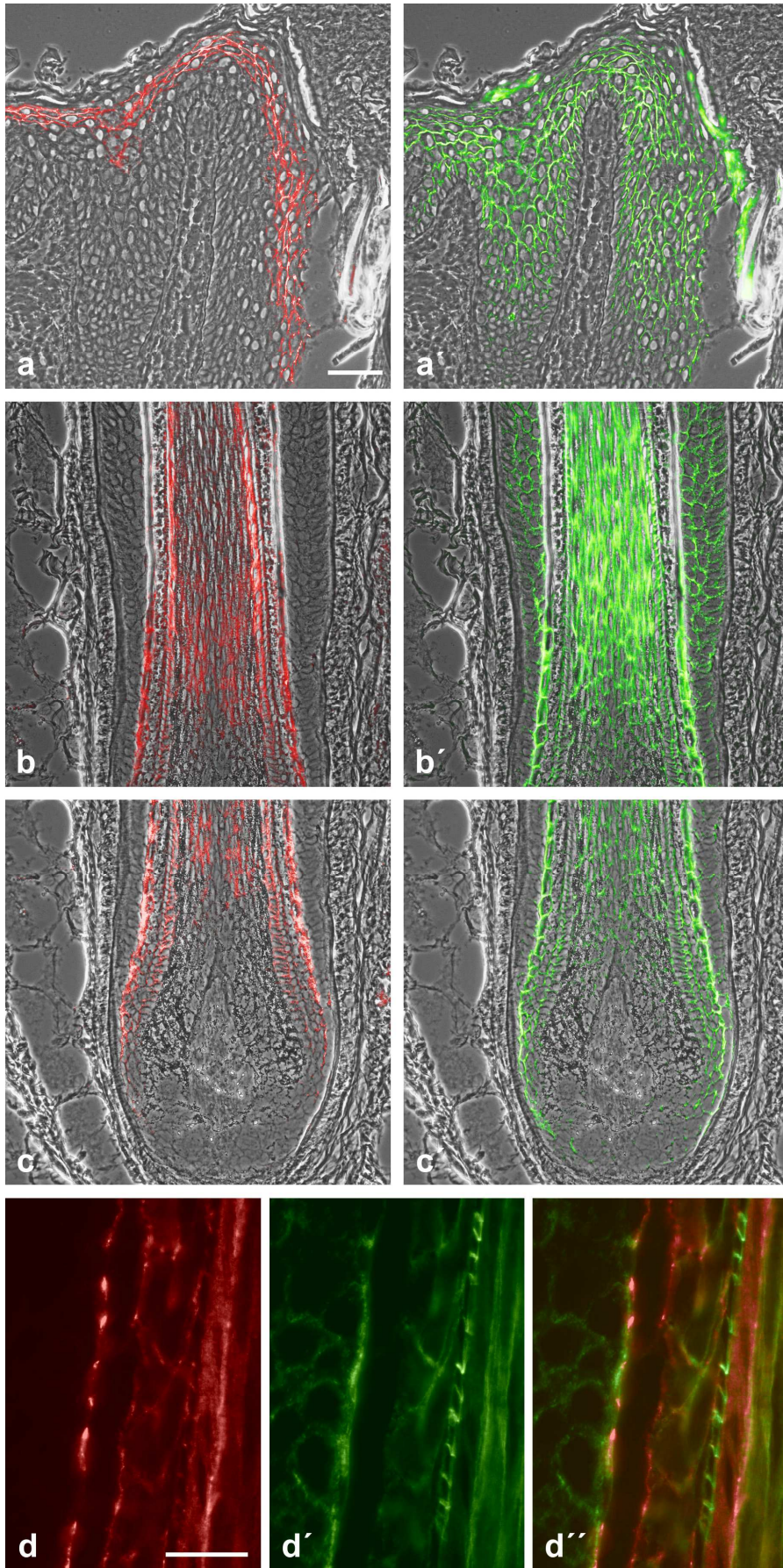


Abbildung: 9 a-d (Legende siehe folgende Seite)

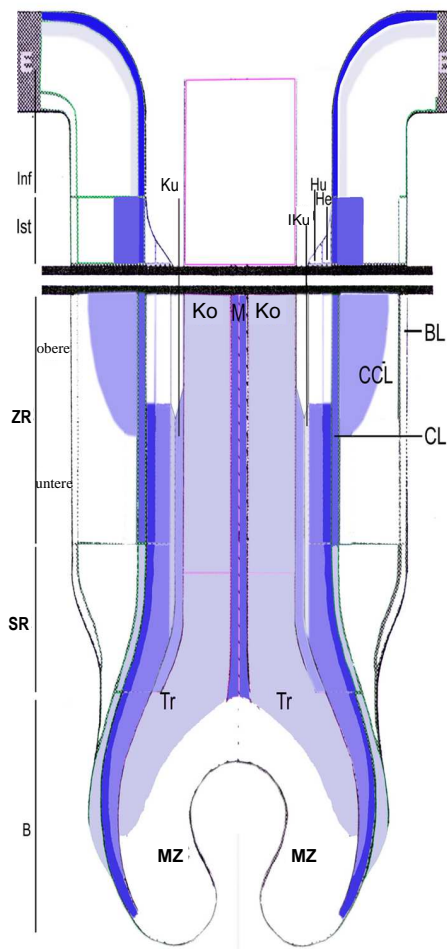


Abbildung: 9 a-e

(Abb. 9 a-d: vorherige Seite)

Vergleich der Lokalisation des Tight Junction-assoziierten Proteins Occludin (rot, **a- d**) und der desmolomalen Proteine Desmoplakin I/II (grün, **a'- d'**) im vertikalen Schnitt durch einen menschlichen anagenen Haarfollikel (mit Immunfluoreszenz-Doppelfärbung).

a, a' Infundibulum, **b, b'** suprabulbäre Region, **c, c'** bulbäre Region, **d-d''** stärkere Vergrößerung der suprabulbären Region, von links nach rechts äußere Wurzelscheide, Henle Schicht, Huxley Schicht, Kutikel der IWS, Kutikel des Haarschaftes, Kortex; (Maßstab-Balken für a-c, 50 µm, für d, 20 µm)

e schematische Zeichnung eines Haarfollikels zur Darstellung der Koexpression von Occludin und Desmoplakin I/II; die Intensität der blauen Farbe zeigt das Expressionslevel des schwächer synthetisierten Proteins in der jeweiligen Schicht. (**Abkürzungen siehe Tabelle II**)

Abbildung: 9 e

3.3.2 Adhärenzverbindungen

In einfachen Epithelien und Endothelien werden Tight Junctions in sehr enger Beziehung zu Adhärenzverbindungen gefunden. Somit stellte sich die Frage, ob auch im Haarfollikel eine ähnlich enge Beziehung der beiden Zell-Zell-Verbindungen besteht. Deswegen wurden Doppelfärbungen mit Tight Junction-assoziierten Proteinen und mit Markerproteinen für Adhärenzverbindungen durchgeführt.

β -Catenin und E-Cadherin wurden als Vertreter der Adhärenzverbindungsproteine untersucht. Während β -Catenin ein Plaque Protein ist, handelt es sich bei E-Cadherin um ein Transmembranprotein. β -Catenin wird in verschiedenen Geweben in dualer Lokalisation gefunden, d.h. sowohl in den Adhärenzverbindungen als auch im Zellkern, und ist in die Signaltransduktion der Zellen involviert. Im Folgenden wird generell nur die Lokalisation in den Adhärenzverbindungen beschrieben.

Das Verteilungsmuster und die Stärke der Expression der beiden Proteine ähneln sich. Beide Adhärenzverbindungs-Proteine werden im Haarschaft schwach bis mittelstark synthetisiert. Während β -Catenin in den Matrixzellen schwach nachgewiesen werden kann, ist E-Cadherin in diesen Zellen nicht vorhanden. In der IWS werden beide Proteine in der Henle Schicht sehr stark und in der Huxley Schicht und der Kutikula der IWS intermediär synthetisiert. Während β -Catenin und E-Cadherin in der suprabulbären Region der ÄWS noch schwach exprimiert werden, nimmt ihre Expression in der zentralen Region über die Isthmus-Region bis in das Infundibulum zu. Die Proteine werden in allen Schichten der ÄWS beobachtet.

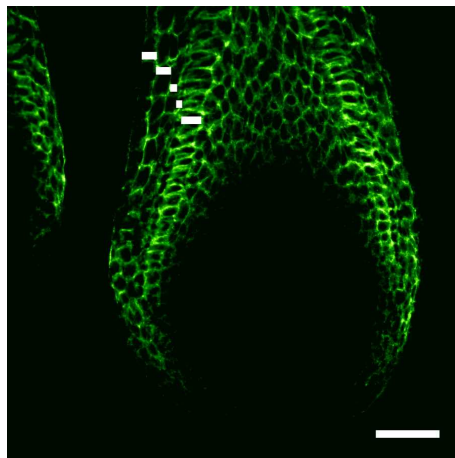


Abbildung: 10

Lokalisation von E-Cadherin im menschlichen Haarfollikel (Bulbus). Balken von links nach rechts: äußere Wurzelscheide, Henle Schicht, Huxley Schicht, Kutikula der IWS, Kutikula des Haarschaftes (Maßstab-Balken: 50 μ m)

Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit Occludin und β -Catenin zeigen folgende Ergebnisse (Abb. 11): Es findet sich eine starke Koexpression der beiden Proteine in der Henle Schicht der IWS sowie der Companion Zellschicht der Isthmus-Region der ÄWS und im Stratum granulosum des Infundibulums. Eine graduell schwächere Koexpression ist in der zentralen Zellschicht der ÄWS der Isthmus-Region, der Huxley Schicht der IWS, der Kutikula des Haarschaftes und in den Zellen der Medulla zu beobachten. Sowohl in den Trichozyten als auch in der Kutikula der IWS, der Companion Zellschicht der bulbären und suprabulbären Region und in der zentralen Zellschicht der oberen zentralen Region der ÄWS gibt es eine schwächere Koexpression (Abb. 11e). Alle Zelltypen, die Occludin synthetisieren, bilden auch β -Catenin. Hingegen gibt es verschiedene Zelltypen die ausschließlich β -Catenin bilden.

Unter hoher lichtmikroskopischer Vergrößerung ist zu sehen, dass die beiden Proteine in manchen Zelllagen, z.B. in der Henle Schicht der IWS, nicht nur in derselben Zelle kosynthetisiert werden, sondern auch auf lichtmikroskopischer Ebene kolokalisieren (Abb. 11d-d'', Pfeile).

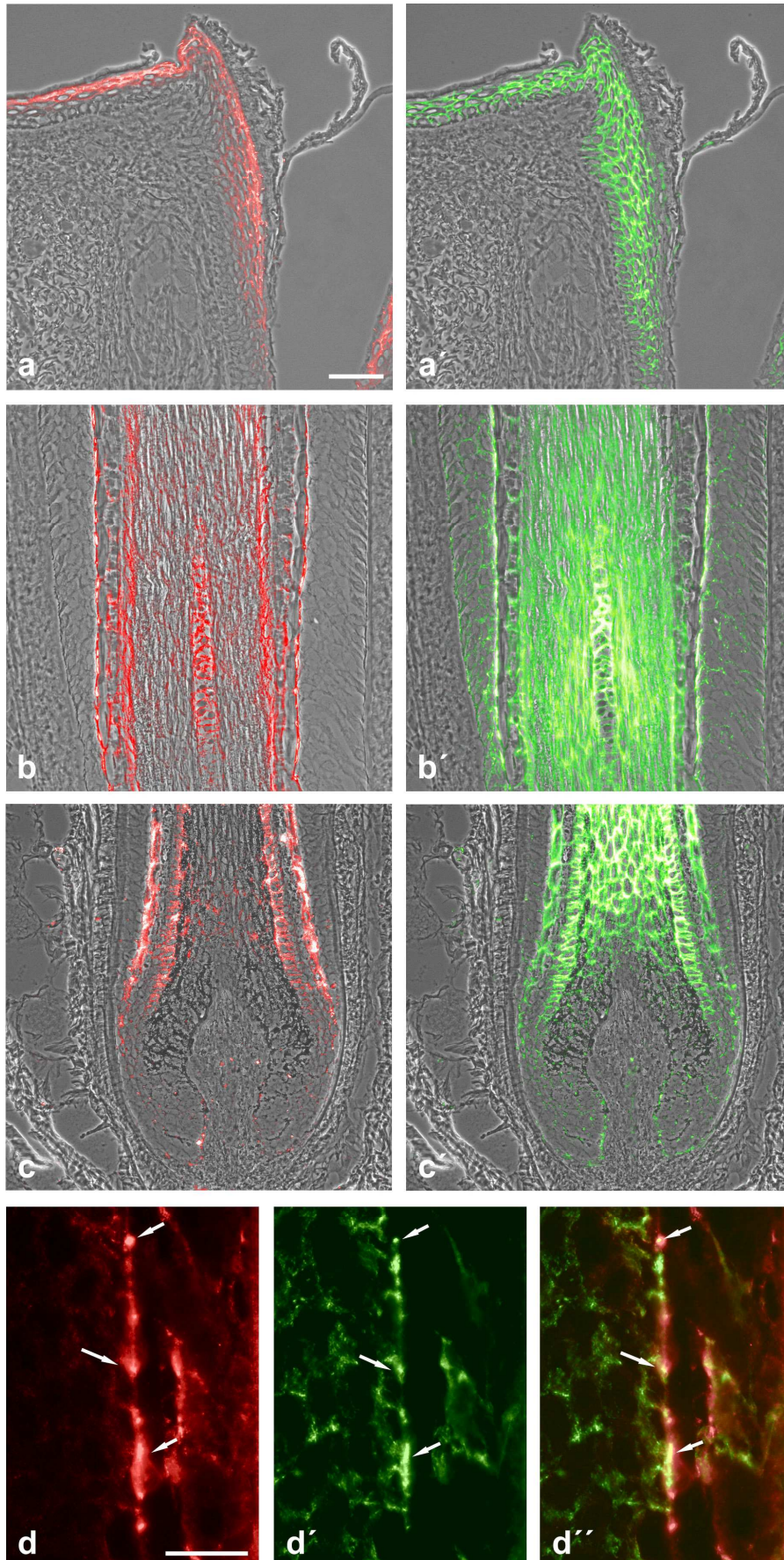


Abbildung: 11 a-d (Legende siehe folgende Seite)

4 Diskussion

Tight Junctions sind abschließende Zell-Zell-Verbindungen, deren Vorhandensein in der Epidermis von Mensch und anderen Säugetieren in den letzten Jahren nachgewiesen worden ist und deren Bedeutung wir gerade erst anfangen zu verstehen. Es gibt verschiedene Hinweise, dass Tight Junctions eine wichtige Rolle bei der Barrierefunktion der Haut spielen (Morita et al., 1998; Pummi et al., 2001; Yoshida et al., 2001; Brandner et al., 2002; Furuse et al., 2002; Langbein et al., 2002a; Malminen et al., 2003; Leyvraz et al., 2005; Smalley et al., 2005; Tunggal et al., 2005 siehe auch Einleitung). Für die Barrierefunktion der Haut sind neben der interfollikulären Epidermis auch die Hautanhangsgebilde, d.h. Haare, Drüsen und Nägel verantwortlich. Für eine Bedeutung der Tight Junctions in der Barrierefunktion der Haut ist es somit wichtig, dass diese auch in den Hautanhangsgebilden vorhanden sind und eine gewisse Kontinuität mit der interfollikulären Epidermis zeigen. Aus diesem Grund wurde in dieser Doktorarbeit die Verteilung von Tight Junction-assoziierten Proteinen – auch im Hinblick auf andere Zell-Zell-Verbindungen – in adulten menschlichen Haarfollikeln untersucht.

Mit Hilfe der RT-PCR-Technik konnte das Vorkommen der Tight Junction-assoziierten Proteine Occludin, Protein ZO-1 und Claudine 1, 4, 8, 10, 11, 12 und 16 in epilierten menschlichen anagenen Haarfollikeln nachgewiesen werden. Der Nachweis so vieler verschiedener Tight Junction-assoziiierter Proteine in Haarfollikeln stützt vorherige Aussagen, dass ein Tight Junction System in den meisten, wenn nicht sogar in allen ein- und mehrschichtigen Epithelien vorhanden ist (Brandner et al., 2002; Langbein et al., 2002a; Übersichtsartikel: Brandner et al., 2006). Anhand von immunhistochemischen Färbungen konnte die Lokalisation der Tight Junction-assoziierten Proteine festgestellt werden. Das Verteilungsmuster der verschiedenen untersuchten Tight Junction-assoziierten Proteine war in den unterschiedlichen Schichten des Haarfollikels heterogen. Generell kann man aber sagen, dass eine Kolokalisation von mehreren Tight Junction-assoziierten Proteinen immer in Bereichen gefunden wird, die an die Umwelt bzw. an verhornte Schichten grenzen, d.h. im Stratum granulosum des Infundibulums und in der Companion Zellschicht der Isthmus-Region sowie der oberen zentralen Region. Des Weiteren wurde eine Kolokalisation an der Grenzschicht zwischen innerer

und äußerer Wurzelscheide (IWS und ÄWS) gefunden, d.h. dort, wo die Companion Zellschicht an die Henle Schicht grenzt.

Es wurden jedoch auch Zellschichten identifiziert, die nur ein Tight Junction-assoziiertes Protein enthielten (z.B. Claudin 1 in den basalen Zellen des Infundibulums). Andere waren für zwei (Basalzellschicht von der suprabulbären Region bis zur Isthmus-Region und zentrale Zellschicht der suprabulbären Region) oder vier (z.B. zentrale Zellschicht der zentralen Region, der Isthmus-Region und des Infundibulums) Tight Junction-assoziierte Proteine positiv. Eine Heterogenität der Expression der verschiedenen Tight Junction-assoziierten Proteine in verschiedenen Schichten mehrschichtiger Epithelien konnte bereits in der interfollikulären Epidermis von Mensch, Maus, Ratte sowie Rind (dort auch in Gingiva, Zunge, Ösophagus, Exozervix, Vagina und Urothel) gezeigt werden (Morita et al., 1998; Pummi et al., 2001; Brandner et al., 2002; Langbein et al., 2002a). Des Weiteren konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die Expression von Tight Junction-assoziierten Molekülen in verschiedenen Epithelien des Körpers unterschiedlich ist (Rahner et al., 2001). Turksen und Troy (2004, Übersichtsartikel) geben einen guten Überblick über das unterschiedliche Vorkommen von Claudinen in Tight Junctions.

Tight Junction-assoziierte Proteine können klassische Tight Junctions („kissing points“, siehe Einleitung) bilden, die sich, je nach ihrer Zusammensetzung, v.a. in Bezug auf Claudine, in der Selektivität hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit für Moleküle unterscheiden (Colegio et al., 2003). Sie können aber auch, v.a. wenn nicht mehrere Tight Junction-assoziierte Proteine kolokalisiert sind, andere, noch wenig beschriebene Strukturen aufbauen (Rahner et al., 2001; Langbein et al., 2002a; Ruffer et al., 2004) oder im Falle von ZO-1, mit Adhärenzverbindungen assoziiert sein (Itoh et al., 1991, 1993; Howarth et al., 1992; Tsukita et al., 1992; Rajasekaran et al., 1996; Smalley et al., 2005).

4.1 Tight Junctions an den Grenzflächen zur Außenwelt

In der interfollikulären Epidermis konnten klassische Tight Junction Strukturen („kissing points“) im Stratum granulosum nachgewiesen werden, das direkt an die verhornte Schicht des Stratum corneum angrenzt und somit die äußerste lebende Schicht der Epidermis darstellt. Das Stratum granulosum zeichnet sich durch eine Koexpression aller bisher in der Epidermis identifizierten Tight Junction-assoziierten Proteine aus

(Brandner et al., 2002; Langbein et al., 2002a). Eine Koexpression aller untersuchten Tight Junction-assoziierten Proteine, die auch in der interfollikulären Epidermis identifiziert wurden, konnte in dieser Arbeit in der Companionzellschicht der zentralen- und Isthmus-Region des Haarfollikels (Abb. 7) nachgewiesen werden. Eine Koexpression von Protein ZO-1, Occludin, Claudin 1 und 4 findet man im Stratum granulosum des Infundibulums, in der Companion Zellschicht der zentralen- und Isthmus-Region, in der zentralen Zellschicht der oberen zentralen- und Isthmus-Region, in der Henle und Huxley Schicht (Abb. 7). Stratum granulosum und Companion Zellschicht grenzen an keratinisierte Zellen, entweder des Stratum corneums in der Isthmus-Region und des Infundibulums oder der Henle und Huxley Schichten im oberen zentralen Haarschaft. Diese Zellschichten sind die ersten „lebenden“ Kontaktflächen für Substanzen, die von außen über den Haarfollikel in den Körper penetrieren. Die Tight Junction-assoziierten Proteine werden möglicherweise gerade dort – an der Körpergrenze – als Träger einer wichtigen Barrierefunktion verstärkt exprimiert.

Es gibt verschiedene Wege, wie Substanzen die Hautbarriere durchdringen können: die interfollikuläre Penetration, die Penetration durch Mikroläsionen des Stratum corneum, die Penetration durch Schweißdrüsen und die follikuläre Penetration (Behl et al., 1985).

Verschiedene Arbeiten konnten die Bedeutung der follikulären Penetration für die topische Aufnahme von Substanzen zeigen (Behl et al., 1985; Bidmon et al., 1990; Tur et al., 1991; Hueber et al., 1994; Tenjarla et al., 1999; als Übersicht siehe Lauer et al., 1995; Schäfer and Lademann, 2001). Behl und Kollegen (1985) haben gezeigt, dass Hautoberflächen ohne Haarfollikel im Vergleich zu Hautoberflächen mit Haarfollikeln eine viel kleinere Permeabilität für Substanzen besitzen. Sowohl die nachgewachsene, follikellose Haut von Ratten nach einer Verbrennung zweiten Grades im Vergleich zur unversehrten Haut, als auch die follikellose Haut von neugeborenen Ratten im Vergleich mit der follikulären Haut von fünf Tage alten Ratten haben eine geringere Permeabilität für in den Körper eindringende Substanzen. Auch Hueber und Kollegen (1994) haben die perkutane Absorption von Estradiol und Progesteron in normaler und follikelfreier Haut der Ratte in vivo untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Einheit aus Haarfollikel und Talgdrüsen eine signifikante Rolle bei der perkutanen Medikamentenaufnahme und der anschließenden systemischen Zirkulation spielen.

Bidmon und Kollegen (1990) haben die Verteilung und Penetration von auf Rattenhaut topisch appliziertem Estradiol anhand von hoch auflösender Autoradiographie studiert. Zwei unterschiedliche Penetrationswege in die Dermis sind erkannt worden, einerseits durch das Stratum corneum der Epidermis und andererseits durch den Haarfollikel. Tur und Kollegen (1991) haben die perkutane Penetration von Methyl-Nicotinat, einem Vasodilatator, untersucht. Die Penetration ist anhand einer Laser Doppler Flussmessung an Stirn (höchste Penetration bei hoher Follikeldichte), Unterarm (mittlere Penetration; mittlere Follikeldichte) und Handfläche (geringste Penetration; keine Haarfollikel vorhanden) gemessen worden. Dabei ist eine Korrelation zwischen der Haarfollikeldichte und der Höhe der Penetration festgestellt worden. Untersuchungen von Otberg und Kollegen (2003) haben gezeigt, dass in Abhängigkeit von den Körperregionen die Anzahl der Follikel, die Fläche der follikulären Epithelauskleidung, sowie das follikuläre Volumen sehr unterschiedlich sind. Unter Berücksichtigung von Follikeldichte und Größe ergibt sich für die Haut an Stirn und Wade ein potenzielles follikuläres Reservoir für topisch applizierte Substanzen, das mit dem des Stratum corneum vergleichbar ist (Otberg et al., 2003). Lademann und Mitarbeiter (2001) haben eine Korrelation der Penetration topisch applizierter Substanzen mit der Talgproduktion und der Wachstumsaktivität des Haarfollikels gezeigt.

Um die Medikamentenaufnahme zu verbessern, sind auch Trägerstoffe bzw. „Enhancer“ wichtig, die die Penetration von Substanzen erhöhen können. Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Substanzen von ihren physiochemischen Eigenschaften und denen ihrer Vehikel abhängig ist (MacKee et al., 1945; Fabian and Touitou 1991; Lademann et al., 2001; Grams and Bouwstra, 2002). Der genaue Mechanismus für die Selektivität der topischen Aufnahme und die dabei involvierten Zellen, Strukturen und Moleküle sind bisher allerdings noch nicht identifiziert worden. Tight Junctions wären dabei mögliche Kandidaten.

Es konnte sowohl in simplen Epithelien, als auch in Endothelien gezeigt werden, dass Tight Junctions einen wichtigen Beitrag zur Barrierefunktion dieser Schichten leisten. Zusätzlich haben sich Hinweise gemehrt, dass Tight Junctions in der interfollikulären Epidermis eine wichtige Rolle bei der Barrierefunktion spielen. Deshalb kann man vermuten, dass Tight Junctions bzw. Tight Junction-assoziierte Proteine auch im Haarfollikel in diese Funktion involviert sein könnten. Dort könnten sie an der Selektion beteiligt sein, die beeinflusst, welche Substanzen parazellulär durch die Schichten des Haarfollikels in den Körper penetrieren. Außerdem könnte auch die Geschwindigkeit

der Penetration und die Eindringtiefe für die jeweiligen Substanzen gesteuert werden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Ethanol, von dem bekannt ist, dass es die Penetration über die Haarfollikel erhöhen kann (Montagna, 1954; Grams und Bouwstra, 2002), im gastrointestinalen Epithel die durch Tight Junctions gebildete Penetrationsbarriere zerstören kann (Ma et al., 1999).

In der Isthmus-Region, einem Bereich, in dem die Zellen der Henle und Huxley Schichten bereits abgestorben sind, findet man eine Synthese der Tight Junction-assoziierten Proteine Occludin und Claudin 4 nicht mehr nur in der Companion Zellschicht, sondern auch in den zentralen Zellschichten der ÄWS. Auch die Intensität der Expression von ZO-1 ist in diesen Schichten gesteigert. Dies erinnert an die verbreiterte Synthese von Tight Junction-assoziierten Proteinen bei Hautveränderungen, die mit einer gestörten Barrierefunktion des Stratum corneum einhergehen, z.B. Psoriasis (Yoshida et al., 2001; Pummi et al., 2001; Brandner et al., 2006) und während der Wundheilung (Brandner et al., 2002; Malminen et al., 2003). Auch bei Schleimhäuten (Langbein et al., 2002a), die ebenfalls über keine ausgeprägte Barriere durch ein verhorntes Epithel verfügen, wird eine verbreiterte Tight Junction Bildung beobachtet. Interessanterweise sind die keratinisierten Henle und Huxley Zellen der Isthmus-Region brüchig, klein und bilden im Gegensatz zum Stratum corneum nur eine unvollständige Barriere (Vogt und Blume-Peytavi, 2003). Somit scheint die Barrierefunktion der Tight Junctions vor allem in Bereichen mit unvollständiger Barriere durch Keratinisierung eine wichtige Rolle zu spielen (Übersichtsartikel: Brandner et al., 2006).

Der Haarfollikel besitzt ein großes Potential für eine topische Behandlung, da er weit in die Dermis hineinreicht und somit eine sehr tiefe Penetration und Absorption von Substanzen erlaubt. Zusätzlich sind, wie bereits oben erwähnt, die Hornzellen im Gegensatz zu der keratinisierten Epidermis in den tiefer liegenden Bereichen des Follikelkanals brüchig und klein und bilden nur eine inkomplette Barriere. Deshalb könnte transfollikuläre Medikamentenaufnahme wichtig für die Behandlung von Krankheiten der Haut und des Haarfollikels sein und gerade auf diesem Wege den hepatischen Metabolismus umgehen und die systemische Toxizität mindern. Um gezielte Medikamentengaben über den Haarfollikel besser verstehen und erreichen zu

können, ist es eine wichtige Aufgabe für die Zukunft, die Barrierefunktion des Haarfollikels genauer zu erforschen.

4.2 Tight Junctions an der Grenze zwischen äußerer und innerer Wurzelscheide

Eine deutliche Koexpression verschiedener Tight Junction-assoziiierter Proteine wurde ebenfalls an der Grenze zwischen der ÄWS und IWS – der Companion Zellschicht der ÄWS und der Henle Schicht der IWS – in der unteren zentralen und suprabulbären Region gefunden. Die Companion Zellschicht ist eine Schicht, die sich durch besondere Eigenschaften von den angrenzenden Zellen der ÄWS unterscheidet (Orwin, 1971; Ito, 1986, 1989; Miyauchi et al., 1990; Tanaka et al., 1998; Winter et al., 1998; Hallman et al., 2002). Miyauchi und Mitarbeiter (1990) haben in der Companion Zellschicht im Vergleich zur restlichen ÄWS ein starkes Vorkommen von Ki-67, einem Proliferationsmarker entdeckt. Ito und Mitarbeiter (1986) zeigten, dass sich die Keratinisierung dieser Schicht von der der restlichen ÄWS unterscheidet. Auch das humane Typ II Zytokeratin K6hf wird nur in der Companion Zellschicht exprimiert (Winter et al., 1998). Des Weiteren haben Winter und Mitarbeiter (1998) gezeigt, dass K16 und K17 hauptsächlich in dieser Schicht vorkommen. Auf die Einzigartigkeit dieser Schicht weisen auch Hallman und Mitarbeiter (2002) hin, die die Expression von MAP-2 (microtubule associated protein-2) fast ausschließlich in der Companion Zellschicht gefunden haben. Tanaka und Mitarbeiter (1998) zeigten, dass sich diese Schicht sogar in der Art des Zelltodes (Apoptose) von den anderen Schichten unterscheidet. Der Companion Zellschicht wird eine große Bedeutung bei der Keratinisierung der Henle Schicht beigemessen.

Es wurde beschrieben, dass die Companion Zellschicht und die Henle Schicht durch zahlreiche Desmosomen in engem Kontakt zueinander stehen (Ito, 1986; Langbein et al., 2002b). Sogar bei der Epilation bleibt die feste Verbindung zwischen Companion Zellschicht und Henle Schicht bestehen (Langbein et al., 2002b). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch Tight Junctions dazu beitragen, diesen festen und engen Kontakt zu bilden.

Dieses komplexe Verbindungssystem in Haarfollikeln könnte eine wichtige Funktion erfüllen, indem es der Haut, die im täglichen Leben mechanisch beansprucht und durch UV-Licht beeinträchtigt wird, zusätzliche architektonische Stabilität gibt.

Es ist noch wenig über die Verankerung des Haarschaftes bekannt. Bei Desmoglein 3 Knock-out Mäusen mit zusätzlicher Inaktivierung von Desmoglein 1 kommt es durch eine Trennung zwischen IWS und ÄWS zum Verlust von anagenem Haar (Hanakawa et al., 2004). Bei Mäusen, bei denen E-Cadherin in der Epidermis nach der Geburt inaktiviert wird, kommt es zum Verlust von Adhärenzverbindungen und veränderter, epidermaler Differenzierung. Während hier die desmosomalen Strukturen erhalten bleiben, gehen die Haarfollikel ab dem 30. Tag zunehmend, besonders auf dem Rücken, verloren (Young et al., 2003). Im Schwanzhaar, welches noch E-Cadherin exprimiert, gibt es keine Veränderung im Haarkleid. Unter anderem scheint eine veränderte Zellproliferation – es findet eine Reduktion der Proliferation der Matrixzellen statt – dem Haarausfall zugrunde zu liegen. Somit scheint das kontinuierliche Durchlaufen der Zyklen des Haarfollikels von E-Cadherin abhängig zu sein. Bei Hauttransplantaten von Claudin 1 Knock-out Mäusen (Claudin 1^{-/-}) auf gesunde Mäuse finden sich viel weniger und kürzere Haare als bei Hauttransplantaten von normalen (Claudin 1^{+/+}) Mäusen (Furuse et al., 2002)

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, weiter zu forschen, wie Tight Junctions bzw. deren Proteine auf den Zusammenhalt zwischen ÄWS und IWS wirken und welche Auswirkungen sie auf den gesamten Haarfollikel haben.

4.3 Räumliche Beziehung der Tight Junctions zu anderen Zell-Zell-Verbindungen im Haarfollikel

In der Epidermis werden Tight Junctions in der Nähe von Desmosomen gefunden, allerdings kolokalisieren die Tight Junction-assoziierten Proteine und desmosomalen Proteine meist nicht (Pummi et al., 2001; Brandner et al., 2002; Furuse et al., 2002; Langbein et al., 2002a). Dies können unsere Untersuchungen auch für den Haarfollikel bestätigen. Generell ist festzustellen, dass alle Zellen, die Tight Junction-assoziierte Strukturen besitzen, auch Desmosomen enthalten. Im Gegensatz dazu gibt es Zelltypen mit Desmosomen, aber ohne Tight Junctions. Diese Resultate stimmen gut mit den Ergebnissen von Pummi und Mitarbeitern (2001) überein, die an Keratinozyten demonstrierten, dass die Bildung von Tight Junctions der Bildung von Desmosomen folgt und vielleicht sogar davon abhängig ist.

Es existieren eine Reihe von Zellschichten, die sowohl Tight Junction-assoziierte Proteine als auch Adhärenz-Verbindungsproteine synthetisieren, z.B. die Schichten der

IWS, der Companion Zellschicht der ÄWS und das Stratum granulosum des Infundibulums. Auf lichtmikroskopischer Ebene scheint es in manchen Membranbereichen (z.B. an der Grenze zwischen der IWS und ÄWS) Kolokalisationen von Tight Junction-assoziierten Proteinen und Adhärenz-Verbindungsproteinen zu geben. Dieser Befund ist mit den Ergebnissen in epidermalen Zellen von Pummi und Mitarbeitern (2001) vergleichbar. An Epidermis-spezifischen E-Cadherin Knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Adhärenzverbindungsprotein E-Cadherin auf die korrekte Zusammensetzung und Funktion der Tight Junctions Einfluss nimmt. E-Cadherin Knock-out Mäuse sterben 7 bis 12 Stunden nach der Geburt aufgrund eines ausgeprägten transepidermalen Wasserverlustes (Tunggal et al., 2005). Eine detaillierte Untersuchung der Mäuse zeigte eine veränderte Zusammensetzung von Tight Junctions. Claudin 1 fehlte im Stratum granulosum, Claudin 4 und Protein ZO-1 waren in der Plasmamembran der oberen Epidermisschichten punktiert lokalisiert. Da die Ultrastruktur der Zellkontakte nicht verändert scheint, beeinflusst E-Cadherin vermutlich die Regulation der Tight Junctions, vor allem über den Par3/aPKC/Par6-Komplex. Die Bildung der Desmosomen ist hingegen in vivo nicht von E-Cadherin abhängig (Young et al., 2003; Tunggal et al., 2005).

Auch in simplen Epithelzellen konnte eine enge Wechselwirkung zwischen Adhärenzverbindungsproteinen und Tight Junction-assoziierten Proteinen gezeigt werden. In MDCK-Zellen wurde beobachtet, dass der Aufbau der Tight Junctions mit einer Bildung von vorläufigen Zell-Zell-Verbindungen, die Adhärenzverbindungs- und Tight Junction Komponenten enthalten, beginnt (Als Überblick siehe Matter und Balda, 2003).

Es könnte sich somit bei den von uns beobachteten Kolokalisationen auf lichtmikroskopischer Ebene um diese vorläufigen Zell-Zell-Verbindungen handeln. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich nicht um eine echte Kolokalisation handelt, sondern dass die verschiedenen Zellverbindungen in sehr enger Nachbarschaft lokalisiert sind. Desweiteren könnte es sich auch um neue, noch nicht beschriebene Strukturen handeln. Dies muss in Zukunft ultrastrukturell geklärt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Tight Junction Strukturen im Haarfollikel an der Grenze zur Außenwelt gefunden werden und somit für in den Körper penetrierenden Substanzen die erste „lebende“ Barriere bilden. Tight Junction Strukturen bilden somit

eine kontinuierliche Barriere sowohl in der Epidermis als auch im Haarfollikel. Darüberhinaus tragen sie zum engen Kontakt zwischen ÄWS und IWS bei.

5 Zusammenfassung

Tight Junctions sind barriereformende interzelluläre Verbindungen, die selektiv Zellen versiegeln und den parazellulären Transport kontrollieren. Sie sind schon lange in einschichtigen Epithelien bekannt, in mehrschichtigen Epithelien, wie der Epidermis wurden sie erst kürzlich beschrieben.

Der Haarfollikel, ein Hautanhangsgebilde, besteht aus vielen epithelialen Schichten, die zum Teil in die Epidermis übergehen.

Unsere Hypothese war, dass, wenn Tight Junctions eine Rolle bei der Barrierefunktion der Haut spielen, diese kontinuierlich sein müssen, d.h. sowohl in der Epidermis als auch in den Hautanhangsgebilden vorhanden sein und ineinander übergehen müssen.

Deshalb wurden die Expression und Lokalisation von Tight Junction-assoziierten Proteinen in humanen, anagenen Haarfollikeln untersucht. Des Weiteren wurde die Lokalisation mit Markerproteinen anderer Zell-Zell-Verbindungen, d.h. Adhärenzverbindungen und Desmosomen, verglichen.

Mit Hilfe der RT-PCR Technik konnte aus epilierten Haarfollikeln die mRNA für die Tight Junction-assoziierten Proteine Occludin, Protein ZO-1, Claudin 1, 4, 7, 8, 10, 11, 12 und 16 nachgewiesen werden. Anhand der Immunfluoreszenzmikroskopie konnten die Tight Junction-assoziierten Proteine Occludin, Protein ZO-1, Claudin 1, 4, 12 und 17 lokalisiert werden. Ihre Verteilung ist bezüglich der unterschiedlichen Schichten und der unterschiedlichen Proteine heterogen.

Es konnten potentielle Tight Junction Strukturen – eine Koexpression mehrerer Tight Junction-assoziiierter Proteine – in unterschiedlichen Schichten festgestellt werden:

In der Companion Zellschicht der oberen zentralen und Isthmus-Region und im Stratum granulosum des Infundibulums – das sind die ersten „lebenden Kontaktstellen“ für Substanzen, die über den parazellulären Weg über den Haarfollikel in den Körper penetrieren, sowie in der Henle (und Huxley) Schicht, besonders an der Grenze zur Companion Zellschicht, d.h. an der Grenze zwischen innerer und äußerer Wurzelscheide. Tight Junctions tragen vermutlich zum engen Kontakt zwischen den Wurzelscheiden bei. Man kann somit vermuten, dass Tight Junctions eine Rolle bei der architektonischen Stabilität der Haarfollikel und ihrer Barrierefunktion spielen. Tight Junctions bilden eine kontinuierliche Barriere sowohl in der Epidermis als auch in den Hautanhangsgebilden.

Tight Junction-assoziierte Proteine befinden sich im Haarfollikel (vergleichbar zur Epidermis) in enger räumlicher Nähe zu Desmosomen und scheinen zumindest teilweise mit Adhärenzverbindungsproteinen kolokalisiert zu sein. Die Mikroarchitektur der Zellverbindungen ist im Haarfollikel ähnlich wie die der Epidermis.

Die morphologische und biologische Bedeutung dieser Entdeckung und die mögliche Bedeutung der Tight Junctions in Haarfollikeln u.a. bezüglich der follikulären Penetration werden diskutiert.

6 Literaturverzeichnis

Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoenberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M: Claudin-2 Expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115:4969-4976, 2002

Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M; Yonemura S, Furuse M, Tsukita S: Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol (United States)*, 133(1) p43-7, 1996

Aurand-Lions MA, Duncan L, Ballestrem C, and Imhof BA: JAM-2, a novel immunoglobulin super-family molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 276: 2733–2741, 2000

Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E: Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 275, 20520-20526, 2000

Behl CR, Bellatone NH, Flynn GL: Influence of age on percutaneous absorption of substances; in Bronaugh RL, Maibach HI (eds): *Percutaneous Absorption*, Dekker, 1985

Bertolino AP, Lynn M, Klein MD, Freedberg IM: Biology of Hair Follicles. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF: *Dermatology in general Medicine*. McGraw-Hill, Inc, New York, 4th ed, Vol. 1, p 290, 1993

Bidmon HJ, Pitts JD, Solomon HF, Bondi JV, Stumpf WE: Estradiol distribution and penetration in rat skin after topical application, studied by high resolution autoradiography. *Histochemistry* 95:43-54, 1990

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

Brandner JM, Kief S, Wladykowski E, Houdek P, Moll I: Tight Junction Proteins in the Skin. *Skin pharmacol physiol* in press

Breathnach AS: An atlas of the ultrastructure of human skin. *J.&A. Churchill*, London

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Brecht DS: Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell (United States)* 84(5) p757-67, 1996

Brown A, Frammer K, MacDonald L, Kalsheker N, Pritchard D, Haslett C, Lamb J, Sallenave JM: House dust mite Der p 1 downregulates defenses of the lung by inactivating elastase inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol (United States)*, 29(3 Pt 1) p381-9, 2003

Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones J: Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* 333:272-276, 1988

Citi S, Sabanay H, Kendrick-Jones J, Geiger B: Cingulin: characterization and localization. *J Cell Sci* 93:107-122, 1989

Cohen CJ, Shieh JT, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh JT and Bergelson JM: The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15191-15196, 2001

Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM: Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C142-147, 2002

Colegio OR, Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM: Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol (United States)* 284(6) pC1346-54, 2003

Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DAD, Kendrick-Jones J, Shore D, Citi S: Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts in vitro with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol* 147:1569-1582, 1999

D'Atri F and Citi S: Cingulin interacts with F-actin in vitro. *FEBS Lett* 507:21-24, 2001

Dragsten PR, Blumenthal R, Handler JS: Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature (England)*, 294(5843) p718-22, 1981

Elias PM, Friend DS: The permeability barrier and pathways in mammalian epidermis. *J Cell Biol* 65:180-191, 1975

Elias PM, Friend DS: Vitamin-A induced mucous metaplasia. *J Cell Biol* 68:173-188, 1976

Elias PM, Scott McNutt N, Friend DS: Membrane alterations during cornification of mammalian squamous epithelia: A freeze-fracture, tracer, and thin-section study. *Anat Rec* 189:557-594, 1977

Fabian B, Touitou E: Localization of lipophilic molecules penetration rat skin in vivo by quantitative autoradiography. *Int J Pharm* 74:59-65, 1991

Farquhar MG, Palade GE: Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17:375-412, 1963

Fasano A: Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. *Ann N Y Acad Sci* 915:214-222, 2000

Fullner JK and Mekalanos JJ: In vivo covalent crosslinking of actin by the RTX toxin of *Vibrio cholerae*. *EMBO J* 19:5315-5323, 2000

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

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S: Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at Tight Junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-1550, 1998a

Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S: A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143:391-401, 1998b

Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S: Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 153:263-72, 2001

Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S: Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156:1099-1111, 2002

Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S: Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol (United States)* 127(6 Pt 1) p1617-26, 1994

Gasbarrini G, Montalto M: Structure and function of tight junctions. Role in intestinal barrier. *Ital J Gastroenterol Hepatol (Italy)* 31(6) p481-8, 1999

Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA: CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/Claudin 11-null mice. *Cell (United States)*, 99(6) p649-59, 1999

Grams Y, Bouwstra J: Penetration and distribution of three lipophilic probes in vitro in human skin focusing on the hair follicle. *J Control Release* 83:253, 2002

Grootjans JJ, Zimmermann P, Reekmans G, Smets A, Degeest G, Durr J, David G: Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A (United States)* 94(25) p13683-8, 1997

Gumbiner BM: Breaking through the tight junction barrier. *J Cell Biol* 123:1631-1633, 1993

Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, De Prost Y, Munnich A, Hadchouel M, Smahi A: Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease.

Gastroenterology (United States), 127(5) p1386-90, 2004

Hallman JR, Fang D, Vijayasradhi S, White WL: Microtubule associated protein (MAP-2) expression defines the companion layer of the anagen hair follicle and an analogous zone in the nail unit. *J Cutan Pathol* 29:549-556, 2002

Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M and Tsukita, S: Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 277, 455-461, 2002

Han I, Dim M, Kim J: Enhanced transfollicular delivery of adriamycin with a liposome and iontophoresis. *Exp Dermatol* 13: 86-92, 2004

Hanakawa Y, Li H, Lin C, Stanley JR, Cotsarelis G: Desmogleins 1 and 3 in the companion layer anchor mouse anagen hair to the follicle. *J Invest Dermatol* 123(5):817-22, 2004

Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J and Stevenson BR: ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141, 199-208, 1998

Heid HW, Moll I, Franke WW: Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. I. Human and bovine hair follicles. *Differentiation* 37:137-157, 1988

Hirabayashi S, Tajima M, Yao I, Nishimura W, Mori H, and Hata Y: JAM-4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol Cell Biol* 23: 4267-4282, 2003

Holbrook KA, Minami SI: Hair follicle embryogenesis in the human. Characterization of events in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 642:167-196, 1991

Hollande F, Shulkes A, Baldwin GS: Signaling the junctions in gut epithelium. [In Process Citation] *Sci STKE (United States)*, 2005(277) ppe13, 2005

Howarth AG, Hughes MR, Stevenson BR: Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *Am J Physiol (United States)* 262(2 Pt 1) pC461-9, 1992

Hueber F, Besnard M, Schäfer H, Wepierre J: Percutaneous absorption of estradiol and progesterone in normal and appendage-free skin of the hairless rat: Lack of importance of nutritional blood flow. *Skin Pharmacol* 7:245-256, 1994

Ito M: The innermost cell layer of the outer root sheath in anagen hair follicle: Light and electron microscopic study. *Arch Derm Res* 279:112-119, 1986

Itoh M, Yonemura S, Nagafuchi A, Tsukita S, Tsukita S: A 220-kD undercoat-constitutive protein: its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J Cell Biol (United States)* 115(5) p1449-62, 1991

Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita S, Tsukita S: The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol (United States)* 121(3) p491-502, 1993

Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S: Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH-termini of claudins. *J Cell Biol* 147:1351-1363, 1999

Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita S, Tsukita S: The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol (United States)* 121(3) p491-502, 1993

Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S: Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 154:1351-1363, 2001

Jeansonne B, Lu Q, Goodenough DA, Chen YH: Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49: 13–21, 2003

Jesaitis LA and Goodenough DA: Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol* 124, 949-961, 1994

Katahira J, Sugiyama H, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N: Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *J Biol Chem* 272:26652-26658, 1997

Keon BH, Schäfer S, Kuhn C, Grund C, Franke WW: Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol* 134:1003-1018, 1996

Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M: Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature (England)* 378(6552) p85-8, 1995

Kim E, De Marco SJ, Marfatia SM, Chishti AH, Sheng M, Strehler EE: Plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 4b binds to membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domains. *J Biol Chem (United States)* 273(3) p1591-5, 1998

Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A: Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol* 159:2001-2009, 2001

Kurzen H, Moll I, Moll R, Schäfer S, Simics E, Amagai M, Wheelock MJ, Franke WW: Compositionally different desmosomes in the various compartments of the human hair follicle. *Differentiation* 63:295-304, 1998

Lademann J, Otberg N, Richter H, Weigmann HJ, Lindemann U, Schäfer H, Sterry W: Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14:17-22, 2001

Langbein L, Rogers MA, Winter H, Prätzel S, Beckhaus U, Rackwitz H-R, Schweizer J: The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem* 274:19874-19884, 1999

Langbein L, Rogers MA, Winter H, Prätzel S, Beckhaus U, Rackwitz H-R, Schweizer J: The catalog of human hair keratins. II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and type II keratins. *J Biol Chem* 276:35123-35132, 2001

Langbein L, Grund C, Kuhn C, Prätzel S, Kartenbeck J, Brandner JM, Moll I, Franke WW: Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur J Cell Biol* 81:419-435, 2002a

Langbein L, Rogers MA, Prätzel S, Aoki N, Winter H, Schweizer J: A novel epithelial keratin, hK6irs1, is expressed differentially in all layers of the inner root sheath, including specialized Huxley cells (Flügelzellen) of the human hair follicle. *J Invest Dermatol* 118:789-799, 2002b

Lauer CA, Lieb LM, Ramachandran C, Flynn GL, Weiner ND. Transfollicular drug delivery. *Pharmaceutical Res* 12: 179-186, 1995

Leyvraz C, Charles RP, Rubera I, Guitard M, Rotman S, Breiden B, Sandhoff K, Hummler E: The epidermal barrier function is dependent on the serine protease CAP1/Prss8. *J Cell Biol* 170:487-496, 2005

- Ma TY, Nguyen D, Bui V, Nguyen H, Hoa N: Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol* 276:G965-G974, 1999
- MacKee GM, Sulzberger MB, Herrmann F, Baer RL: Histologic studies on percutaneous penetration with special reference to the effect of vehicles. *J Invest Dermatol* 6:43-61, 1945
- Malminen M, Koivukangas V, Peltonen J, Karvonen SL, Oikarinen A, Peltonen S: Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis. *Br J Dermatol (England)* 149(2) p255-60, 2003
- Marfatia SM, Lue RA, Branton D, Chishti AH: In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C. *J Biol Chem (United States)* 269(12) p8631-4, 1994
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E: Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142:117-127, 1998
- Mitic LL, VanItallie CM, Anderson JM: 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: G250-254, 2000
- Mitic LL, Anderson JM: Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol (United States)* 60 p121-42, 1998
- Miyauchi S, Hashimoto K, Miki Y: The innermost cell layer of the outer root sheath is positive with Ki-67. *J Invest Dermatol* 95:393-396, 1990
- Moll I, Heid HW, Franke WW, Moll R: Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. III. Hair and nail formation during human fetal development. *Differentiation* 39:167-184, 1988

- Moll R, Moll I, Wiest W: Changes in the pattern of cytokeratin polypeptides in epidermis and hair follicles during skin development in human fetuses. *Differentiation* 23:170-178, 1982
- Montagna W: Penetration and local effect of vitamin A on the skin of the guinea pig. *Proc Soc Exp Biol Med* 86:668-672, 1954
- Morita K, Itoh M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Furuse M, Yoneda K, Imamura S, Fujimoto K, Tsukita S: Subcellular distribution of tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, ZO-2) in rodent skin. *J Invest Dermatol* 110:862-866, 1998
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S: Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junctions strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:511-516, 1999
- Muresan Z, Paul DL, and Goodenough DA: Occludin 1B, a variant of the tight junction protein. *Mol Biol Cell* 11: 627–634, 2000
- Nasdala I, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Kuhn A, Ebnet K, Brachtendorf G, Samulowitz U, Kuster B, Engelhardt B, Vestweber D, Butz S: A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem* 277:16294-16303, 2002
- Nusrat A, von Eichel-Streiber C, Turner JR, Verkade P, Madara JL, Parkos CA: Clostridium difficile toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect Immun* 69:1329-1336, 2001
- Orwin DF: Cell differentiation in the lower outer root sheath of the Romney wool follicle: a companion cell layer. *Aust J Biol Sci* 24:989-999, 1971
- Otberg N: Follikelpenetration: Penetrationsverhalten topisch applizierter Substanzen in den Haarfollikel. – Untersuchung der Physiologie und der Größenparameter von Haarfollikeln. *Dissertation, Berlin*, S 66–72, 2003

Palmeri D, van Zante A, Huang CC, Hemmerich S, and Rosen SD: Vascular-endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 19139–19145, 2000

Pummi K, Malminen M, Aho H, Karvonen S-L, Peltonen J, Peltonen S: Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol* 117:1050-1058, 2001

Rajasekaran AK, Hojo M, Huima T, Rodriguez-Boulant E: Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol (United States)* 132(3) p451-63, 1996

Rahner C, Mitic LL, Anderson JM: Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology (United States)*, 120(2) p411-22, 2001

Rüffer C, Strey A, Janning A, Kim KS, Gerke V: Cell-cell junctions of dermal microvascular endothelial cells contain tight and adherens junction proteins in spatial proximity. *Biochemistry (United States)*, 43(18) p5360-9, 2004

Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T and Tsukita S: Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions, *J Cell Biol* 141(2):397-408, 1998

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

Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H: Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc* 36:247-256, 2003

Schäfer H, Lademann J: The role of follicular penetration: A differential view. *Skin Pharmakol Appl Skin Physiol* 14:23-270, 2001

Schirren CG, Burgdorf WH, Sander CA, Plewig G: Fetal and adult hair follicle: An immunohistochemical study of anticytokeratin antibodies in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Am J Dermatopathol* 19:335-340, 1997

Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amashem S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M: Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta (Netherlands)*, 1669(1) p34-42, 2005

Schlüter H, Wepf R, Moll I, Franke WW: Sealing the live part of the skin: the integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis. *Eur J Cell Biol (Germany)*, 83(11-12) p655-65, 2004

Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettilnelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP: Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* 285:103-106, 1999

Smalley KS, Brafford P, Haass NK, Brandner JM, Brown E, Herlyn M: Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol (United States)*, 166(5) p1541-54, 2005

Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S: Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 147: 195-204, 1999

Staevelin LA: Structure and function of intercellular junctions. *Annu Rev Cytol* 39:191-283, 1974

Stevenson BR, Silicano JD, Mooseker M, Goodenough DA: Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103:755-766, 1986

Stevenson BT, Keon BH: The tight junctions: Morphology to molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol* 119:89-109, 1998

Suzuki A, Ishiyama C, Hashiba K, Shimizu M, Ebnet K, and Ohno S. aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *J Cell Sci* 115: 3565–3573, 2002

Tanaka T, Narisawa Y, Misago N, Hashimoto K: The innermost cells of the outer root sheath in human anagen hair follicles undergo specialized keratinization mediated by apoptosis. *J Cutan Pathol* 25:316-321, 1998

Tebbe B, Mankertz J, Schwarz C, Amasheh S, Fromm M, Assaf C, Schultz-Ehrenburg U, Sanchez Ruderish H, Schulzke JD, Orfanos CE: Tight junction proteins: a novel class of integral membrane proteins. Expression in human epidermis and in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res (Germany)*, 294(1-2) p14-8, 2002

Tenjarla SN, Kasina R, Puranajoti P, Omar MS, Harris WT: Synthesis and evaluation of N-acetylprolinate esters – Novel skin penetration enhancers. *Int J Pharm* 192:147-158, 1999

Tsukita S, Tsukita S, Nagafuchi A, Yonemura S: Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol (United States)* 4(5) p834-9, 1992

Tsukita S, Furuse M: Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 9:268-273, 1999

Tsukita S, Furuse M: Pores in the wall: Claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149:13-16, 2000

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

Tsukita S, Furuse M: Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol* 14:531-536, 2002

Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Gunzel D, Fromm M, Kemler R, Krieg T, Niessen CM: E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *Embo J* 24:1146-1156, 2005

Tur E, Maibach HI, Guy R: Percutaneous penetration of methyl nicotinate at three anatomic sites: Evidence for an appendageal contribution to transport? *Skin Pharmacol* 4:230-234, 1991

Turksen K, Troy TC: Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* 129:1775-1784, 2002

Turksen K and Troy TC: Barriers built on claudins. *Journal of Cell Science* 117:2435-2447, 2004

Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM: Regulated expression of claudin 4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107:1319-1327, 2001

van Meer G, Simons K: The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J (England)*, 5(7) p1455-64, 1986

Vogt A, Blume-Peytavi U: Die Biologie des menschlichen Haarfollikels. Neue Erkenntnisse und ihre klinische Bedeutung. *Hautarzt (Germany)*, 54(8) p692-8, 2003

Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruentert DC, Thompson PJ, Stewart GA, Taylor GW, Garrod DR, Cannell MB, Robinson C: Der p1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 104:123-133, 1999

Wan H, Winton HL, Soeller C, Taylor GW, Gruenert DC, Thompson PJ, Cannell MB, Stewart GA, Garrod DR, Robinson C: The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 31: 279-294, 2001

Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef F, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB: Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 104:165-172, 2001

Wilke K, Wepf R, Keil FJ, Wittern KP, Wenck H, Biel SS: Are sweat glands an alternate penetration pathway? Understanding the morphological complexity of the axillary sweat gland apparatus. *Skin Pharmacol Physiol (Switzerland)* 19(1) p38-49, 2006

Willott E, Balda MS, Fanning AS, Jameson B, Van Itallie C, Anderson JM: The tight junction protein ZO-1 is homologous to the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A (United States)* 90(16) p7834-8, 1993

Winter H, Langbein L, Prätzel S, Jacobs M, Rogers MA, Leigh IM, Tidman N, Schweizer J: A novel human type II cytokeratin, K6hf, specifically expressed in the companion layer of the hair follicle. *J Invest Dermatol* 111: 955-62, 1998

Yamamoto Y, Nishimura N, Morimoto S, Kitamura H, Manabe S, Kanayama H, Kagawa S, Sasaki T: Distinct roles of Rab3B and Rab13 in the polarized transport of apical, basolateral, and tight junctional membrane proteins to the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308:270-275, 2003

Yoshida Y, Morita K, Mizoguchi A, Ide C, Miyachi Y: Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 293: 239-244, 2001

Young P, Boussadia O, Halfter H, Grose R, Berger P, Leone DP, Robenek H, Charnay P, Kemler R, Suter U: E-cadherin controls adherens junctions in the epidermis and the renewal of hair follicles. *EMBO J* 3; 22(21):5723-33, 2003

Zen K, Babbitt BA, Liu Y, Whelan JB, Nusrat A, Parkos CA: JAM-C is a component of desmosomes and a ligand for CD11b/CD18-mediated neutrophil transepithelial migration. *Mol Biol Cell (United States)* 15(8) p3926-37, 2004

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung: 1

Anatomie des anagenen Haarfollikels

Abbildung: 2

Phasenkontrast-Aufnahme von den unterschiedlichen Regionen des Haarfollikels

Abbildung: 3

Expression Tight Junction assoziierter Proteine in menschlichen Haarfollikeln;
RT-PCR Analyse

Abbildung: 4

Lokalisation Tight Junction assoziierter Proteine im menschlichen Haarfollikel:
Protein ZO-1, Occludin und Claudin 1 (Immunfluoreszenz-Färbung/Phasenkontrast)

Abbildung: 5

Lokalisation von Tight Junction assoziierten Proteinen im menschlichen Haarfollikel
Claudin 4 und Claudin 12 (Immunfluoreszenz-Färbung/Phasenkontrast)

Abbildung: 6

Schematische Zeichnung des Haarfollikels, der die Koexpression unterschiedlicher
Tight Junction Proteine zeigt

Abbildung: 7

Vergleich von Claudin 1 und der Kernfärbung DAPI; Zentrale Region des Haarfollikels
(und Phasenkontrast)

Abbildung: 8

Desmocollin 3 im menschlichen, anagenen Haarfollikel (Immunfluoreszenz-Färbung)

Abbildung: 9

Vergleich der Lokalisation von Tight Junction assoziiertem Protein Occludin und dem
desmosomalen Protein Desmoplakin I/II im vertikalen Schnitt durch einen
menschlichen anagenen Haarfollikel (mit Immunfluoreszenz-Doppelfärbung)

Abbildung: 10

E-Cadherin im menschlichen, anagenen Haarfollikel (Immunfluoreszenz-Färbung)

Abbildung: 11

Vergleich der Lokalisation von Tight Junction assoziiertem Protein Occludin und Adhärenzverbindungsprotein β -Catenin im vertikalen Schnitt durch einen menschlichen anagenen Haarfollikel (mit Immunfluoreszenz-Doppelfärbung)

Tabelle: I

Länge der amplifizierten Proteine

Tabelle: II

Intensität des Vorkommens Tight Junction-assoziiierter Proteine, desmosomaler Proteine und Adhärenzverbindungsproteine in den unterschiedlichen Zelltypen des menschlichen Haarfollikels

8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ÄWS	äußere Wurzelscheide
bp	Basenpaar(e)
cDNA	„Complementary DNA“ komplementäre DNA
Cy2	Cyanine 2
Cy3	Cyanine 3
Da	Dalton
DAPI	(4',6-Diamidino-2'-phenylindol-dihydrochlorid)
DNA	„Desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
IWS	innere Wurzelscheide
JAM	junctional adhesion molecule
M	Molar
MAGUK	Membran assoziierte Guanylatkinase
mRNA	„Messenger RNA“, Boten-Ribonukleinsäure
NGS	Normal Goat Serum
PBS	„Phosphate buffered saline“ phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	„Polymerase chain reaction“ Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD-95/SAP90, discs-large ZO-1
RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
Tab.	Tabelle
TJ	Tight Junction
ZO-1	Zonula Occludens Protein 1

9 Danksagung

Für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas, die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten, sowie die ständige Gesprächsbereitschaft möchte ich mich bei Frau Professor Moll ganz herzlich bedanken. Sie hat mich immer ermuntert und gefördert.

Frau Doktor Johanna Brandner, Leiterin des zellbiologischen Labors, die mich bei dieser Arbeit über die gesamte Zeit betreut hat, danke ich besonders herzlich. Sie hat mich durch ihr fortwährendes Interesse ermutigt. Sie war immer für Fragen offen und hat mich durch ihren fachkundigen Rat und bei der Präsentation und Publikation der Ergebnisse großartig unterstützt.

Frau Sabine Kief, Frau Ewa Wladykowski und Frau Pia Houdek, die Medizinisch Technischen Assistentinnen, standen mir bei der Einarbeitung der Methoden und bei Fragen immer hilfreich zur Seite. Ich bedanke mich sehr für die Unterstützung.

Weiterhin möchte ich dem gesamten Team des Zellbiologischen Labors danken, das mich immer wieder fröhlich und aufbauend unterstützt hat.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Ehemann Robbie, meiner Schwester Fridrike und meinen Eltern, Dr. Inge Bessert-Stute und Dr. Jörg Stute bedanken, die immer an der Arbeit interessiert waren.

10 Lebenslauf

Name: Mareike Sophie McIntyre, geb. Stute

geboren: 6. Dezember 1978 in Hamburg

Wohnort: Hamburg

Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1985 – 1998 Rudolf Steiner Schule – Nienstedten

1998 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

9-12/1998 Sprachenschule: Languages International, Auckland, Neuseeland

Abschluss: Cambridge Proficiency Exam (CPE)

Hochschulbildung:

03/1999 – 06/2005 Universität Hamburg: Studiengang Medizin (12 Fachsemester)

06/2005 Erhalt der Approbation

Praktisches Jahr Wahlfach:

Dermatologie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Auslandsaufenthalte:

07/2001 – 08/2001 Famulatur: Kardiologie (university hospital)
Aberdeen Royal Infirmary,
Aberdeen, Schottland

09/2001 Famulatur: Allgemeinarztpraxis
Holburn Medical Practice,
Aberdeen, Schottland

08/2004 – 10/2004 Praktisches Jahr: Plastische Chirurgie (university hospital)
Middlemore Hospital,
Auckland, Neuseeland

11 Veröffentlichungen

Paper:

Expression and localization of tight junction-associated proteins in human hair follicles
Brandner JM*, McIntyre M*, Kief S, Wladykowski E, Moll I; Arch Dermatol Res
(2003)

*Both authors contributed to this paper equally

Vortrag vor der Hamburger Dermatologischen Gesellschaft: Expression und Lokalisation von Tight Junction-assoziierten Proteinen in menschlichen Haarfollikeln, Hamburg 06/2005

Vorstellung eines **Posters** beim Kongress International Investigative Dermatology, Miami, USA 05/2003

Vorstellung eines **Posters** bei der Jahrestagung der Norddeutschen Dermatologischen Gesellschaft, Hamburg 09/2005

Preis für Arbeiten des wissenschaftlichen Nachwuchses der norddeutschen Hautkliniken beim 12. Hanseatischen Dermatologentreffen, Lübeck 06/2003

Preis zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses der Hamburger Dermatologischen Gesellschaft, Hamburg 11/2005

12 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den 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.