

**Connexin 43 als möglicher Angriffspunkt
zur Beschleunigung normaler und diabetischer kutaner
Wundheilung im humanen und porcinen System**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

im Department Biologie der Fakultät für Mathematik,

Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Simone Pollok

Hamburg 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz Dr. J. BRANDNER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. T. BURMESTER
Tag der Disputation: 30. April 2010

Hamburg, den 13. April 2010



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'A. Temming'.

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion der Haut	1
1.2 Ablauf der kutanen Wundheilung	2
1.2.1 Die Inflammationsphase	3
1.2.2 Die Granulationsphase	3
1.2.3 Die Remodellierungsphase	6
1.3 Diabetes Typ II und gestörte Wundheilung	6
1.3.1 Therapieansätze	8
1.4 Connexine und Gap Junctions	9
1.4.1 Biosynthese und Regulation von Connexinen	11
1.4.2 Connexin-Halbkanäle	13
1.5 Connexine in der Haut	14
1.5.1 Connexin-assoziierte Störungen	15
1.5.2 Die Rolle von Connexinen in der kutanen Wundheilung	15
1.6 Manipulation der Cx43-Funktion	17
1.6.1 Cx43-spezifische <i>Antisense</i> -Oligonukleotide	17
1.6.2 Cx43-mimetische Peptide	19
1.7 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material	21
2.1 Geräte	21
2.2 Material	22
2.3 DNA-Oligonukleotide	24
2.4 Peptide	24
2.5 Antikörper	25
2.6 Zellen und Gewebe	26
2.6.1 Zellen	26
2.6.2 <i>Ex vivo</i> Wundheilungsmodelle	26

2.7	Software	26
2.8	Statistische Auswertungen	27
3	Methoden	28
3.1	Zell- und Gewebekultur	28
3.1.1	Herstellung und Kultivierung von <i>ex vivo</i> Wundmodellen	28
3.1.2	Bewertungssystem der <i>ex vivo</i> Wundheilungsmodelle	29
3.1.3	<i>Ex vivo</i> -Kommunikationsassay	30
3.1.4	Anzucht humaner Fibroblasten aus infanten Vorhäuten und adulten Hautbiopsien	30
3.1.5	Herstellung eines <i>Feederlayers</i>	31
3.1.6	Anzucht humaner Keratinozyten aus infanten Vorhäuten	31
3.1.7	Anzucht humaner Keratinozyten aus adulten Hautbiopsien	32
3.1.8	Zellzahlbestimmung	32
3.1.9	Subkultivierung primärer Fibroblasten	33
3.1.10	Subkultivierung primärer Keratinozyten	33
3.1.11	Kryokonservierung und Auftauen primärer Zellen	34
3.1.12	Bestrahlung von Kulturzellen zur Inhibition der Proliferation	35
3.1.13	Migrationsassay	35
3.1.14	Proliferationsassay	36
3.1.15	Halbkanalassay	36
3.1.16	MMP-Array	37
3.2	Histologische Methoden	37
3.2.1	Anfertigen von Gefrierschnitten	37
3.2.2	HE-Färbung	38
3.2.3	Immunhistochemische und Immunzytochemische Färbungen	38
3.3	Molekularbiologische Methoden	39
3.3.1	Proteinisolation aus Zellen	39
3.3.2	Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford	40
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.3.4	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	42
3.3.5	Proteindetektion mittels Antikörperreaktion	42
3.3.6	Coomassie-Blau-Färbung	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Effekte von Gap27 im <i>ex vivo</i> Wundheilungsmodell	45
4.1.1	Einfluss von Gap27 auf die porcine und humane <i>ex vivo</i> Wundheilung	45
4.1.2	Einfluss von Gap27 auf die Connexin-Lokalisation	46
4.1.3	Einfluss von Gap27 auf die epidermale Zellkommunikation	49

4.1.4	Einfluss von Gap27 auf die Keratinozyten-Proliferation	51
4.2	<i>In vitro</i> -Effekte von Gap27	52
4.2.1	Einfluss von Gap27 auf Cx-Halbkanäle infanter humaner Keratinozyten und Fibroblasten	52
4.2.2	Einfluss von Gap27 auf das Proteinlevel und die Phosphorylierung von Cx43 in infanten Keratinozyten und Fibroblasten	53
4.2.3	Einfluss von Gap27 auf die Proliferation infanter Keratinozyten und Fibroblasten im <i>Scratch</i> -Assay	54
4.2.4	Einfluss von Gap27 auf die Migration infanter Keratinozyten und Fibroblasten	56
4.3	Einfluss von Gap27 auf adulte diabetische und nicht-diabetische Zellen	58
4.3.1	Einfluss von Gap27 auf die Proliferation adulter Zellen im <i>Scratch</i> -Assay .	58
4.3.2	Einfluss von Gap27 auf die Migration adulter Zellen	60
4.3.3	Einfluss von Gap27 auf das Proteinlevel und die Phosphorylierung von Cx43 in adulten Zellen	62
4.3.4	Einfluss von Gap27 auf Cx-Halbkanäle adulter Zellen	64
4.3.5	Einfluss der Herkunft und Gap27-Behandlung auf die MMP-Sekretion primärer Keratinozyten	66
4.4	<i>In vitro</i> Effekte von Gap27 unter hyperglycämischen Bedingungen	68
4.4.1	Einfluss von Hyperglycämie auf die Lokalisation und das Proteinlevel von Cx43	68
4.4.2	Vergleich des Einflusses von Hyperglycämie und Herkunft auf die Migration von Keratinozyten und Fibroblasten	71
4.4.3	Einfluss von Gap27 auf die Migration von Zellen unter hyperglycämischen Bedingungen	71
4.5	Effekt von Cx43- <i>Antisense</i> -Oligonukleotiden auf die Wundheilung	73
4.5.1	Eignung verschiedener Cx43- <i>Antisense</i> -Sequenzen	73
4.5.2	Einfluss von Cx43as-ODNs auf die porcine <i>ex vivo</i> Wundheilung	74
4.5.3	Einfluss von Cx43as-ODNs auf die Cx-Lokalisation im <i>ex vivo</i> WHM . . .	75
4.5.4	Einfluss von Cx43as-ODNs auf die Migration primärer Keratinozyten und Fibroblasten	78
4.5.5	Einfluss von Cx43as-ODNs auf die Migration infanter Zellen unter hyperglycämischen Bedingungen	79
5	Diskussion	80
5.1	Gap27 fördert die humane und porcine Wundheilung	80
5.2	Zellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs sind unterschiedlich sensitiv gegenüber Gap27	86
5.3	Einfluss von Hyperglycämie auf die Wundheilung und kutane Zellen	89
5.4	Einfluss Cx43-spezifischer <i>Antisense</i> -Oligonukleotide auf die Wundheilung, Cx43-Proteinlevel und Migration	93
5.5	Ausblick: Cx43 als therapeutisches <i>Target</i> zur Beschleunigung der Wundheilung .	95

Zusammenfassung	97
Abkürzungen	99
Literaturverzeichnis	101
Abbildungsverzeichnis	113
Tabellenverzeichnis	119
Danksagung	120

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist das größte und eines der wichtigsten Organe des menschlichen Körpers und besteht aus zahlreichen Zelltypen mit unterschiedlicher Spezialisierung. Die Hauptfunktion der Haut ist der Schutz gegenüber Umwelteinflüssen, die Thermo- und Osmoregulation sowie die Sinneswahrnehmung. Die Haut besteht aus verschiedenen Schichten unterschiedlichen Aufbaus und lässt sich grob in Epidermis, Dermis und subkutanes Fettgewebe gliedern (Abbildung 1.1 **A**). Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel, deren Hauptzellpopulation die Keratinozyten darstellen, deren Differenzierungsgrad vom *Stratum basale* (Basalzellschicht), über das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) bis hin zum *Stratum granulosum* (Granularzellschicht) zunimmt (Abbildung 1.1 **B**). In der obersten Schicht der Epidermis, dem *Stratum corneum* (Hornschicht), liegen die Keratinozyten als abgestorbene Zellen vor, die eine abgeflachte Morphologie aufweisen. Diese sogenannten Korneozyten besitzen anstelle einer Plasmamembran eine Hornhülle (*cornified envelope*). Jede Schicht der Epidermis weist ein spezifisches Expressionsmuster von Cytokeratinen auf, die zu den Intermediärfilamenten zählen und als epidermale Differenzierungsmarker verwendet werden. Außer den Keratinozyten sind als weitere Zellen der Epidermis die Melanozyten, die Träger des Pigmentfarbstoffs Melanin, sowie die neuroendokrinen Merkelzellen zu nennen. Zudem existiert in der Epidermis eine Population lokaler Immunzellen (Langerhanszellen). Die Dermis ist das unter der Epidermis gelegene Bindegewebe, das sich bis zum subkutanen Fett erstreckt. Ihre zelluläre Hauptkomponente ist die Fibroblastenpopulation. Diese Zellen synthetisieren und exozytieren die dermale Matrix, die vor allem aus kollagenen und elastischen Fasern sowie Pro-

teoglycanen besteht. Zudem enthält die Dermis, im Gegensatz zur Epidermis, ein ausgedehntes System an Blut- und Lymphgefäßen (Jung [1995]). Bei Traumata durch Verwundung muss die komplexe Architektur der Haut reproduziert werden, um die verlorene Barriere wiederherzustellen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Wundheilung.

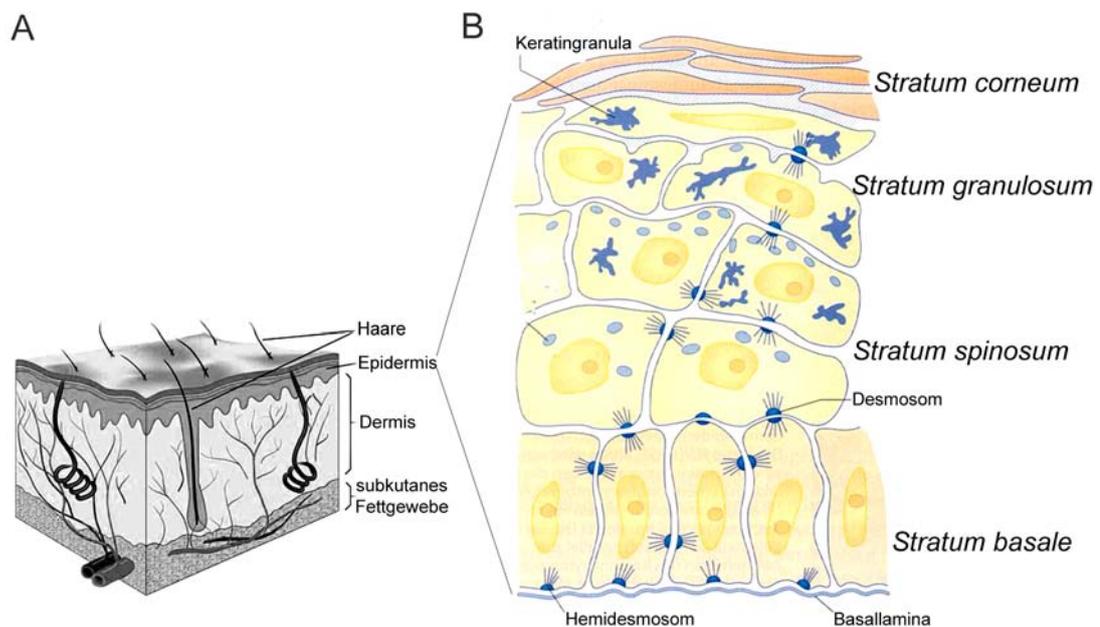


Abbildung 1.1: Schematischer Querschnitt der Haut. (A) Die Haut setzt sich aus der Epidermis, Dermis und dem subkutanen Fettgewebe zusammen. Haare und andere Hautanhangsgebilde wie Talg- und Schweißdrüsen sind in der Dermis lokalisiert. (B) Die Epidermis ist ein aus Keratinozyten bestehendes mehrschichtiges Plattenepithelgewebe und setzt sich aus den Schichten *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* zusammen. Wichtige Zell-Zell-Verbindungen in der Epidermis sind zum einen die Desmosomen, die die einzelnen Keratinozyten miteinander verbinden und zum anderen die Hemidesmosomen, die die basalen Keratinozyten in der Basalmembran verankern (modifiziert nach Fritsch [1998]).

1.2 Ablauf der kutanen Wundheilung

Wundheilung ist ein dynamischer und interaktiver Prozess, an dem zahlreiche Mediatoren, Blutzellen, Moleküle der extrazellulären Matrix (ECM) sowie epidermale und mesenchymale Zellen beteiligt sind (zur Übersicht siehe Singer and Clark [1999]). Die Wundheilung kann in drei Phasen

eingeteilt werden, die zeitlich überlappen: Inflammationsphase, Regenerationsphase und Remodellierungsphase.

1.2.1 Die Inflammationsphase

Die Inflammation (Abbildung 1.2 **A**) setzt unmittelbar nach der Verletzung ein. Zunächst kommt es zu einer Aggregation von Thrombozyten (Blutplättchen). Parallel dazu startet eine sogenannte *Clotting*-Kaskade, in deren Verlauf Fibrin und Fibronectin vernetzt werden und eine Art Pfropfen in der Wunde formen, um den Blutverlust zu stoppen. Die Plättchen setzen außerdem Mediatoren frei, die zunächst eine Konstriktion und anschließend eine Dilatation der Blutgefäße bewirken. Dieser Vorgang der Gefäßerweiterung ermöglicht im Folgenden die Einwanderung von Entzündungszellen (Heldin and Westermark [1996]). Dazu zählen vor allem drei Zellarten: Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten. Mittels Phagozytose reinigen neutrophile Granulozyten die Wunde von Bakterien und Zelltrümmern. Monozyten differenzieren im Entzündungsherd zu Makrophagen, die die Hauptproduzenten stimulatorischer Signale darstellen und dadurch die Inflammation vorantreiben (Brown [1995]). Als bedeutendste Mediatoren sind hier CSF-1, TNF- α , TGF- β und IGF I zu nennen (Rappolee et al. [1988]). Durch Synthese von PDGF und VEGF wird zudem die Bildung des Granulationsgewebes initiiert. Die Lymphozyten treten erst in der späten Entzündungsphase auf. Sie spielen eine wichtige regulatorische Rolle während des folgenden Heilungsprozesses, indem sie eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren ausschütten. Wachstums- und Entzündungsfaktoren werden jedoch nicht nur von Zellen des Immunsystems, sondern auch von endothelialen und epithelialen Zellen ausgeschüttet, die damit ihrerseits zum Fortschreiten der Wundheilung beitragen.

1.2.2 Die Granulationsphase

Die Granulationsphase (Abb. 1.2 **B**) beginnt bereits parallel zur Inflammation. Ein wichtiger Vorgang dieser Phase ist die Neovaskularisierung, die essentiell für die Sauerstoffversorgung des neugebildeten Gewebes ist. Der Prozess wird durch Hypoxie sowie angiogene Faktoren wie VEGF und bFGF stimuliert (Madri et al. [1996]). Neue Blutgefäße bilden sich aus endothelialen Zellhaufen, die dann entlang eines O₂-Gradienten in die Wunde migrieren.

Zudem beginnt in der Granulationsphase die Erneuerung des dermalen Gewebes. Stimuliert durch PDGF, bFGF, TGF- β sowie ECM-Moleküle beginnen Fibroblasten von den Wundrändern, in den Wundbereich einzuwandern. Dabei produzieren sie eine provisorische Matrix, an der sie adhären können. Das dabei gebildete Gewebe wird auch als Granulationsgewebe bezeichnet und besteht vorwiegend aus neuen Blutgefäßen, Fibroblasten, Entzündungszellen sowie Bestandteilen der extrazellulären Matrix, vor allem Fibrin, Fibronectin, Kollagen und Hyaluronsäure (Singer and Clark [1999]). Um die Migration der Fibroblasten in und unter den Wundschorf, der aus quervernetztem Fibrin besteht, zu gewährleisten, bedarf es aggressiver enzymatischer Aktivität, die vermutlich durch Enzyme wie Plasminogen Aktivator, Kollagenasen, Gelatinase A und Stromelysin zur Verfügung gestellt wird. Im späteren Zeitverlauf kommt es zur Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten, die sich durch lange Bündel von aktinreichen Mikrofilamenten sowie Zell-Matrix-Verbindungen auszeichnen. Dieser Prozess wird durch Makrophagen stimuliert. Myofibroblasten sind kontraktile Zellen, die die Kontraktion der Wunde vermitteln, wodurch die Wundränder zueinandergeführt werden.

Die Formation des Granulationsgewebes ermöglicht den nächsten Schritt der Wundheilung, die Reepithelialisierung. Zu diesem Zweck vollziehen sich in den epithelialen Zellen drastische phänotypische Veränderungen, in deren Verlauf intrazelluläre Tonofilamente umgelagert und Zell-Verbindungen wie Desmosomen, Hemidesmosomen und Gap Junctions aufgelöst werden. Epithelzellen migrieren mittels peripherer cytoplasmatischer Aktinfilamente über das neugebildete Gewebe. Ihre Migration wird durch die Wechselwirkung von Integrinen mit der ECM vermittelt (Clark [1990]; Larjava et al. [1993]). Epitheliale Zellen haben außerdem die Fähigkeit, Zellrümpfer und Bakterien zu phagozytieren, die ihren Migrationsweg versperren. Zudem sezernieren sie Enzyme, sogenannte Matrixmetalloproteasen (MMPs), die die ECM entlang ihres Weges verdauen (Pilcher et al. [1997]). Die Keratinozyten, die sich hinter dem *Leading Edge* befinden, proliferieren zunächst und differenzieren dann zu reifen Zellen, um die Barrierefunktion des Epithels im äußeren Wundbereich wieder herzustellen. In der Mitte der Wunde wird die Migration der Keratinozyten erst durch Kontaktinhibition gestoppt. Anschließend beginnen die Zellen, sich zu einem Gewebe zusammenzuschließen, in der Basalmembran zu verankern, neue Zellkontakte, wie Desmosomen und Hemidesmosomen auszubilden und durch Differenzierung eine neue stratifizierte Epidermis zu bilden (Singer and Clark [1999]).

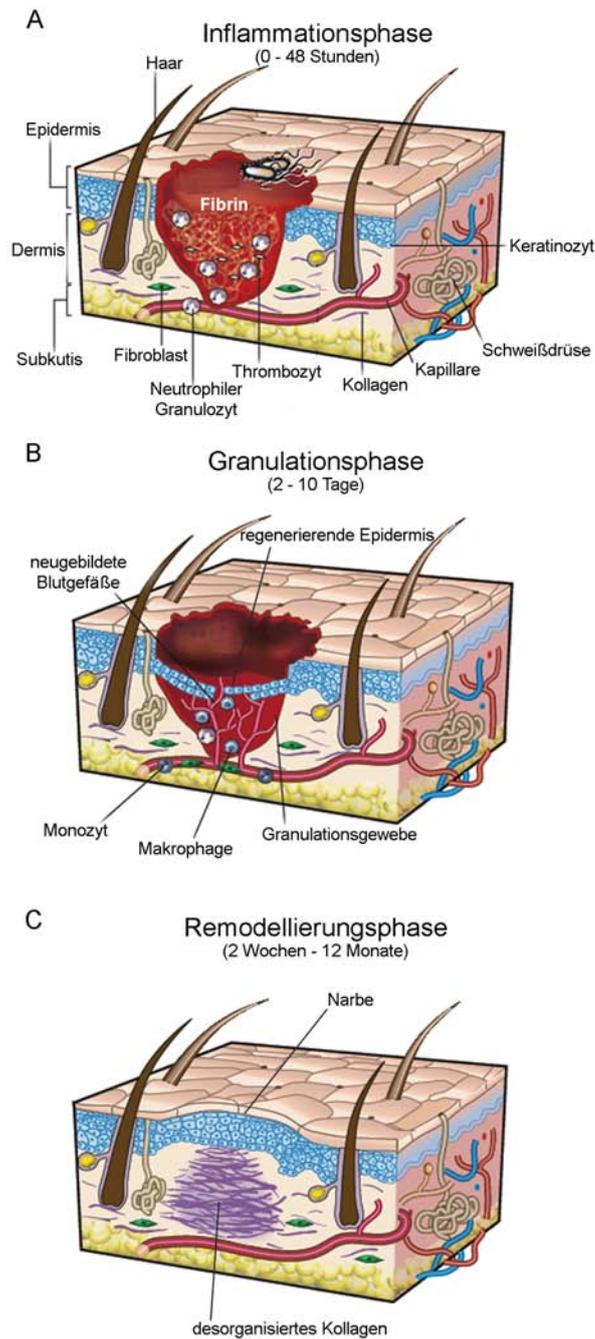


Abbildung 1.2: Ablauf der kutanen Wundheilung. Die kutane Wundheilung läuft in drei Phasen ab, die zeitlich überlappen: **(A)** Inflammationsphase, **(B)** Granulationsphase und **(C)** Remodellierungsphase (modifiziert nach Gurtner et al. [2008]).

1.2.3 Die Remodellierungsphase

Die Remodellierungsphase (Abbildung 1.2 C) ist die letzte Phase der Wundheilung, bei der vor allem die Narbenbildung stattfindet. Während dieser Phase gehen die meisten endothelialen Zellen sowie Makrophagen und Myofibroblasten in Apoptose oder verlassen den Wundbereich. Zurück bleibt ein Gewebe mit sehr geringer Zelldichte, das vor allem aus Kollagenen und anderen ECM-Molekülen besteht (zur Übersicht siehe Gurtner et al. [2008]). Ein wichtiger Schritt der Remodellierungsphase ist die Reifung und Umlagerung des Gewebes. In diesem Zusammenhang werden Kollagene vom Typ III aus der Granulationsmatrix entfernt und durch Kollagene vom Typ I ersetzt, die zu Fibrillen organisiert und vernetzt werden (Xu and Clark [1996]). Dieser Prozess wird durch Matrixmetalloproteasen vermittelt, die von Fibroblasten, Makrophagen sowie Endothelzellen gebildet werden, und führt dazu, dass das Gewebe im Wundbereich fast seine ursprüngliche Zugfestigkeit zurückerlangt.

1.3 Diabetes Typ II und gestörte Wundheilung

Die kutane Wundheilung ist ein hochkomplexer Prozess, währenddessen eine Vielzahl einzelner Prozesse in zeitlich abgestimmter Folge ablaufen und das Verhalten mehrerer Zellpopulationen durch direkte oder indirekte Kommunikation aufeinander abgestimmt werden muss. Ist dieser Ablauf in einem oder mehreren Schritten gestört, wie es oft bei Patienten mit Typ II Diabetes Mellitus der Fall ist, kann es zur Entstehung einer chronischen Wunde kommen.

Diabetische Wunden sind ein gutes Beispiel dafür, wie physiologische und biochemische Defekte aufgrund einer systemischen Erkrankung zu gestörter Wundheilung führen können. Diabetes Mellitus ist eine in aller Welt verbreitete Volkskrankheit mit steigender Inzidenz und Prävalenz. Beim nicht-insulinabhängigen (Typ II) Diabetes handelt es sich um eine Störung, bei der es zu einer Insulinresistenz in dessen Zielorganen kommt, zu denen auch die Haut zählt. Dadurch entsteht ein relativer Insulinmangel, aufgrunddessen Glucose von diesen Organen nicht mehr effizient aufgenommen und verstoffwechselt werden kann. Bis vor wenigen Jahren wurde diese Form des Diabetes als „Altersdiabetes“ bezeichnet, sie tritt aber zunehmend auch bei jungen Patienten auf. Die Ursachen hierfür liegen meist in falscher Ernährung und mangelnder Bewegung, die zu Fettleibigkeit führen können. Außerdem werden genetische Ursachen für Typ II Diabetes disku-

tiert. Als diagnostischer Marker der Krankheit dient der meist stark erhöhte Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie), der im Labor über den HbA1C-Wert quantifiziert werden kann. Hierbei handelt es sich um einen Langzeitwert, der angibt, wieviel des Blutfarbstoffs Hämoglobin in glycosylierter Form vorliegt (Glycohämoglobin). Bei Gesunden liegt der Wert bei etwa 4-6 %, bei Diabetikern kann er bei bis zu 12 % liegen. Eine Therapie sieht vor allem eine Gewichtsreduktion durch eine ausgewogene Diät und sportliche Betätigung vor. Als orale Antidiabetika sind vor allem Biguanide (z.B. Metformin) oder Sulfonylharnstoffe (z.B. Tolbutamid) zu nennen.

Schon heute sind etwa 170 Millionen Menschen weltweit von Typ II Diabetes betroffen, 2030 werden es doppelt so viele sein (Wild et al. [2004]). Bei dieser Form des Diabetes kann es aufgrund von mikro- und makroangiopathischen Gefäßkomplikationen zu erheblichen Organschäden, wie der diabetischen Retinopathie, Nierenversagen und koronaren Herzerkrankungen kommen. Sehr häufig leiden die Patienten zudem an peripheren arteriellen Makroangiopathien im Bereich der unteren Extremitäten. Hinzu kommt, dass sie aufgrund von Neuropathie, einer diabetes-bedingten Schädigung des peripheren Nervensystems, über ein eingeschränktes Schmerzempfinden verfügen, so dass eine Wunde in diesem Bereich zunächst unbemerkt bleibt. Die vielfältigen pathologischen Veränderungen und Erkrankungen im Fußbereich diabetischer Patienten werden unter dem Sammelbegriff Diabetisches Fußsyndrom (DFS) zusammengefasst (Zander and Zander [1999]). Etwa 15 % der erkrankten Personen entwickeln aufgrund des DFS ein diabetisches Geschwür, das meist chronisch verläuft, und unterliegen dem Risiko einer Amputation (Reiber et al. [1999]). Die vorherrschenden Lokalisationen sind Fußballen, Ferse oder Zehen (Abbildung 1.3).

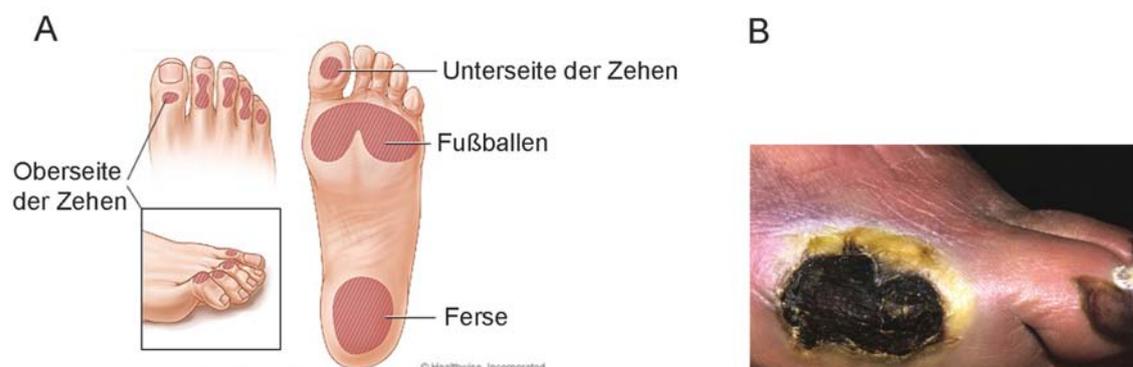


Abbildung 1.3: Das diabetische Fußsyndrom (DFS). (A) Schematische Darstellung der häufigsten Lokalisationen des DFS (Bildquelle: www.health.com; Abfragedatum 23.02.2010). (B) Beispiel eines chronischen diabetischen Ulkus am Zeh (modifiziert nach Usui et al. [2008]).

Die genauen molekularen Mechanismen, mit denen eine Diabeteserkrankung die Wundheilung beeinträchtigt, sind noch weitestgehend unbekannt. Tatsache aber ist, dass diabetische Wunden sich in zahlreichen Punkten von normal heilenden Wunden unterscheiden. Diese beinhalten die Beeinträchtigung der Zellproliferation der meisten an der Wundheilung beteiligten Zelltypen (Sank et al. [1994]; Hehenberger et al. [1998]; Lerman et al. [2003]), eine erhöhte Apoptoserate in epithelialen Zellen (Lorenzi et al. [1985]; Baumgartner-Parzer et al. [1995]; Darby et al. [1997]), eine schlechtere Gefäßneubildung (Loots et al. [1998]; Singer and Clark [1999]) sowie eine inadäquate Durchblutung (Singer and Clark [1999]; Greenhalgh [2003]) und damit eine schlechtere Immunantwort. Stattdessen kommt es zu einer chronischen Entzündung, die sich durch das Verbleiben der eingewanderten Makrophagenpopulation im Wundbett auszeichnet (Loots et al. [1998]). Außerdem gibt es Hinweise, dass die Wachstumsfaktorexpression verändert (Robson et al. [2001]; Greenhalgh [2003]) und die Makrophagenwanderung zu den Lymphknoten gestört ist (Belligan et al. [1996]). Zudem ist die Balance zwischen Akkumulation von extrazellulärer Matrix und deren Abbau durch Matrixmetalloproteasen gestört, da das Verhältnis zwischen MMPs und ihren Inhibitoren, den *Tissue Inhibitors of MMPs* (TIMPs), aus dem Gleichgewicht gerät (Lobmann et al. [2002]). Die Herausforderung bei der Entwicklung effizienter Therapien zur Wundheilungsförderung besteht darin, all diese Faktoren zu berücksichtigen.

1.3.1 Therapieansätze

Bisher ist das Zusammenspiel dieser zahlreichen Faktoren und damit der gesamte Ablauf der Wundheilung noch sehr wenig verstanden. Das Verständnis ist jedoch essentiell, um in der Lage zu sein, Therapien für Patienten zu entwickeln, die an gestörter Wundheilung aufgrund von Diabetes leiden. Es ist wahrscheinlich, dass nicht nur ein, sondern vielmehr die Kombination aus mehreren Ansatzpunkten für eine effektive Therapie sinnvoll wäre. Zudem erweisen sich chronische Wunden als äußerst komplex und heterogen, wodurch sie auf Behandlung sehr unterschiedlich ansprechen. Therapien, die im Tiermodell vielversprechende Ergebnisse erzielten, waren in Patienten nicht automatisch ebenso erfolgreich (Blakytyn and Judel [2009]). Aus diesem Grund beschäftigt sich die Forschung mit zahlreichen unterschiedlichen Therapieansätzen wie der zeitlich gezielten Gabe von Wachstumsfaktoren, Thrombozyten, Stammzellen und der Entwicklung verschiedener Arten des

Hautersatzes (epidermale, dermale oder *Bilayer*-Systeme; zur Übersicht siehe Pierce and Mustoe [1995]; Singer and Clark [1999]; Blakytyn and Judel [2009]).

Ein wichtiger Vorgang in der Wundheilung ist die direkte Kommunikation zwischen Zellen über Gap Junctions (GJs), mit deren Hilfe sich ganze Zellpopulationen synchronisieren können. Veröffentlichungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass die zeitlich regulierte Expression des GJ-Bausteins Cx43 essentiell für den korrekten Ablauf der Wundheilung ist und dass diese in diabetischen Wunden gestört ist. Aus diesem Grund stellen Connexine einen neuen vielversprechenden Angriffspunkt in der Wundtherapieforschung dar (zur Übersicht siehe Bajpai et al. [2009]).

1.4 Connexine und Gap Junctions

Bei Connexinen (Cx) handelt es sich um eine Familie von integralen Membranproteinen, die sich durch vier Transmembrandomänen sowie eine intrazelluläre und zwei extrazelluläre Schleifen auszeichnen, wobei sich sowohl der C- als auch der N-Terminus im Cytoplasma befinden (Abb. 1.4 **A**). Connexine sind die Bausteine der Gap Junctions. Sechs Connexine bilden ein Connexon (Halbkanal) und zwei Connexone von benachbarten Zellen bilden einen vollständigen Kanal. Sowohl die Connexone als auch die GJ-Kanäle können aus einem oder verschiedenen Typen von Connexinen aufgebaut sein. Man bezeichnet sie dann als homo- bzw. heteromere Connexone bzw. homo- bzw. heterotypische Kanäle (Abb. 1.4 **B**). Die Zusammensetzung ist wichtig für die Durchlässigkeit der Gap Junctions (Goldberg et al. [2004]).

Gap Junctions sind Zell-Zell-Verbindungen, die den Austausch von kleinen Molekülen zwischen Zellen ermöglichen, indem sie einen im Durchmesser etwa 1,5 nm großen Kanal zwischen den Plasmamembranen benachbarter Zellen ausbilden (Abb. 1.4 **C**). Vor allem anorganische Ionen (K^+ , Ca^{2+}), Metabolite (Glucose) und *second messenger* (cAMP, cGMP, IP_3), die kleiner als 1800 Dalton sind, werden über diese Kanäle ausgetauscht, so dass die Zellen sowohl elektrisch als auch metabolisch miteinander verbunden sind (Kumar and Gilula [1996]; Dobrowolski and Willecke [2009]; Alberts et al. [2001]). Diese Art der Kommunikation zwischen benachbarten Zellen wird als *Gap Junctional Intercellular Communication* (GJIC) bezeichnet. In erregbaren Zellen wie Neuronen oder Cardiomyozyten vermitteln GJs die synchronisierte Potentialweiterleitung, in nicht-erregbaren Zellen bewirkt die Kopplung eine koordinierte Antwort auf externe Signale (zur

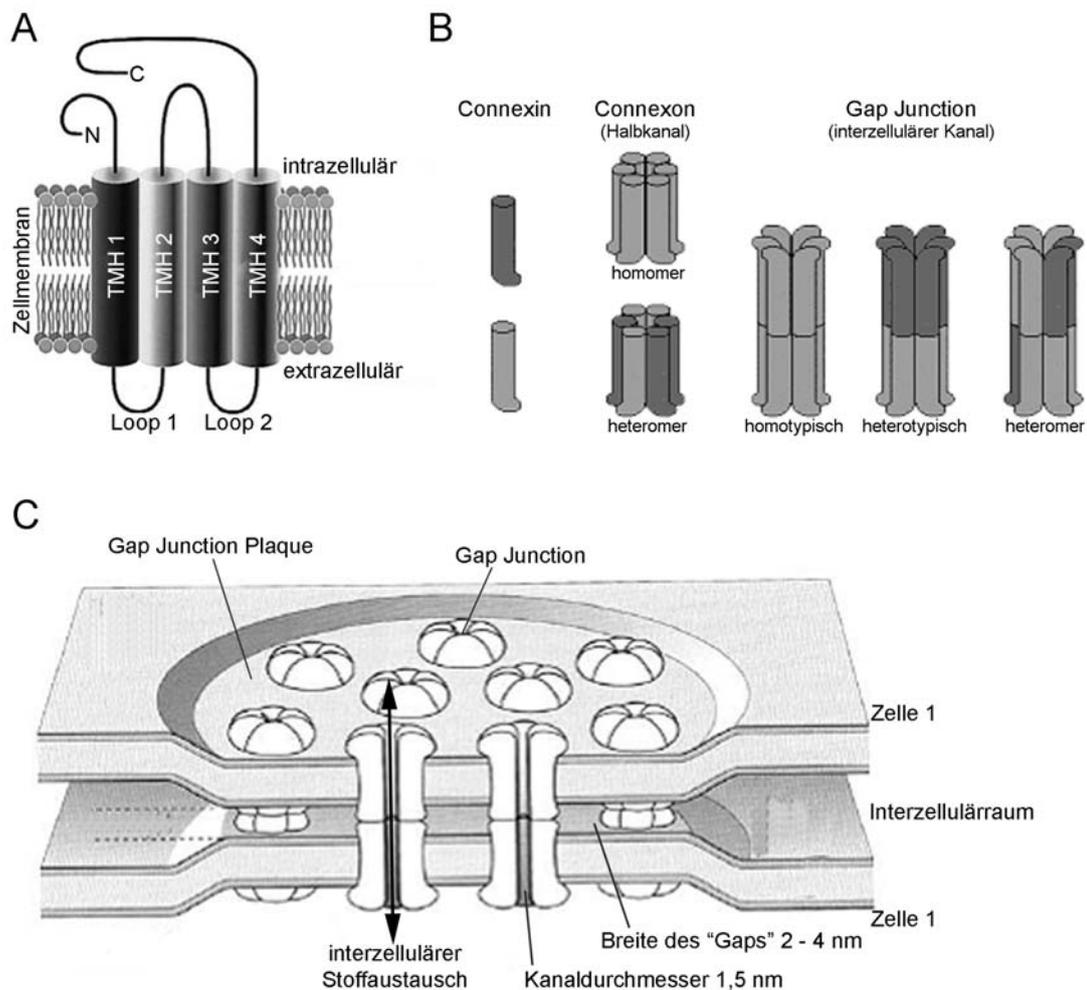


Abbildung 1.4: Der Aufbau von Gap Junctions aus Connexinen. (A) Schematische Darstellung eines Connexin-Proteins mit cytosolischem N- und C-Terminus, zwei extrazellulären *Loops* und vier Transmembranhelices (TMH 1 - 4; modifiziert nach Kumar and Gilula [1996]). (B) Schematische Darstellung von möglichen Cx-Zusammensetzungen von Connexonen (aus sechs Connexinen) bzw. Gap Junction Kanälen (aus zwei Connexonen; modifiziert nach Alberts et al. [2001]). (C) Schematische Darstellung von Gap Junction Kanälen zwischen zwei benachbarten Zellen, von denen jeweils ein Halbkanal gestellt wird. GJ Kanäle sind auf Zelloberflächen meist in größeren Ansammlungen von Kanälen, sogenannten *Plaques* zu finden (modifiziert nach Kandel et al. [1995]).

Übersicht siehe Mese et al. [2007]). GJs spielen bei der Embryonalentwicklung, Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose von Zellen eine wichtige Rolle, indem sie einzelnen Zellen erlauben, den Zustand der direkten Nachbarzellen zu ermitteln und sich daran anzupassen (Pitts et al. [1986]; Brissette et al. [1994]; Risek et al. [1998]; Lucke et al. [1999]; Saez et al. [2003]; Söhl and Willecke [2004]; Lairds [2006]). Abgesehen von einigen terminal differenzierten Zellen wie beispielsweise Skelettmuskelzellen, Erythrozyten und zirkulierenden Lymphozyten kommunizieren nahezu alle Körperzellen über Gap Junctions (Kumar and Gilula [1996]).

1.4.1 Biosynthese und Regulation von Connexinen

Sowohl die Assemblierung als auch die Degradation von Gap Junctions sind hochregulierte Prozesse, die einer ständigen Dynamik unterliegen und die Halbwertszeit eines einzelnen Cx-Proteins auf nur wenige Stunden begrenzen (Musil et al. [2000]). Die meisten Connexine werden co-translational in die Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER) integriert, wobei die Oligomerisierung von sechs Connexinen zu einem Connexon bereits im ER beginnt und im *trans*-Golgi-Netzwerk endet (Lairds [2006]; siehe Abbildung 1.5 **A**). Die fertigen Halbkanäle werden anschließend mit Hilfe von Vesikeln zur Zellmembran transportiert, in der sie frei bis zu Bereichen von Zell-Zell-Kontakten diffundieren können, wo sie mit einem Partner-Connexon von der benachbarten Zelle interagieren, um einen interzellulären Kanal zu formen (Harris [2001]). Der Abbau von Connexinen kann entweder über das Lysosom oder das Proteasom ablaufen (Qin et al. [2003]).

Die meisten Connexine sind Phosphoproteine, wobei die Phosphorylierung wichtig für die Regulation von Assemblierung und Modulation von GJs ist. Die Regulation über Phosphorylierung ist vor allem für Cx43 sehr gut untersucht. Das Protein weist drei, jeweils um 2–4 kDa verschobene elektrophoretische Isoformen auf, die als P0, P1 und P2 bezeichnet werden und sich in der Menge und Lokalisation von Phosphorylierungen unterscheiden (Solan and Lampe [2009]; siehe Abbildung 1.5 **B**). In der kutanen Wundheilung kommt der Phosphorylierung von Cx43 am Serin 368 (Ser³⁶⁸) eine besondere Bedeutung zu, die eine Inhibition der GJIC zur Folge hat und vermutlich zur Formation von abgeschlossenen Kommunikationskompartimenten in der Epidermis beiträgt (Richards et al. [2004]). Bei allen regulierenden Phosphorylierungen stellt die C-terminale Domäne von Cx43 den Angriffspunkt für verschiedene Proteinkinasen dar (Solan and Lampe [2009]). Sie variiert in

ihrer Länge und Sequenz stark von Cx zu Cx und ist zudem wichtig für die Interaktion mit anderen Proteinen. Im Gegensatz dazu sind die N-terminale Domäne sowie die Transmembranhelices in allen Mitgliedern der Cx-Familie hochkonserviert. Die extrazellulären Schleifen spielen eine Rolle in der Zell-Zell-Erkennung und beim *Docking*-Prozess von zwei Halbkanälen. Zudem enthalten sie jeweils sechs hochkonservierte Cysteinreste, die das Protein über intramolekulare Disulfidbrücken stabilisieren (Mese et al. [2007]).

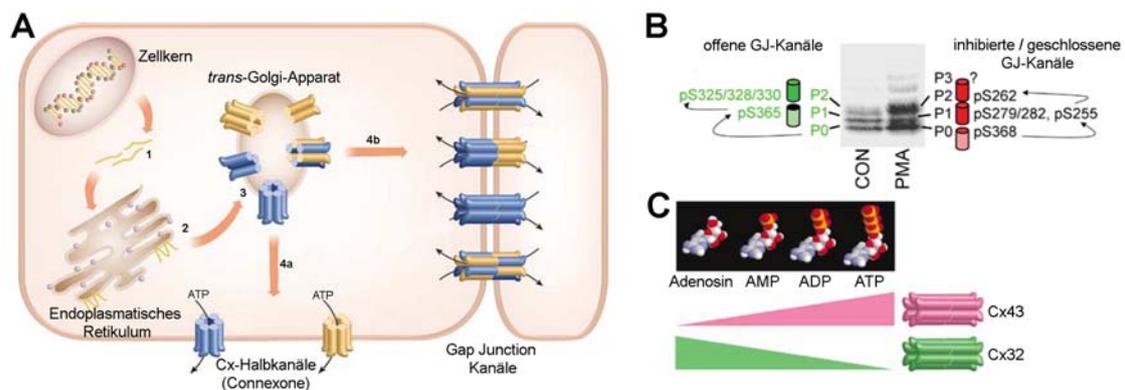


Abbildung 1.5: Biosynthese, Phosphorylierung und Permselectivität von Gap Junctions. (A) Biosynthese von Gap Junctions: Die im Zellkern transkribierte Cx-mRNA (1) wird an den Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulums translatiert und cotranslational in der Membran verankert (2). Die Zusammenlagerung von 6 Connexinen zu einem Connexon findet im *trans*-Golgi-Apparat statt (3). Von dort werden die Connexone zur Plasmamembran transportiert, wo sie entweder als Halbkanäle aktiv sein können (4a) oder in GJs eingebaut werden (4b; modifiziert nach Mese et al. [2007]). (B) SDS-PAGE Migration von Cx43 in homöostatischen (CON) und PMA-behandelten Zellen mit der jeweiligen Phosphorylierungsstelle. Phosphorylierung an verschiedenen Stellen hat entweder keinen Einfluss auf die GJIC (grün) oder führt zu inhierten oder geschlossenen GJ-Kanälen (rot; modifiziert nach Solan and Lampe [2009]). (C) Selektivität von Gap Junctions gegenüber *second messengern*. Cx43 und Cx32 zeigen unterschiedliche Permeabilität für Adenosin, AMP, ADP und ATP (modifiziert nach Mese et al. [2007]).

Beim Menschen sind zur Zeit 21 Connexine bekannt, die entsprechend ihres Molekulargewichts in Kilo-Dalton klassifiziert werden können (Willecke et al. [2002]; Saez et al. [2003]; Goodenough and Paul [2003]). Das am häufigsten vorkommende Connexin ist das Cx43, das in mindestens 34 Geweben und 46 Zelltypen zu finden ist (Lairds [2006]). Seine Bedeutung wird auch durch die Tatsache bestärkt, dass ein *Cx43-Knockout* im Mausmodell zum postnatalen Tod der Tiere führt (Reaume et al. [1995]). Nahezu alle Körperzellen exprimieren zu irgendeinem Zeitpunkt ihrer Entwicklung mindestens einen Connexin-Typ, es können jedoch auch mehrere Typen von einer Zellart gebildet werden (Mese et al. [2007]). Diese Co-Expression beeinflusst die Connexon-Zusammensetzung, die homomer oder heteromer sein kann, was sich wiederum auf die Durchlässigkeit der GJ Kanäle auswirkt (Segretain and Falk [2004]). Früher ging man davon aus, dass

es sich bei GJ um nicht-spezifische passive Poren handelt, die jegliche Passage von Ionen und Metaboliten kleiner 1,2 kDa erlauben (Simpson et al. [1977]). Neuere Daten zeigen jedoch eine selektive Permeabilität von GJ Kanälen, die als Permselectivität bezeichnet wird und sich, je nach Cx-Zusammensetzung, durch eine spezifische Durchlässigkeit für bestimmte Moleküle, nicht jedoch für Ionen auszeichnet. Die Permselectivität wird vermutlich durch Größe und Ladung des Moleküls bestimmt (Goldberg et al. [2004]; Harris [2001]). Beispielsweise sind Cx32-GJs sehr viel permeabler für Adenosin als Cx43-GJs. Im Gegensatz dazu zeigen Cx32-GJs kaum Durchlässigkeit für ATP, wohingegen Cx43-GJs für dieses Molekül sehr permeabel sind (Goldberg et al. [2002]; siehe Abbildung 1.5 C). Aus den möglichen Kombinationen von Connexinen ergeben sich folglich unterschiedliche Sets an Molekülen, die von Zellen ausgetauscht werden können, und dies könnte auch die spezifische Expression von Connexinen in unterschiedlichen Geweben erklären (Mese et al. [2007]).

1.4.2 Connexin-Halbkanäle

Connexine liegen in der Zelle jedoch nicht ausschließlich als vollständige Gap Junction Kanäle vor, sondern können auch als Connexone aktiv sein (Evans et al. [2006]; siehe Abbildung 1.5 A). Diese Halbkanäle stellen einen Weg dar, parakrine Signalmoleküle wie ATP, Glutamat NAD^+ und Prostaglandin E_2 aus der Zelle freizusetzen (Evans et al. [2006]). Die Öffnung von Cx-Halbkanälen findet *in vitro* als Reaktion auf die Veränderung äußerer Faktoren statt, beispielsweise im Fall von mechanischem Stress in Form von Scherkräften, ionischem oder ischämischen Stress. Zudem werden Halbkanäle von intrazellulären Signalen wie dem Membranpotential sowie dem Phosphorylierungs- oder Redoxzustand der Connexine beeinflusst. Es wird außerdem vermutet, dass Cx-Halbkanäle an der zellulären Calcium-Homöostase und der damit verbundenen Signaltransduktion beteiligt sind, da sie auf Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration mit unterschiedlicher Kanalöffnung reagieren (Evans et al. [2006]). Weitere Arbeiten lassen zudem auf eine Beteiligung an der Zell-Zell-Adhäsion und der Stabilisierung von Migrationswegen schließen (Prochnow and Dermietzel [2008]).

Cx-Halbkanäle haben auch noch weitere Funktionen, die unabhängig von der interzellulären Kommunikation sind. Neuere Studien konnten Halbkanäle auch im Nucleus und den Mitochondrien

von Zellen identifizieren. Hier sind sie vermutlich an der Regulation der Genexpression sowie des Zelltods beteiligt (Rodríguez-Sinovas et al. [2007]).

1.5 Connexine in der Haut

Auch die Keratinozyten in der Epidermis der Haut sind über Connexin-Kanäle miteinander verbunden. Die dadurch vermittelte Kommunikation ist wichtig für das Wachstum und die Differenzierung dieser Zellen. Während der epidermalen Morphogenese werden räumlich und zeitlich definiert Cx26, Cx30, Cx30.1, Cx30.3, Cx31, Cx32, Cx40, Cx43 und Cx45 exprimiert, wobei Cx43 vorherrscht (Richard [2000]; Di et al. [2001]; Moyer et al. [2002], siehe Abbildung 1.6). In nativer Haut von Nagern findet man Cx43 vor allem im *Stratum basale* und im unteren *Stratum spinosum*, während es in humaner Epidermis in allen lebenden Schichten zu finden ist, wobei die höchste Expression im oberen *Stratum spinosum* und die schwächste im *Stratum basale* vorliegt (Wilgenbus et al. [1992]; Salomon et al. [1994]; Goliger and Paul [1995]; Masgrau-Peya et al. [1997]; Saitoh et al. [1997]; Tada and Hashimoto [1997]; Coutinho et al. [2003]). Cx43 wird auch von Hautanhangsgebilden wie Schweißdrüsen und Haarfollikeln exprimiert (Salomon et al. [1994]).

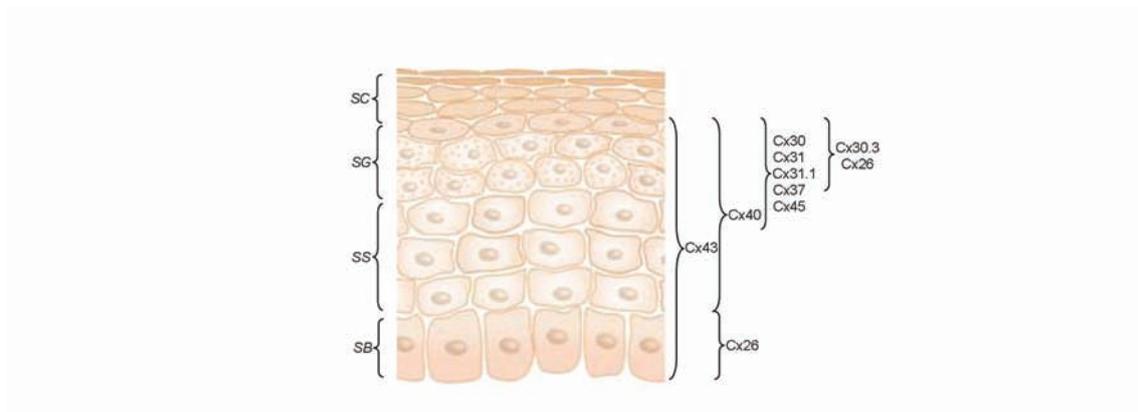


Abbildung 1.6: Expressionsmuster von Connexinen in der humanen Epidermis. (SC = *Stratum corneum*, SG = *Stratum granulosum*, SS = *Stratum spinosum*, SB = *Stratum basale*; modifiziert nach Mese et al. [2007].

Auch dermale Fibroblasten bilden Connexine, vor allem Cx40, Cx43 und Cx45 (Ko et al. [2000]; Wright et al. [2009]), obwohl sie in der Dermis meist als Einzelzellen vorliegen. Kommt es in der Wundheilung jedoch zur Bildung des Granulationsgewebes mit einer hohen Zelldichte, ist die Kommunikation zwischen Fibroblasten über Gap Junctions von großer Bedeutung. Diese Art der Kommunikation ermöglicht den Zellen, auf die sich verdichtenden Moleküle der extrazellulären

Matrix zu reagieren, und trägt somit zur Reifung des Granulationsgewebes bei (Moyer et al. [2002]).

1.5.1 Connexin-assoziierte Störungen

Die Spezifität von GJ-Kanälen wird durch die Tatsache bestätigt, dass Mutationen in einzelnen Cx-Genen in Verbindung mit einer Reihe von Krankheiten stehen, der Verlust einer Isoform also nicht notwendigerweise durch andere Cx-Typen kompensiert werden kann (Mese et al. [2007]). Interessanterweise sind viele dieser Störungen mit einem kutanen Phänotyp assoziiert. Beispielsweise führen Mutationen im Cx31- oder Cx30.3-Gen zu einer Genodermatose mit epidermaler Verhornungsstörung, die man als Erythrokeratoderma variabilis (EKV) bezeichnet. Cx26-basierte Störungen haben Taubheit zur Folge und können darüber hinaus mit Palmoplantar-Keratosen assoziiert sein. Cx30-Mutationen bewirken das Clouston-Syndrom, das auch als hidrotische ektodermale Dysplasie bezeichnet wird und durch Nageldystrophie, Hypotrichose und Hyperkeratose der Hand- und Fußflächen charakterisiert ist. Beschrieben ist auch eine Cx43-Mutation (oculodentale Dysplasie), die zu Palmoplantar-Keratosen und Hyperkeratosen im Gesichtsbereich, missgebildeten Zähnen und Haaren führt. Es wird vermutet, dass all diese Cx-assoziierten Störungen mit Hautbeteiligung nicht auf einen einfachen Verlust der GJ-Kanäle, sondern auf abnormale Cx-Funktionen zurückzuführen sind (Mese et al. [2007]).

1.5.2 Die Rolle von Connexinen in der kutanen Wundheilung

Während des Prozesses der Wundheilung kommt es zur (Hyper-)Proliferation, Migration sowie De- und Redifferenzierung von Zellen (Moulin [1995]; Smola et al. [2001]). Dafür ist die Kommunikation zwischen den unterschiedlichen Zellpopulationen in der Haut von großer Bedeutung. Bereits 1990 postulierten Larson *et al.*, dass diese Synchronisation durch die Kommunikation über Gap Junctions abläuft (Larson [1990]). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass GJs während der Wundheilung Veränderungen in der Migration (Huang et al. [1998]; Kwak et al. [2001]; Li et al. [2002]), Proliferation (Lucke et al. [1999]; Becker and Mobbs [1999]), Inflammation (Oviedo-Orta et al. [2000, 2001]) und Wundkontraktion (Bowman et al. [1998]) vermitteln. Dies geht einher mit Veränderungen der Connexin Expression in der Epidermis. Eine besondere Rolle kommt hier dem Cx43 zu. Nach einer Verwundung kommt es in der Haut von Nagern zu einer charakteristischen

Regulation von Cx43, wobei es in der initialen Phase der Wundheilung an den Wundrändern herunterreguliert wird. Diese Herunterregulation ist wichtig für den korrekten Ablauf der Wundheilung (Goliger and Paul [1995]). Tatsächlich zeigen Cx43-defiziente Mäuse eine beschleunigte Wundheilung (Kretz et al. [2003]). Wie die Regulation der Connexine in der Epidermis die Wundheilung vorantreibt, ist im Detail noch unbekannt. Einige Auswirkungen der Cx43-Herunterregulation auf die an der Wundheilung beteiligten Zellpopulationen beschrieben Mori *et al.* (2006) im murinen System. Mit Hilfe von *Antisense*-Oligonukleotiden, die einen *Knockdown* von Cx43 in der Wunde bewirken, konnten sie zeigen, dass dies zu einer erhöhten Proliferationsrate der Keratinozyten sowie zu einer verstärkten Fibroblasten-Migration führt. Zudem konnte eine reduzierte Immunantwort während der Inflammationsphase nachgewiesen werden (Mori et al. [2006]). Brandner *et al.* konnten an *ex vivo*-Modellen zeigen, dass Cx43 ebenso in der humanen Wundheilung eine entscheidende Rolle spielt. Auch hier wird es in der frühen Phase der Wundheilung (nach ca. 5–7 Stunden) am Wundrand herunterreguliert und erst wieder nach 5–6 Tagen reinduziert (Brandner et al. [2004]; siehe Abbildung 1.7).

Ein weiteres für die Wundheilung wichtiges Connexin ist das Cx26, das vor allem von hyperproliferativen Zellen exprimiert wird und somit eine Art Gegenspieler des Cx43 darstellt. In unverwundeter Haut wird Cx26 lediglich an Fußsohlen und Handflächen und vereinzelt in Haarfollikeln und Drüsen exprimiert. Im Fall einer Verwundung ist es jedoch immer, unabhängig von der Lokalisation der Wunde am Körper, von Bedeutung. Genau wie im Fall des Cx43 wird in der initialen Phase der Wundheilung kein Cx26 am Wundrand und der näheren Umgebung exprimiert. Dies gilt sowohl für kutane Wunden von Nagern und Menschen, als auch für das Zungenepithel beim Hamster (Goliger and Paul [1995]; Coutinho et al. [2003]; Brandner et al. [2004]; Saitoh et al. [1997]). Diese Abwesenheit von Connexinen am Wundrand zu Beginn der Regeneration scheint folglich wichtig für die Heilung zu sein, unabhängig von Spezies und Epitheltyp. Versetzt parallel zur Herunterregulation von Cx43 wird die Cx26-Expression zu späteren Zeiten (nach 18 Stunden) am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis, nicht jedoch am *leading edge*, induziert. In komplett regenerierter, aber noch nicht stratifizierter Epidermis (nach 5–6 Tagen) wird Cx26 in allen Schichten des Wundbereichs und des Wundrands exprimiert, wohingegen Cx43 nur sporadisch in einigen Zellen der regenerierenden Epidermis detektiert werden kann (Brandner et al. [2004]; siehe Abbildung 1.7).

Die Bedeutung der Connexin-Regulation für die kutane Wundheilung wird durch die Tatsache bestärkt, dass chronische Wundränder eine starke Expression sowohl von Cx43 als auch von Cx26 zeigen ((Brandner et al. [2004]); siehe Abbildung 1.7). Analoge Ergebnisse konnten auch für diabetische Mäuse gefunden werden. Hier kam es während der frühen Wundheilung sogar zu einer verstärkten Expression von Cx43 an den Wundrändern (Wang et al. [2007]).

All diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass die Herunterregulation von Cx43 am epidermalen Wundrand und die damit einhergehende reduzierte Kommunikation zwischen den Zellen ein zentraler Schritt in der Wundheilung ist. Dabei handelt es sich vermutlich um ein universelles Prinzip, das abgesehen von der Haut auch für weitere Epithelien wie Zunge und Cornea gilt (Matic et al. [1997]; Saitoh et al. [1997]). Die Hemmung der Cx43-Funktion stellt folglich einen vielversprechenden neuen Ansatzpunkt für die Wundtherapie dar.

1.6 Manipulation der Cx43-Funktion

Um die Cx43-Expression bzw. dessen Funktion aktiv zu hemmen und dadurch eine Beschleunigung der Wundheilung zu erreichen, gibt es zwei Möglichkeiten. Man unterscheidet das *Targeting* der Cx43-Expression auf mRNA-Ebene mittels spezifischer *Antisense*-Oligonukleotide und die Hemmung der Cx-Funktion auf Proteinebene mit Hilfe von Cx-mimetischen Peptiden.

1.6.1 Cx43-spezifische *Antisense*-Oligonukleotide

Eine Möglichkeit des spezifischen und effizienten *Knockdowns* der Proteinexpression bietet die Verwendung von *Antisense*-Oligonukleotiden, deren Entdeckung auf Paterson et al. zurückgeht (Paterson et al. [1977]). Dabei handelt es sich um einzelsträngige DNA mit einer Länge von etwa 18–30 Nukleotiden, deren Sequenz komplementär zu bestimmten Bereichen einer Ziel-mRNA ist, an die sie über spezifische Basenpaarung bindet. Infolgedessen wird entweder die Translation durch sterische Hinderung blockiert oder es kommt zum Abbau der mRNA durch eine Aktivierung der RNaseH durch den DNA-RNA-Duplex.

Auch zum *Knockdown* von Cx43 wird diese Technik schon seit längerem verwendet. Die ersten Studien zeigten vor allem den Effekt von Cx43-spezifischen *Antisense*-Oligonukleotiden (Cx43as-ODNs) auf die Farbstoffausbreitung zwischen Zellen *in vitro* (Moore and Burt [1994]).

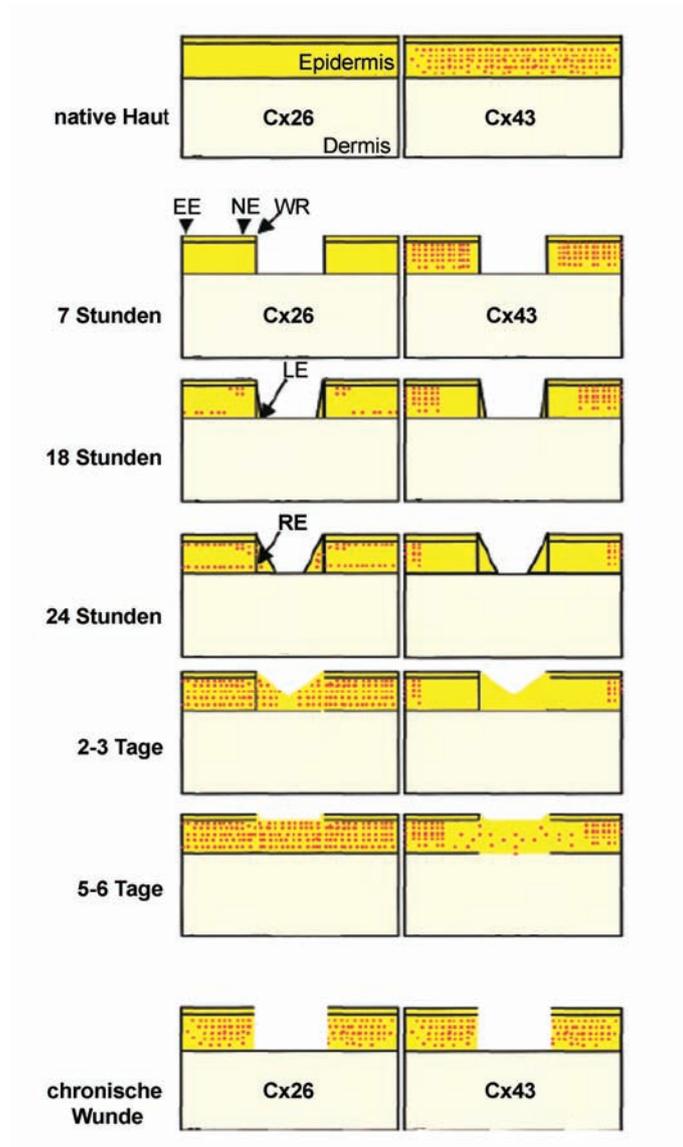


Abbildung 1.7: Regulation der epidermalen Cx26- und Cx43-Lokalisation während der Wundheilung. Schematische Darstellung der Cx26- und Cx43-Lokalisation (rote Punkte) in nativer humaner Haut, an akuten Wundrändern zu verschiedenen Zeitpunkten (7h, 18h, 24h, 2-3d, 5-6d) und an nicht-heilenden chronische Wundrändern (EE = entfernte Epidermis, NE = nahe Epidermis, WR = Wundrand, LE = *leading edge*, RE = regenerierende Epidermis; modifiziert nach Brandner et al. [2004])

Im Folgenden konnte mit Hilfe dieser Technologie die Bedeutung von Cx43 für die Embryonalentwicklung beschrieben werden (Becker et al. [1999b]). Auch in der Wundheilungsforschung finden Cx43as-ODNs bereits Anwendung. Je nach Sequenz kann eine signifikante Herunterregulation von Cx43-Protein und -mRNA *in vivo* in verwundeter Ratten-Cornea induziert werden (Law et al. [2006]). Die Applikation von Cx43as-ODNs in murine kutane Wunden resultierte in eine signifikant schnellere Wundheilung, sowohl von Inzisionen als auch von Exzisionen (Qiu et al. [2003]; Coutinho et al. [2005]). Eine beschleunigte Wundheilung konnte auch in Wunden von diabetischen Ratten erreicht werden (Wang et al. [2007]).

1.6.2 Cx43-mimetische Peptide

Eine weitere Möglichkeit zur Inhibition der Cx43-Funktion ist das Cx-mimetische Peptid Gap27, das zur spezifischen Inhibition der Kommunikation durch Gap Junctions entwickelt worden ist. Dabei handelt es sich um ein kurzes synthetisches Peptid mit einer Länge von 11 Aminosäuren, das eine Sequenzhomologie zum zweiten extrazellulären *Loop* des Cx43-Proteins aufweist. Cx-mimetische Peptide stellen einen weniger invasiven Weg dar als Cx43as-ODNs, da sie die Expression des Cx-Proteins selbst, und damit mögliche kommunikationsunabhängige Funktionen, nicht beeinflussen. Stattdessen blockieren sie *in vitro* spezifisch und reversibel die Cx-vermittelte Kommunikation (Evans and Boitano [2001]), was bereits für zahlreiche Zelltypen beschrieben wurde (Evans and Leybaert [2007]). Der exakte Wirkmechanismus der Peptide ist bisher noch unklar, basiert aber entweder auf der Regulierung des Kanalauf und -abbaus oder beeinflusst direkt bereits bestehende Gap Junctions bzw. Halbkanäle (Evans and Leybaert [2007]).

Cx-mimetische Peptide besitzen hohes therapeutisches Potential zur Behandlung von Wunden in verschiedenen Geweben wie beispielsweise zur Beschleunigung der Heilung nach Verletzungen des Rückenmarks sowie nach Herz- oder Hirninfarkten (O'Carroll et al. [2008]; Evans et al. [2006]). Es existieren bereits Studien, die Gap27 als vielversprechenden Kandidaten auch für die kutane Wundtherapie identifizieren. In murinen dreidimensionalen organotypischen Hautmodellen führte die Applikation von Gap27 zu einer signifikanten Beschleunigung der Wundheilung und in primären murinen Keratinozyten zu einer signifikant reduzierten GJIC bei gleichbleibender Cx43-Expression (Kandyba et al. [2007]). Kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit wurde publiziert, dass Gap27 *in*

in vitro die Migration von humanen infanten Keratinozyten und Fibroblasten beschleunigt (Wright et al. [2009]).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Verlauf der kutanen Wundheilung kommt es am Wundrand zu einer zeitlich regulierten Herunterregulation von Connexin 43. Dieser Vorgang beeinflusst zelluläre Prozesse der Wundheilung wie die Migration und Proliferation von Fibroblasten und Keratinozyten. Die Tatsache, dass die Cx43-Regulation am Rand von chronischen Wunden (z.B. diabetischen Wunden) gestört ist, verdeutlicht seine Bedeutung für den Ablauf des Wundheilungsprozesses. Aus diesem Grund stellt Cx43 ein vielversprechendes *Target* für die Wundheilungsforschung dar, das entweder auf mRNA- oder auf Proteinebene manipuliert werden kann. Hierzu haben sich grundsätzlich zwei Methoden etabliert: der *Knockdown* der Cx43-Expression mit Hilfe von spezifischen *Antisense*-Oligonukleotiden und die Hemmung der Cx-Funktion mittels Cx-mimetischer Peptide. Ein wundheilungsfördernder Effekt dieser Methoden war zu Beginn dieser Arbeit lediglich in Nagern gezeigt worden. In der vorliegenden Arbeit sollen nun die molekularen und zellulären Auswirkungen des Cx-mimetischen Peptids Gap27 auf humane Zellen sowie humane und porcine dreidimensionale *ex vivo* Wundheilungsmodelle untersucht werden. Da die potentielle Zielgruppe für eine mögliche Wundbehandlung in erster Linie ältere Menschen umfasst, muss das System, neben den in der dermatologischen Forschung häufig verwendeten infanten Vorhaut-Zellen, auch für adulte Zellen validiert werden. Ein großer Prozentsatz der Patienten mit chronischen Wunden leidet an Diabetes Typ II und frühere Arbeiten unserer Gruppe konnten zum Teil starke Unterschiede zwischen Zellen diabetischer und nicht-diabetischer Herkunft zeigen. Aus diesem Grund soll hier speziell die Wirkung von Gap27 auf adulte Keratinozyten und Fibroblasten untersucht werden, die aus Hautbiopsien adulter diabetischer und nicht-diabetischer Spender isoliert worden sind. Um tiefgehendere Schlüsse auf den Wirkmechanismus des Cx43-*Targetings* ziehen zu können, werden zusätzlich Versuche mit Cx43-spezifischen *Antisense*-Oligonukleotiden durchgeführt.

Kapitel 2

Material

Die verwendeten Chemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad bezogen. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle aufgeführten Puffer und Lösungen in *Aqua bidest.* angesetzt und der pH-Wert mit Hilfe von 25%iger Salzsäure eingestellt. Für die Zellkulturarbeiten wurde grundsätzlich steriles PBS von der Firma Biochrom AG verwendet.

2.1 Geräte

Gerätename	Gerätetyp	Hersteller
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
Digitalkameras	Camedia C-5050 C 4742-95	Olympus Deutschland GmbH (Heidelberg, DE) Hamamatsu (Hamamatsu, Japan)
Drehschüttler	Tiny Turner	CTI (Idstein, DE)
Entwicklungsgerät für Western Blot Filme	Curix 60	Agfa (Berlin, DE)
Feinwaage	ISO 9001	Sartorius (Hannover, DE)
Heizblock	Dri-Block DB-3	Techne (Cambridge, UK)
Heizmagnetrührer	MR 3001	Heidolph (Schwabach, DE)
Kryostat	CM 3050	Leica (Nussloch, DE)
Mikroskope	Axioplan 2 (Fluoreszenz) DMIL (Licht-, invers) DMLS (Licht-, aufrecht)	Zeiss (Göttingen, DE) Leica (Nussloch, DE) Leica (Nussloch, DE)
pH-Meter	766 Calimatic	Knick (Berlin, DE)
Photometer	Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech (Freiburg, DE)
Reinstwasseranlage	Astacus LS TI	Membrapure GmbH (Bodenheim, DE)
Röntgenröhre	RS 225	Gulmay
Schüttler	KS250	IKA Labortechnik (Staufen, DE)
Sterilwerkbank	Hera Safe 12	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
Vortexer	REAXtop	Heidolph (Schwabach, DE)

Waage	BI 3100	Sartorius (Hannover, DE)
Wippschüttler	Silent Rocker	CTI (Idstein, DE)
Zentrifugen	Laborfuge 400e	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
	Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus Instruments (Hanau, DE)

2.2 Material

Substanz

Aceton
 Acrylamid
 Adenin
 Ammoniumpersulfat (APS)
 Bacitracin
 β -Mercaptoethanol
 Bisacrylamid
 BSA (Bovines Serum Albumin)
 Calcein AM
 Calciumchlorid (5 M)
 Chemilumineszenz-Substrat
 Cholera toxin
 Coomassie Brilliant Blau G250
 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)
 D-Glucose
 di-Natriumhydrogensulfat-DiHydrat
 DMEM Zellkulturmedium
 DMF (Dimethylformamid)
 DMSO (Dimethylsulfoxid)
 EDTA Versen (zellkultur-getestet)
 EDTA
 EGF (Epidermal Growth Factor)
 Eosin G
 Essigsäure
 Ethanol (reinst)
 Ethanol (vergällt)
 Eukitt
 Fluoromount G
 Fötale Kälberserum
 Glycerin
 Glycin
 HAM's F12 Kulturmedium
 Hämalunlösung nach Mayers
Human Matrix Metalloprotease Antibody Array 1
 Hydrocortison
 Igepal
 Insulin
 Isopentan
 Isopropanol
 Kaliumchlorid

Hersteller

Geyer Hamburg GmbH (Hamburg, DE)
 Serva (Heidelberg, DE)
 Boehringer (Ingelheim, DE)
 Serva (Heidelberg, DE)
 Sigma (Taufkirchen, DE)
 Fluka (Taufkirchen, DE)
 Serva (Heidelberg, DE)
 Roche (Mannheim, DE)
 Invitrogen (Karlsruhe, DE)
 Promocell (Heidelberg, DE)
 Thermo Scientific (Schwerte, DE)
 Sigma (Taufkirchen, DE)
 Fluka (Taufkirchen, DE)
 Roche (Mannheim, DE)
 Sigma (Taufkirchen, DE)
 Merck (Darmstadt, DE)
 Biochrom AG (Berlin, DE)
 Merck (Darmstadt, DE)
 Merck (Darmstadt, DE)
 Biochrom AG (Berlin, DE)
 Merck (Darmstadt, DE)
 Sigma (Taufkirchen, DE)
 Chroma-Gesellschaft (Münster, DE)
 Riedel-de Haen (Seelze, DE)
 Merck (Darmstadt, DE)
 Walter CMP GmbH (Hamburg, DE)
 Kindler GmbH (Freiburg, DE)
 Southern Biotech (Eching, DE)
 Invitrogen (Karlsruhe, DE)
 Roth (Karlsruhe, DE)
 Roth (Karlsruhe, DE)
 Biochrom AG (Berlin, DE)
 Merck (Darmstadt, DE)
 RayBio (Norcross, USA)
 Sigma (Taufkirchen, DE)
 Sigma (Taufkirchen, DE)
 Sigma (Taufkirchen, DE)
 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
 Merck (Darmstadt, DE)
 Merck (Darmstadt, DE)

Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, DE)
<i>Keratinocyte Basal Medium 2</i>	Promocell (Heidelberg, DE)
<i>Keratinocyte Growth Supplements</i>	Promocell (Heidelberg, DE)
Kochsalzlösung, isoton	Baxter Deutschland GmbH (Unterschleißheim, DE)
Leupeptin	Sigma (Taufkirchen, DE)
L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin, DE)
Lucifer Yellow	Sigma (Taufkirchen, DE)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe, DE)
Methanol	Mallinckrodt Baker (Deventer, Niederlande, DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Mallinckrodt Baker (Deventer, Niederlande)
Natrium-Deoxycholat	Sigma (Taufkirchen, DE)
Nitrozellulosemembran (0,45 µm)	Bio-Rad (München, DE)
<i>Normal Goat Serum</i> (NGS)	Dianova (Hamburg, DE)
PBS, steril	Biochrom AG (Berlin, DE)
Penicillin	Grünenthal GmbH (Aachen, DE)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG (Berlin, DE)
Pepstatin	Sigma (Taufkirchen, DE)
Petroleumbenzin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE)
Phosphorsäure (88%)	Riedel-de Haen (Seelze, DE)
<i>Pluronic F-127</i>	Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma (Taufkirchen, DE)
Ponceau S	Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE)
Propidium Iodide Buffer	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
Protein-Größenstandard (<i>Spectra Multicolor Broad Range</i>)	Bio-Rad (München, DE)
RPMI Zellkulturmedium	Biochrom AG (Berlin, DE)
Salzsäure (HCl)	Riedel-de Haen (Seelze, DE)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Bio-Rad (München, DE)
Streptomycin	Grünenthal GmbH (Aachen, DE)
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Fluka (Taufkirchen, DE)
Triiodothyronin	Sigma (Taufkirchen, DE)
Tris (Trizma Base)	Sigma (Taufkirchen, DE)
TRITC-Dextran	Sigma (Taufkirchen, DE)
Triton X-100	Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE)
Trypanblau	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
Trypsin (2,5 %)	Biochrom AG (Berlin, DE)
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)	Biochrom AG (Berlin, DE)
Tween	Merck (Darmstadt, DE)
Wasser, DEPC-behandelt	Eppendorf (Hamburg, DE)
Xylol	Mallinckrodt Baker (Deventer, Niederlande)

2.3 DNA-Oligonukleotide

Die verwendeten DNA-Oligonukleotide (ODNs) wurden von der Firma Metabion International AG (Martinsried, Deutschland) bezogen. Die im lyophilisierten Zustand gelieferten ODNs wurden für die spätere Verwendung in DEPC-Wasser gelöst und bei -20°C gelagert. Es wurden *Antisense*-Sequenzen getestet, die gegen zwei unterschiedliche Lokalisationen auf der Cx43-mRNA gerichtet waren (DB1 bzw. as605) und die aus der Literatur bekannt sind (Becker et al. [1999b]; Law et al. [2006]). Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms BLAST (NCBI) an die jeweiligen mRNA-Sequenzen von Mensch (hu), Maus (ms) und Schwein (sw) angeglichen. Zu jeder *Antisense*-Sequenz (as) wurde eine entsprechende *Sense*-Kontrolle (s) verglichen. Sowohl für die Anwendung in den porcinen *ex vivo* Wundmodellen als auch für die *in vitro* Versuche wurden Konzentrationen von 20 µM eingesetzt. Für die Applikation der ODNs im Gel wurde 30 % Pluronic F-127 (w/v) in DEPC-Wasser angesetzt und bei 4°C gehalten, so dass es in einer dickflüssigen Konsistenz vorlag. Die ODNs wurden im Gel auf 20 µM verdünnt und zügig in die Wundmodelle appliziert, wobei die Pipettenspitzen zuvor bei -20°C gekühlt wurden.

Tabelle 2.1: Sequenzen der verwendeten DNA-Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotid	Sequenz (5'→ 3')
DB1-hu <i>Antisense</i>	GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC
DB1-hu <i>Sense</i>	GAC AGA AAC AAT TCT TCT TGC CGC AAT TAC
DB1-ms <i>Antisense</i>	GTA ATT GCG GCA GGA AGA ATT GTT TCT GCT
DB1-ms <i>Sense</i>	AGC AGA AAC AAT TCA TCT TGC CGC AAT TAC
DB1-sw <i>Antisense</i>	GTA ATT GCG GCA GGA AGA ATT GTT TCT GTC
DB1-sw <i>Sense</i>	GAC AGA AAC AAT TCA TCT TGC CGC AAT TAC
a1605-hu <i>Antisense</i>	TCC GTG GGG CGA GAG AGG A
a1605-hu <i>Sense</i>	T CCT CTC TCG CCC CAC GGA
a1605-ms <i>Antisense</i>	TCC GTG GGA CGT GAG AGG A
a1605-ms <i>Sense</i>	T CCT CTC ACG TCC CAC GGA
a1605-sw <i>Antisense</i>	TCC GTG GGA CGA GAG AGG A
a1605-sw <i>Sense</i>	T CCT CTC TCG TCC CAC GGA

2.4 Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH (Heidelberg, Deutschland) synthetisiert und im lyophilisierten Zustand geliefert. Das Cx-mimetische Peptid

Gap27 mit der Sequenz SRPTEKTIFII ist gegen den zweiten extrazellulären *Loop*, das Kontrollpeptid Gap18 mit der Sequenz MGDWSALGKLLDKVQAC gegen zytoplasmatische Bereiche des Cx43 Proteins gerichtet (Evans and Boitano [2001]; Oviedo-Orta et al. [2002]). Die Peptide wurden vor Gebrauch in DMF gelöst, die gewünschte Konzentration anschließend mit PBS eingestellt und bei -20°C gelagert. Für die Anwendung in den porcinen *ex vivo* Wundmodellen betrug die Konzentration 600 µM, für die *in vitro* Versuche wurden Konzentrationen von 6, 60 und 600 µM eingesetzt.

2.5 Antikörper

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen für Immunfluoreszenz (IF) und Western Blot (WB).

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Meerschweinchen anti Connexin 26	IF (Zellen) 1:200 IF (Gewebe) 1:200 WB 1:200	eigene Herstellung (Brandner et al. [2004])
Maus anti Connexin 43	IF (Zellen) 1:50 IF (Gewebe) 1:100	BD Transduction Laboratories (#610061)
Kaninchen anti Connexin 43	WB 1:200	Santa Cruz Biotechnology (#sc-6560)
Kaninchen anti Connexin 43 PS368	IF (Gewebe) 1:50 WB 1:40	Cell Signaling Technology (#3511)
Kaninchen anti Fibronectin	WB 1:200	antikörper-online.de (#ABIN93753)
Maus anti Ki67	IF (Zellen) 1:20 IF (Gewebe) 1:50	Dako (#M7240)
Maus anti α-Tubulin	WB 1:200	Calbiochem (#CP06)

Als Negativkontrollen in der Immunfluoreszenz dienten Antikörper-Isotypen von der Firma Dako (Hamburg), die entsprechend der Proteinkonzentration des Primärantikörpers eingesetzt wurden.

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen für Immunfluoreszenz (IF) und Western Blot (WB)

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti Maus Alexa-Fluor 594 F(ab) ₂	IF 1:1250	Invitrogen
Ziege anti Kaninchen Alexa-Fluor 594 F(ab) ₂	IF 1:1250	Invitrogen
Ziege anti Meerschweinchen Alexa-Fluor 488 (H + L)	IF 1:600	Invitrogen
Ziege anti Maus MRP	WB 1:5000	Dako
Ziege anti Meerschweinchen MRP	WB 1:5000	Dako
Ziege anti Kaninchen MRP	WB 1:5000	Dako

2.6 Zellen und Gewebe

2.6.1 Zellen

Für die *in vitro* Versuche wurden primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft verwendet. Infante Zellen wurden aus infanten Vorhäuten isoliert, die vom Kinderkrankenhaus Altona bezogen wurden. Die Verwendung der Proben wurde autorisiert vom Ethikkomitee der Ärztekammer Hamburg (060900). Adulte Hautbiopsien zur Anzucht von Zellen stammten von freiwilligen Spendern. Die Probenentnahme wurde autorisiert von der Ethikkommission der Universität Magdeburg. Es handelte sich um 14 Nicht-Diabetiker (5 Frauen, 9 Männer, Durchschnittsalter 52 ± 10 Jahre, durchschnittlicher HbA1C-Wert $5,59 \pm 0,4$ %) und um 12 Diabetiker (3 Frauen, 9 Männer, Durchschnittsalter 64 ± 9 Jahre, durchschnittlicher HbA1C-Wert: $7,44 \pm 1,1$ %, durchschnittliche Dauer des Diabetes: 12 ± 5 Jahre), die zuvor entsprechend der Ethik aufgeklärt wurden.

2.6.2 *Ex vivo* Wundheilungsmodelle

Für die Wundheilungsversuche wurden porcine und humane *ex vivo* Wundheilungsmodelle (WHM; Patentnummer DE10317400) verwendet. Das porcine Gewebe stammte von etwa 6 Monate alten Hausschweinen (*Sus scrofa domestica*, Kreuzung zwischen Yorkshireschwein und deutschem Edelschwein) und wurden von der Schlachterei Hoose (22941 Hammoor) zur Verfügung gestellt.

Bei den humanen Hautproben handelte es sich um Material aus abdominoplastischen Eingriffen, die in einer Praxis für plastische Chirurgie in Hamburg durchgeführt worden waren. Die Proben stammten von insgesamt 3 Spendern (3 Frauen, 0 Männer, Durchschnittsalter 39 ± 2 Jahre). Die Verwendung der Proben wurde autorisiert vom Ethikkomitee der Ärztekammer Hamburg (060900).

2.7 Software

Zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Software Openlab 2.0.4 (Fa. Improvion, Coventry, UK) eingesetzt. Für die digitale Datenverarbeitung wurden die Microsoft Office Programme MS Word, MS Excel und MS Powerpoint verwendet. Optische Auswertungen (Mi-

grationsassays, Cytokin-Arrays, Farbstoffausbreitung im Wundmodell) wurden mit Hilfe der Software ImageJ (NIH) vorgenommen. Für die Sequenzvergleiche der Cx43-Sense- und -Antisense-Oligonukleotide wurde das Programm BLAST verwendet, das auf der Homepage von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) zur Verfügung gestellt wird.

2.8 Statistische Auswertungen

Ausgewertete Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistischen Signifikanzen wurden mit Hilfe des gepaarten und ungepaarten Student's t-Test berechnet, wobei ein p-Wert kleiner als 0,05 als signifikant definiert wurde.

Kapitel 3

Methoden

3.1 Zell- und Gewebekultur

3.1.1 Herstellung und Kultivierung von *ex vivo* Wundmodellen

Kulturmedium

angesetzt in DMEM

FCS	2 %
Penicillin/Streptomycin	100 Units/ml
Hydrocortison	0,2 µg/ml

Die Herstellung der *ex vivo* Wundmodelle (WHM) erfolgte aus den Ohren frischgeschlachteter Schweine. Dazu wurden die Ohren zunächst mit Leitungswasser gesäubert und mit einer Schere von Haaren befreit. Anschließend wurden mit Desinfektionsmittel (Sterillium) getränkte Mullbinden für ca. 10 Minuten auf der Ohrinnenfläche inkubiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank, nachdem das Desinfektionsmittel mit steriler Kochsalzlösung abgespült worden war. Entlang der Plicae wurden nun Stanz-Biopsien mit einem Durchmesser von 6 mm gesetzt und mit einer Schere entnommen. Jede Stanze wurde einzeln von Fettgewebe und Haaren befreit. Um Wunden in den Hautmodellen zu generieren, wurde in der Mitte der 6 mm Stanzbiopsie eine weitere Stanzbiopsie mit einem Durchmesser von 3 mm entnommen, indem in diesem Bereich die Epidermis sowie der obere Teil der Dermis entfernt wurden. Die Kultivierung der Wundmodelle erfolgte in 12-Well-Schalen (Falcon). In jedes Well wurde ein zurechtgeschnittenes Stück Mullbinde (ca. 1 cm²) gelegt und dann mit Medium bedeckt. Somit hatten die Wundmodell, die auf die Mullbinde aufgelegt wurden, lediglich mit der dermalen Seite

Kontakt zum Medium, während die Epidermis Luftkontakt besaß. Diese Art der Kultivierung bezeichnet man als *Air-Liquid-Interface* und wird verwendet, um die normale Umgebung der Haut zu simulieren. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 10% CO₂ sowie 85 %iger Luftfeuchtigkeit über einen Zeitraum von bis zu 48 Stunden. Während dieser Zeit setzt in den Wundmodellen ein Wundheilungsprozess ein, in dessen Verlauf eine neue Epidermis im Wundbereich gebildet wird. Um den Wundheilungsprozess über einen begrenzten Zeitraum zu untersuchen, wurden die kultivierten Wundmodelle nach unterschiedlichen Inkubationszeiten abgestoppt. Dazu wurden die Modelle in Isopentan schockgefroren, das zuvor in Flüssigstickstoff vorgekühlt worden war. Die Lagerung der Modelle erfolgte anschließend bei -80°C.

Um zu untersuchen, wie sich das Cx-mimetische Peptid Gap27 bzw. Cx43-spezifische *Anti-sense*-Oligonukleotide auf die Wundheilung dieser Modelle auswirken, wurden direkt nach Verwendung 5 µl Peptid- bzw. ODN-Lösung in die Wunde appliziert. Diese Behandlung wurde alle 24 Stunden wiederholt.

3.1.2 Bewertungssystem der *ex vivo* Wundheilungsmodelle

Die bei -80°C gelagerten WHM dienten zur Anfertigung von Gefrierschnitten aus dem Bereich der Wundmitte (Abschnitt 3.2), die anschließend mittels der HE-Methode (Abschnitt 3.2) angefärbt wurden. Die Bewertung der Wundheilung erfolgte verblindet unter dem Lichtmikroskop nach folgendem *Score*-System, wobei auch die Vergabe von zwischen den ganzzahligen Werten liegenden *Scores* möglich war (siehe auch Brandner et al. [2006]):

- 0 = keine regenerierende Epidermis
- 1 = beginnende regenerierende Epidermis
- 2 = längere regenerierende Epidermis
- 3 = geschlossene einschichtige regenerierende Epidermis
- 4 = geschlossene mehrschichtige regenerierende Epidermis

Pro Schwein wurden alle Proben in Dreifachbestimmung angesetzt und pro Modell wurden drei Schnitte ausgewertet.

3.1.3 *Ex vivo*-Kommunikationsassay

Die *ex vivo* WHM wurden direkt nach der Verwundung mit 5 μ l Gap27, Gap18 (600 μ M) oder PBS behandelt und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die jeweiligen Substanzen aus den Modellen abpipettiert und durch Farbstofflösungen ersetzt, die für 5 Minuten auf den Modellen belassen wurden. Dabei handelte es sich um Lucifer Yellow (4% w/v) und ein 4 kDa großes TRITC-Dextran (25 mg/ml), die zuvor zusammen in PBS gelöst und in die Wunde pipettiert worden waren. Zur Kontrolle wurden Modelle direkt nach der Verwundung mit der Farbstofflösung behandelt. Nach der Inkubation wurden die WHM eingefroren wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Die Farbstoffausbreitung wurde dann in Gefrierschnitten der Modelle am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Hierfür wurden Digitalbilder des Wundrandes aufgenommen, wobei die Belichtungszeit und sonstige Einstellungen für alle Bilder konstant gehalten wurden. Mit Hilfe des Programms ImageJ (NIH) und der Programmfunktion *segmented lines* konnte die Ausbreitungsdistanz der Farbstoffe vom Wundrand in die Epidermis hinein gemessen werden, indem ein Intensitätsgrad des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes in diesem Bereich erstellt wurde. Ein Level von 50% der am Wundrand gemessenen Fluoreszenzintensität wurde als Grenze der Farbstoffausbreitung definiert. Für jedes WHM wurden vier Schnitte in der 25-fachen Vergrößerung fotografiert und ausgemessen.

3.1.4 Anzucht humaner Fibroblasten aus infanten Vorhäuten und adulten Hautbiopsien

Kulturmedium (RPMI-komplett)

angesetzt in RPMI 1640

FCS	10 %
L-Glutamin	2 mM
Penicillin/Streptomycin	100 Units/ml

Die Anzucht von humanen Fibroblasten erfolgte aus *Explant*-Kulturen. Hierfür wurde das jeweilige Gewebestück (infante Vorhaut bzw. 4mm-Hautstanze) zunächst vom subkutanen Fett befreit und anschließend mit einem Skalpell in etwa (1 mm²) große Stückchen geschnitten. Diese wurden in eine 25 cm² Kulturflasche (Falcon) mit 2,5 ml RPMI komplett Medium überführt und für mindestens 6 Tage (bei adulter Haut 14 Tage) im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 %iger Luftfeuchtigkeit unberührt inkubiert. Während dieser Zeit wuchsen Fibroblasten aus den Gewebestückchen in

das Kulturgefäß aus. Zeigte sich nach der Anwachszeit bereits eine gute Auswachsrate, erfolgte ab diesem Zeitpunkt dreimal pro Woche ein Mediumwechsel. Die Subkultivierung erfolgte wie im Abschnitt 3.1.9 beschrieben. Hierbei blieben die Gewebestückchen weiterhin am Boden des Kulturgefäßes haften und konnten zur Anzucht einer weiteren Primärkultur dienen. Fibroblasten dienten außerdem zur Herstellung eines *Feederlayers* (siehe Abschnitt 3.1.5), der für die Anzucht adulter Keratinozyten benötigt wurde.

3.1.5 Herstellung eines *Feederlayers*

Für optimale Wachstumsbedingungen wurden adulte Keratinozyten auf einem *Feederlayer* (Fütterungszellen) aus primären humanen Fibroblasten angezüchtet. Diese Zellen wurden zuvor in normalem Fibroblasten-Kulturmedium angezüchtet (siehe Abschnitt 3.1.4) und durch Bestrahlung in einen postmitotischen Zustand versetzt (siehe Abschnitt 3.1.12). Zwei Tage nach der Bestrahlung konnten die Zellen als *Feederlayer* eingesetzt werden und waren etwa vier Wochen haltbar. Zur Anzucht von adulten Keratinozyten wurden die *Feederlayer*-Fibroblasten in einer Zelldichte von $4,2 \times 10^3$ Zellen/ml auf einer 3,5 cm Petrischale (Falcon) ausgesät.

3.1.6 Anzucht humaner Keratinozyten aus infanten Vorhäuten

Keratinocyte Growth Medium (KGM)

angesetzt in *Keratinocyte Basal Medium 2*

BPE	4 µg/ml
EGF	0,125 ng/ml
Insulin	5 µg/ml
Hydrocortison	0,33 µg/ml
Epinephrin	0,39 µg/ml
Transferrin	10 µg/ml
CaCl ₂	0,07 mM
Penicillin/Streptomycin	100 Units/ml

Zunächst wurde das Gewebestück grob vom subkutanen Fettgewebe befreit, in PBS gewaschen und mittels Skalpell klein geschnitten. Nach Inkubation über Nacht in einer 0,25%igen Trypsin-Lösung bei 4°C, konnte die Epidermis von der Dermis gelöst werden. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden die Epidermis-Stückchen dann in 5 ml 10%igen fötalem Kälberserum (FCS) suspendiert, wobei sich die Keratinozyten aus dem Gewebeverband lösten. Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Zellsuspension bei $11000 \times g$ für 5 min zentrifugiert und mit KGM auf die

erwünschte Zelldichte eingestellt. Für die Kultivierung wurden jeweils $0,7 \times 10^5$ bis 1×10^6 Zellen/ml in eine 10er Petrischale (Falcon) eingesät und auf 10 ml KGM aufgefüllt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C , 5% CO_2 und 85%iger Luftfeuchtigkeit im Brutschrank, wobei das Medium alle zwei Tage erneuert wurde. Die Subkultivierung erfolgte wie im Abschnitt 3.1.10 beschrieben.

3.1.7 Anzucht humaner Keratinozyten aus adulten Hautbiopsien

Anzuchtmedium A

DMEM	75 %
HAM's F12	25 %
Adenin	18 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Insulin	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Triiodothyronin	3 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Hydrocortison	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Anzuchtmedium B

angesetzt in Anzuchtmedium A	
FCS	11 %
Choleratoxin	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
EGF	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Penicillin/Streptomycin	100 Units/ml

Der enzymatische Verdau der Hautstückchen erfolgte analog zu der in Abschnitt 3.1.6 beschriebenen Prozedur. Anschließend wurden die isolierten Zellen in Anzuchtmedium B suspendiert und auf einem aus proliferationsinhibierten Fibroblasten bestehenden *Feederlayer* ausgesät. Die Anzucht erfolgte dann bei 37°C , 10 % CO_2 und 85%iger Luftfeuchtigkeit, wobei die Kulturen für 10 bis 14 Tage unberührt im Brutschrank verblieben. Anschließend erfolgte dreimal pro Woche ein kompletter Mediumwechsel, bis die Zellen eine Konfluenz von etwa 70 % erreichten. Es folgte das selektive Entfernen des *Feederlayers* durch Inkubation mit 0,02 % EDTA in PBS für 5 Minuten. Im Anschluss wurden die Keratinozyten, wie im Abschnitt 3.1.10 beschrieben, subkultiviert.

3.1.8 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl mit der Trypanblaufärbung müssen die Zellen in einer Einzelzellsuspension vorliegen. Die zu zählenden Zellen werden in einem geeigneten Volumen Kulturmedium resuspendiert, von dem 20 μl abgenommen werden. Diese werden im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau versetzt und dann auf eine Neubauerzählkammer pipettiert. Das Auszählen der Zellen in den 16er

Quadranten erfolgt unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung und mit Phasenkontrast. Die Gesamtzellzahl berechnet sich wie folgt

$$\text{Gesamtzellzahl} = n \times f \times V \times 10000 \quad (3.1)$$

n = ausgezählte Zellen
 f = Verdünnungsfaktor
 V = Gesamtvolumen
 10000 = Kammerfaktor (1 mm³).

Die Vitalität errechnet sich aus

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100. \quad (3.2)$$

3.1.9 Subkultivierung primärer Fibroblasten

Zum Passagieren primärer humaner Fibroblasten wurde zunächst das Medium abgegossen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um sie von jeglichen FCS-Resten zu befreien. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05/0,02 %) für maximal eine Minute bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde anschließend mit 10 %iger FCS-Lösung (in PBS) abgestoppt und die Zellsuspension dann in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen für 5 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in einem geeigneten Volumen RPMI-komplett aufgenommen und im Verhältnis 1:3 gesplittet, d.h. auf drei neue Kulturgefäße aufgeteilt.

Die infanten und adulten Fibroblasten nicht-diabetischer Herkunft wurden ausschließlich in den ersten fünf Passagen verwendet. Von den diabetischen Fibroblasten wurden sowohl die frühen (P2-P5) als auch die späten Passagen (P12-P15) für Versuche genutzt.

3.1.10 Subkultivierung primärer Keratinozyten

Keratinozyten-Trypsin-Lösung

angesetzt in PBS

Trypsin	0,1 %
EDTA	0,02 %

Die Subkultivierung erfolgte, nachdem die primären Keratinozyten eine etwa 70 %ige Konfluenz erreicht hatten. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen mit einer Trypsin-Lösung versetzt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach etwa 5 Minuten durch

Zugabe von 10% FCS in PBS abgestoppt. Die Zellsuspension wurde dann in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1100 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem geeigneten Volumen Kulturmedium resuspendiert und für die weitere Kultivierung im Verhältnis 1:3 gesplittet. Alternativ konnten die Zellen in einer gewünschten Zelldichte ausgebracht und für Versuche verwendet werden.

Die infanten und adulten Keratinozyten nicht-diabetischer Herkunft wurden ausschließlich in den ersten fünf Passagen verwendet. Von den diabetischen Keratinozyten wurden sowohl die frühen (P2-P5) als auch die späten Passagen (P12-P15) für Versuche genutzt.

3.1.11 Kryokonservierung und Auftauen primärer Zellen

Kryomedium

angesetzt in RPMI bzw. in KGM

FCS	20 %
DMSO	10 %

Fibroblasten und Keratinozyten wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Kulturgefäßboden gelöst, wie in den Abschnitten 3.1.9 und 3.1.10 beschrieben. Die Zellsuspension der Zellen wurde abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in kaltem Kryomedium resuspendiert, so dass sich eine Konzentration von etwa 1×10^6 Zellen/ml einstellt. Das Kryomedium bestand zu 10% aus DMSO, das zwar bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkt, beim Einfrierprozess jedoch die Kristallbildung verhindert und so die Zellen schützt. Die Zellsuspension wurde zügig in 2 ml Kryoröhrchen pipettiert, die dann so schnell wie möglich in den Kryotank überführt werden mussten, der zuvor bei 4°C vorgekühlt worden war. Der Kryotank gewährleistet im -80°C-Gefrierschrank ein langsames Einfrieren der Zellen von etwa -1°C pro Minute. Danach konnten die Zellen für einen längeren Zeitraum im Flüssigstickstoff bei -196°C aufbewahrt werden.

Für das Auftauen von Zellen wurde das gewünschte Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstofftank entnommen und in ein Becherglas mit warmem Wasser überführt. Nachdem die Flüssigkeit komplett aufgetaut war, wurde sie in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben, in dem sich auf 37°C vorgewärmtes 10%iges FCS befand. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1100 x g, um das zytotoxische DMSO aus der Suspension zu entfernen. Das Zellpellet wurde anschließend in Kulturmedium resuspendiert und ausgesät.

3.1.12 Bestrahlung von Kulturzellen zur Inhibition der Proliferation

Sowohl zur Herstellung eines *Feederlayers* (Abschnitt 3.1.5) als auch für der Migrationsassay (Abschnitt 3.1.13) mussten sich die jeweiligen Zellen in einem postmitotischen Zustand befinden, um eine weitere Proliferation ausschließen zu können. Dies kann durch Bestrahlung mit Gamma-Strahlen erfolgen. Hierzu wurden die Zellen im jeweiligen Kulturgefäß in eine Röntgenbestrahlungsanlage eingebracht (Gulmay RS 225, Abteilung für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie, UKE, Hamburg) und bei einer Röhrenspannung von 200 kV und einer Röhrenstromstärke von 15 mA unter Verwendung eines Kupfer- und eines Berilliumfilters (5 mm bzw. 0,8 mm) und einer Tischhöhe von 398 für 20 Minuten bestrahlt. Die Dosisrate betrug 1,2 Gy/min. Anschließend wurde ein Mediumwechsel mit dem entsprechenden Kulturmedium durchgeführt und die Zellen für mindestens 6 Stunden im Brutschrank inkubiert, bevor sie für weitere Versuche eingesetzt wurden.

3.1.13 Migrationsassay

Keratinocyten und Fibroblasten wurden nach Erreichen einer 60-70 % Konfluenz abtrypsinisiert, in einer Dichte von 100.000 Zellen in 12-Well-Schalen ausgesät und bis zum Erreichen vollständiger Konfluenz in KGM kultiviert. Anschließend erfolgte die Proliferationshemmung durch Bestrahlung (siehe Abschnitt 3.1.12). Für den Migrationsassay wurde der konfluente Zellrasen mit einer sterilen 100 µl-Pipettenspitze „verwundet“, wobei ein Spalt von ca. 400 µm entstand. Es folgte ein Waschschrift mit PBS, bevor frisches Medium auf die Zellen gegeben wurde. Die Migration wurde zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 24 h, 36 h und 48 h dokumentiert, indem Phasenkontrastaufnahmen derselben Stelle des *Scratches* gemacht wurden. Die Breite der unbewachsenen Fläche wurde mit Hilfe der ImageJ-Software (NIH) ausgemessen. Für die Auswertung wurde die Ausgangsbreite auf 100 % gesetzt, so dass ein kompletter Verschluss der *Scratch*-Wunde einem Wert von 0 % entsprach.

Zur Untersuchung des Einflusses von Gap27 bzw. Cx43-*Antisense*-Oligonukleotiden wurden die Zellen vor dem *Scratch* für eine Stunde mit serum- und antibiotikumsfreiem Medium vorinkubiert und im Anschluss für weitere 2 Stunden mit den Peptiden (60 µM) bzw. den DNA-Oligonukleotiden (20 µM) behandelt, bevor der Migrationsassay gestartet wurde. Die Peptid- bzw. ODN-Behandlung wurde nach 24 Stunden wiederholt. Da die Migration in Anwesenheit des

Kontrollpeptids Gap18 und PBS keine signifikanten Unterschiede zeigte, wurde in den Migrationsassays aus Kostengründen lediglich PBS als Kontrolle verwendet.

3.1.14 Proliferationsassay

Keratinocyten und Fibroblasten wurden nach Erreichen einer 60-70 %igen Konfluenz abtrypsiniert, in einer Dichte von 50.000 Zellen in 24-Well-Schalen auf sterilen Deckgläschen ausgesät und bis zum Erreichen vollständiger Konfluenz in KGM kultiviert. Anschließend wurde der Zellrasen auf jedem Deckgläschen mittels *Scratch* verwundet, die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium überschichtet. Die Behandlung mit 60 μ M Gap27 erfolgte analog zum Abschnitt 3.1.13 und wurde alle 24 Stunden wiederholt. Da die Proliferation in Anwesenheit des Kontrollpeptids Gap18 und PBS keine signifikanten Unterschiede zeigte, wurde in den Proliferationsassays aus Kostengründen lediglich PBS als Kontrolle verwendet. Zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden die Deckgläschen vorsichtig mit einer sterilen Pinzette aus dem Kulturgefäß entnommen, in PBS gewaschen, mit Methanol aufgeschlossen (5 min, -20°C) und anschließend mit Aceton fixiert (15 sec, -20°C). Die getrockneten Deckgläschen wurden dann mit farblosem Nagellack auf Objektträger aufgeklebt und anschließend zum Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67 immunhistologisch gefärbt (siehe Abschnitt 3.2.3). Für die Auswertung des Proliferationsassays wurden am Fluoreszenzmikroskop Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen von fünf unterschiedlichen Bereichen der „Wundränder“ angefertigt, so dass später durch Auszählen der Anteil proliferierender (Ki67-positiver) Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl am *Scratch*-Rand ermittelt werden konnte.

3.1.15 Halbkanalassay

Die Methode zur Untersuchung der Cx-Halbkanäle wurde von bereits beschriebenen Methoden abgewandelt (Contreras et al. [2002]; Braet et al. [2003a]; Schalper et al. [2008]). Die zu untersuchenden Zellen wurden nach Erreichen von 60-70 % Konfluenz abtrypsiniert und in einer Dichte von 50.000 Zellen (Keratinocyten) bzw. 25.000 Zellen (Fibroblasten) in 24-Well-Schalen auf sterilen Deckgläschen ausgesät und über Nacht kultiviert. Durch diese geringe Zellzahl wurde weitestgehend die Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen verhindert, so dass ein Stoffaustausch über Gap Junctions zu vernachlässigen war. Die Zellen wurden für eine Stunde in serum- und

antibiotikumsfreiem Medium vorinkubiert und anschließend für eine weitere Stunde mit 60 μM Peptid behandelt. Die Lösungen der Farbstoffe wurden in calcium- und magnesiumfreiem PBS (Biochrom AG) angesetzt und in *Keratinocyte Basal Medium* bzw. serumfreiem RPMI auf die gewünschte Konzentration eingestellt (Propidium Iodid: 2,5 mM, Calcein-AM: 0,1 μM , TRITC-Dextran (4 kDa): 25 mM). Diese wurden dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Deckgläschen mit calcium- und magnesiumhaltigem PBS gewaschen und mit Hilfe von durchsichtigem Nagellack mit der Zellseite nach unten auf Objektträger aufgeklebt. Die Auswertung erfolgte sofort danach am Fluoreszenzmikroskop. Mit der 40-fachen Vergrößerung wurden pro Ansatz fünf Gesichtsfelder sowohl im Phasenkontrast- als auch im Fluoreszenzmodus fotografiert. Aus den Aufnahmen konnten dann die gefärbten Zellen relativ zur Gesamtzellzahl ermittelt werden.

3.1.16 MMP-Array

Für die Ermittlung der Proteinlevel von Matrixmetalloproteasen und TIMPs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*) von Keratinozyten unterschiedlicher Herkunft wurden Zellkulturüberstände aus Migrationsassays von jeweils 5 Zelllinien von infanten, adulten nicht-diabetischen sowie adulten diabetischen Zellen gesammelt und *gepoolt*. Die Überstände wurden anschließend unverdünnt als Probe in den *Human Matrix Metallo Protease Antibody Array* (RayBio, Georgia/USA) eingesetzt, der entsprechend des Hersteller-Protokolls durchgeführt wurde, wobei die Primärantikörperreaktion über Nacht bei 4°C, die Sekundärantikörperreaktion für zwei Stunden bei Raumtemperatur stattfanden. Die entwickelten Röntgenfilme wurden eingescannt und die Intensitäten der einzelnen Proteine mit Hilfe des ImageJ-Tools „*Microarray Profile*“ ausgewertet, wobei die Werte der Negativkontrollen von denen der Proben subtrahiert wurden und die Werte der Positivkontrollen gleich 100 % gesetzt wurden.

3.2 Histologische Methoden

3.2.1 Anfertigen von Gefrierschnitten

Die Anfertigung von Gefrierschnitten wurde am Kryostaten bei einer Blocktemperatur von -24°C und einer Kammertemperatur von -22°C durchgeführt. Zur Auswertung der Wundheilung von ex

vivo WHM wurden Schnitte aus dem Bereich der Mitte der Wunde angefertigt. Die Schnitte wurden in einer Dicke von 6 μm auf Superfrost/Plus-Objektträger aufgebracht, auf dem sie mindestens eine halbe Stunde trocknen mussten. Anschließend folgte eine 10-minütige Fixierung der Gefrierschnitte in Aceton bei -20°C . Die Schnitte konnten nun entweder direkt für die immunhistochemische Färbungen verwendet oder bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert werden.

3.2.2 HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist ein Färbeverfahren der histologischen Routine, mit dem die verschiedenen Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden können. Hierbei färbt das Hämatoxylin die Zellkerne, das Eosin das Plasma und die extrazelluläre Matrix.

Für die HE-Färbung wurden die zu färbenden Objektträger zunächst für 6 Minuten in filtriertes Hämatoxylin getaucht. Danach wurde die überschüssige Farbe durch Waschen in Leitungswasser entfernt. Es folgte ein Waschschritt in 3%-igem HCl-Ethanol, bevor die Schnitte für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült wurden. Nach kurzem Tauchen in *Aqua dest.* wurden sie dann für 1 Minute in Eosin gefärbt und erneut mit Leitungswasser und *Aqua dest.* gewaschen. Anschließend durchliefen die Gewebeschnitte zur Entwässerung eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 96%, 100%), bevor sie dann für zwei Minuten in Xylol inkubierten. Dieser Schritt ist notwendig, um das Gewebe für die Einbettung mit Eukitt vorzubereiten. Die Schnitte wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt und über Nacht getrocknet. Die Bewertung und Dokumentation erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

3.2.3 Immunhistochemische und Immunzytochemische Färbungen

PBS-Puffer, pH 7,4

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na_2HPO_4	8,1 mM
KH_2PO_4	1,5 mM

Durch die Immunhistochemie war es möglich, die Lokalisation von Proteinen in Gewebeschnitten mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper nachzuweisen. Die Färbungen wurden bei Raumtemperatur in einer dunklen Feuchtkammer durchgeführt. Sowohl die Primär- als auch die Sekundäntikörper wurden nach der Verdünnung in PBS für 3 Minuten bei $13.000 \times g$ zentri-

fugiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper in der gewünschten Verdünnung erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Reaktion des Primärantikörpers folgten drei Waschschriffe mit PBS von einmal 5 und zweimal 10 Minuten, bei denen alle nicht-gebundenen Immunglobuline vom Gewebe entfernt wurden. Somit wurde die anschließende spezifische Bindung des Sekundärantikörpers ermöglicht, der ebenfalls 30 Minuten auf den Gefrierschnitten verblieb. Es folgte erneut ein 5-minütiger Waschschriff mit PBS, bevor die Objektträger für eine Minute in DAPI inkubiert wurden. DAPI ist ein interkalierender Farbstoff, der spezifisch an die DNA bindet und bei Fluoreszenzanregung die Zellkerne blau markiert. Die Schnitte wurden anschließend nochmals zweimal 5 Minuten in PBS gespült. Bevor das Gewebe mit Fluoromount G eingedeckt werden konnte, erfolgten noch zwei 3-minütige Waschschriffe mit *Aqua dest.* Zum Aushärten des Fluoromount G wurden die Präparate über Nacht bei Raumtemperatur gelagert.

Für immunzytologische Färbungen wurden Keratinozyten und Fibroblasten auf sterilen Glasdeckgläschen kultiviert, bis sie die gewünschte Konfluenz erreichten. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Deckgläschen dann einzeln aus dem Kulturgefäß entnommen und kurz in sterilem PBS gewaschen. Zur Freilegung der Antigene und zur anschließenden Fixierung der Zellen wurden die Deckgläschen zunächst für 5 Minuten in Methanol (-20°C) und dann für 15 Sekunden in Aceton (-20°C) inkubiert. Zur besseren Handhabung wurden sie anschließend mit Hilfe von farblosem Nagellack auf Objektträger aufgeklebt. Nach dem Trocken der Proben konnte die Immunzytologie, analog zur oben beschriebenen Immunhistochemie, durchgeführt werden.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Proteinisolation aus Zellen

RIPA-Puffer	
Tris	50 mM
NaCl	150 mM
NP40 (Igepal)	1 %
Natriumdeoxycholat	0,5 %
EDTA	5 mM
SDS	0,1%

Proteaseinhibitor-Mix (100 x)

Leupeptin	1 mg/ml
Pepstatin	0,1 mg/ml
Bacitracin	10 mg/ml
PMSF	10 mM

Für den Proteinnachweis wurde das Gesamtprotein aus konfluenten Kulturen humaner Keratinozyten und Fibroblasten gewonnen. Hierfür wurde zunächst das Medium abgekippt und die Zellen zweimal mit PBS gespült, um letzte Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden 500 µl RIPA-Puffer (incl. 5 µl Proteaseinhibitor-Mix) auf die Zellen pipettiert und dann für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend konnte der Zellrasen mit Hilfe eines Cell-Schabers (SPL Life Science) vom Gefäßboden gekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt werden, das gevortext und für weitere 15 Minuten auf Eis gestellt wurde. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13.000 × g. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Bestimmung der Proteinmenge (Abschnitt 3.3.2) bei -80°C gelagert.

3.3.2 Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford**Bradford-Farbreagenz**

Coomassie Brilliant Blau G250	0,01%
Phosphorsäure (88%)	1,6 M
Ethanol absolut (99%)	0,8 M

Um im SDS-Gel vergleichbare Proteinmengen einsetzen zu können, wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proben zuvor bestimmt und auf einen einheitlichen Wert eingestellt. Hierfür wurde zunächst eine Eichgerade aus einem BSA-Standard erstellt, aus dem eine Konzentrationsreihe bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen wurde. Von den Proben wurden 1 bzw. 2 µl insgesamt 100 µl Aqua dest. verdünnt und anschließend mit 900 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach dem Vortexen wurden die Proben am Photometer bei 595 nm gemessen und eine Eichgerade erstellt, anhand derer im Anschluss die jeweiligen Proteinmengen in den Proben durch Interpolation bestimmt werden konnten. Anschließend wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt. Orientiert an der Probe mit der geringsten Proteinkonzentration wurden die Proben dann mit einfach konzentriertem SDS-Probenpuffer auf einen einheitlichen Wert eingestellt.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamid-Lösung

Acrylamid	30%
Bisacrylamid	0,8%

Trenngel-Puffer, pH 8,8

Tris	1,5 M
SDS	0,4%

Sammegel-Puffer, pH 6,8

Tris	0,5 M
SDS	0,4%

Elektrophorese-Puffer, pH 8,8

Glycin	0,19 mM
Tris	23 mM
SDS	0,2%

SDS-Probenpuffer, pH 6,8

Tris	60 mM
Glycerin	10 %
β -Mercaptoethanol	10 %
SDS	5 %
Bromphenolblau	0,5 %

Die analytische Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Lämmli (Laemmli [1970]). Trenn- und Sammelgel wurden entsprechend der Angaben in Tabelle 3.1 hergestellt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für 3 Minuten bei 95°C vollständig denaturiert. Die Auftrennung der Proteine fand bei einer Spannung von 200 V über einen Zeitraum von 1-1,5 Stunden statt. Im Anschluss konnten die Proteine in einem Coomassie-Färbebad sichtbar gemacht werden (Abschnitt 3.3.6), oder sie wurden direkt auf eine Membran transferiert, auf der später die Antikörpermarkierung erfolgte (Abschnitt 3.3.4).

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Sammelgels und verschieden-prozentiger Trenngele

Lösung	Sammelgel	Trenngel 8 %	Trenngel 11 %	Trenngel 14 %
Acrylamidlösung	1,3 ml	8 ml	11 ml	14 ml
Trenngelpuffer	-	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml	-	-	-
<i>Aqua dest.</i>	5,9 ml	14,2 ml	11,2 ml	8,2 ml
APS (10 %)	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

3.3.4 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Transferpuffer

Methanol	20 %
Glycin	192 mM
Tris	25 mM %
SDS	0,02 %

Zunächst wurden die für das *Blot-Sandwich* benötigten Filterpapiere, Schwammpads, Gele und Nitrozellulosemembranen für ca. 10 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Proteintransfer von den Polyacrylamidgelen auf eine Membran erfolgte dann bei 4°C, einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 350 mA mittels eines Nass-*Blot*-Verfahrens in einem *Maxi-Wet-Tank* (Biorad). Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zum Sichtbarmachen der Proteinbanden für 5 Minuten in Ponceau S gefärbt und dann die Banden des Proteinstandards zur besseren Orientierung mit Bleistift markiert. Sollte anschließend eine Antikörpermarkierung erfolgen, wurde die Membran dreimal 5 Minuten in TBST-Puffer entfärbt.

3.3.5 Proteindetektion mittels Antikörperreaktion

TBST-Puffer, pH 7,4

Tris	10 mM
NaCl	150 mM %
Tween	0,05 %
Bromphenolblau	0,5 %

Um eine spezifische Färbung zu gewährleisten, müssen die unspezifischen Bindungsstellen der Proteine zunächst blockiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Membranen für eine Stunde in 5%iger Magermilch-Lösung (in TBST-Puffer) abgesättigt. Anschließend wurden sie zusammen

mit dem jeweiligen Primärantikörper, der in 5%iger Magermilch-Lösung verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer entfernt. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit einem MRP (Meerrettichperoxidase)-gekoppelten Sekundärantikörper, mit dem die Membranen für 30 Minuten unter Rotation bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde Chemilumineszenzsubstrat (Thermo Scientific) für eine Minute auf den Membranen inkubiert. In einer Röntgenkassette (Amersham-Pharmacia) wurden anschließend Röntgenfilme (Konica Minolta) belichtet und nach ausreichender Exposition von 30 Sekunden bis 10 Minuten entwickelt. Die Größe der detektierten Banden wurde über den Protein-Größenstandard bestimmt. Anschließend wurden die Membranen 2 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C in Ponceau S inkubiert. Bei diesem als *Stripping* bezeichneten Vorgang wurden die gebundenen Antikörper abgewaschen, so dass eine erneute Primärantikörperreaktion stattfinden konnte. Zur Auswertung wurden die entwickelten Röntgenfilme digitalisiert, so dass die Banden anschließend mit Hilfe der ImageJ-Software (NIH) ausgemessen und verglichen werden konnten.

3.3.6 Coomassie-Blau-Färbung

Coomassie-Blau-Lösung

Methanol	40 %
Essigsäure	5 %
Coomassie-Brilliantblau G250	0,4 %

Entfärbelösung

Methanol	40 %
Essigsäure	5 %

Konservierungslösung

Essigsäure	7,5 %
------------	-------

Diese Methode diente der Darstellung von Proteinbanden auf dem Gel direkt nach der Elektrophorese. Auf diese Weise konnten beispielsweise Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge festgestellt werden. Eine Färbung der Gele nach dem *Blotten* gab Aufschluss über die Effizienz des Proteintransfers. Zu diesem Zweck wurden die Polyacrylamidgele für eine Stunde in der

Coomassie-Blau-Lösung gefärbt, über Nacht in der Entfärbelösung entfärbt und dann zur Lagerung in Konservierungslösung gelegt.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Effekte von Gap27 im *ex vivo* Wundheilungsmodell

Ein beschleunigender Effekt des Cx-mimetischen Peptids Gap27 auf die Wundheilung bzw. damit verbundene zelluläre Vorgänge wurde bisher lediglich in zweidimensionalen murinen Zellkulturen bzw. in murinen dreidimensionalen organotypischen *in vitro* Modellen beschrieben (Kandyba et al. [2007]). In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Effekt von Gap27 auf ein dreidimensionales *ex vivo* Gewebe untersucht. Zu diesem Zweck wurden porcine und humane *ex vivo* Wundheilungsmodelle (WHM) mit Gap27 behandelt und der Wundheilungsfortschritt, die epidermale Cx-Lokalisation, die epidermale Kommunikation sowie die Keratinozytenproliferation bestimmt.

4.1.1 Einfluss von Gap27 auf die porcine und humane *ex vivo* Wundheilung

In die Wunde porciner und humaner WHM wurde 600 μM Gap27, Kontrollpeptid Gap18 oder das entsprechende Volumen PBS appliziert und im Brutschrank kultiviert. Diese Behandlung wurde nach 24 Stunden wiederholt. Nach Ablauf von 48 Stunden wurden die Modelle eingefroren und dienen zur Anfertigung von Gefrierschnitten. Zur Auswertung der Wundheilung wurde das Gewebe mittels der HE-Methode angefärbt und mit Hilfe des in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Score-Systems ausgewertet.

Abbildung 4.1 **A** zeigt den Effekt von 600 μM Gap27 auf die Wundheilung in porcinen *ex vivo* WHM im Vergleich zu Modellen, die mit dem Kontrollpeptid Gap18 oder PBS behandelt worden sind. Gap27 beschleunigt die porcine Wundheilung statistisch signifikant sowohl gegenüber

PBS (Faktor 1,48) als auch gegenüber Gap18 (Faktor 1,64). Vergleichbare Ergebnisse können auch für humane *ex vivo* Modelle gefunden werden (Abbildung 4.1 **B**). Auch hier beschleunigt Gap27 die Wundheilung im Vergleich zur PBS-Kontrolle etwa um den Faktor 1,5. Aufgrund der geringen Anzahl humaner Hautstanzen ($n = 3$) ist diese Beobachtung jedoch nicht signifikant. Der wundheilungssteigernde Effekt von Gap27 ist auch in den HE-Färbungen porciner Gefrierschnitte erkennbar (Abbildung 4.1 **C** und **D**). Die mit Gap27 behandelten Modelle (**D**) besitzen eine deutlich längere regenerierende Epidermis (schwarzer Pfeil) als die mit PBS behandelten Modelle (**C**). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Gap27 in der Lage ist, die Wundheilung sowohl in porcinen als auch in humanen dreidimensionalen Hautmodellen zu beschleunigen.

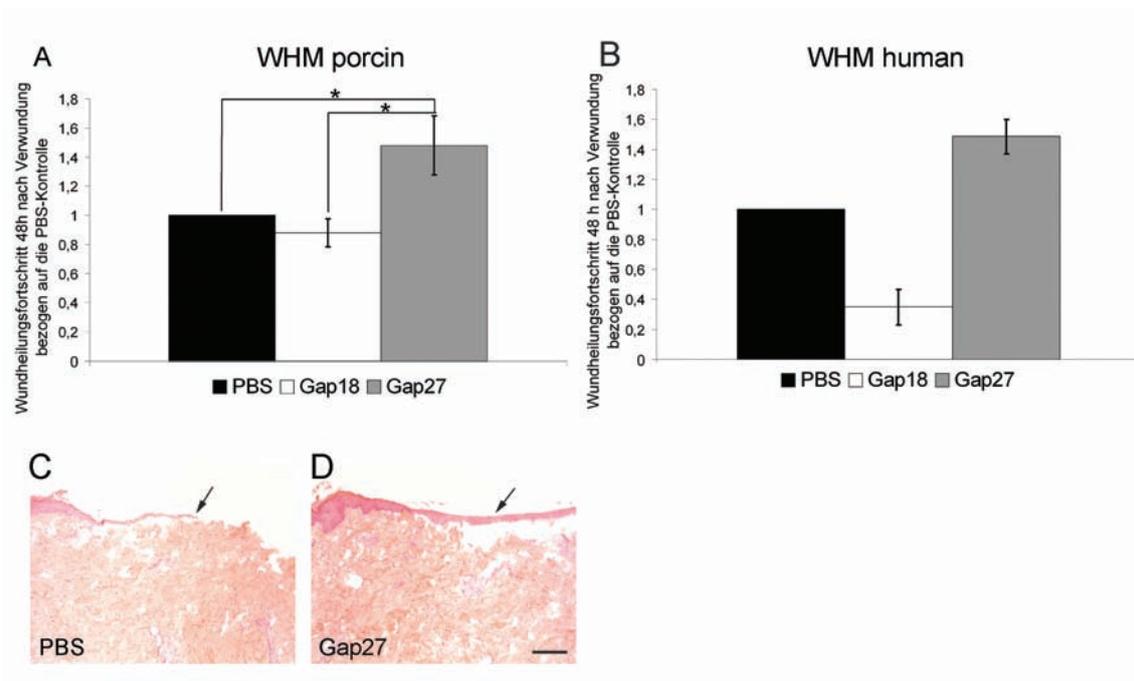


Abbildung 4.1: Effekt von Gap27 auf die Wundheilung in *ex vivo* Wundheilungsmodellen. **(A)** Vergleich des Wundheilungsfortschritts in porcinen WHM nach Behandlung mit 600 μM Gap27 und Gap18 bezogen auf die PBS-Kontrolle ($n = 9$; *: $p \leq 0.05$; Mittelwerte \pm SEM). **(B)** Vergleich des Wundheilungsfortschritts in humanen WHM nach Behandlung mit 600 μM Gap27 und Gap18 bezogen auf die PBS-Kontrolle ($n = 3$; Mittelwert \pm SEM). **(C, D)** HE-gefärbte Gefrierschnitte von mit PBS (**C**) oder Gap27 (**D**) behandelten WHM zum Zeitpunkt 48 Stunden nach der Verwundung. Schwarze Pfeile kennzeichnen die regenerierende Epidermis (Längenmaßstab = 50 μm).

4.1.2 Einfluss von Gap27 auf die Connexin-Lokalisation

Es ist bekannt, dass Cx43-defiziente Mäuse eine beschleunigte Wundheilung zeigen, und dass auch die künstliche Herabregulation von Cx43 mittels *Antisense*-Technologie zu einer schnelleren

Wundheilung führt (Kretz et al. [2003]; Qiu et al. [2003]). Da hier ebenso für das Cx-mimetische Peptid Gap27 ein wundheilungsfördernder Effekt beobachtet werden konnte, wurde im Folgenden untersucht, ob dieser Effekt mit einer Änderung der Expression und zeitlichen Regulation von Cx43 einhergeht. Zu diesem Zweck wurden von porcinen WHM, die für unterschiedliche Zeiträume mit 600 μ M Gap27 oder PBS inkubiert worden waren, Gefrierschnitte angefertigt, auf denen immunhistologisch Cx43 nachgewiesen wurde. Cx26 stellt im Verlauf der Wundheilung eine Art Gegenspieler von Cx43 dar und wurde aus diesem Grund ebenfalls untersucht.

Abbildung 4.2 zeigt den immunhistologischen Nachweis von Cx43 (rot) und Cx26 (grün) (gelb = Co-Lokalisation) in porcinen *ex vivo* WHM zu den Zeitpunkten 2, 6, 18, 24 und 48 Stunden nach Verwundung. Bereits nach 2 Stunden sieht man sowohl in PBS (**A**) als auch in Gap27 (**B**) behandelten WHM die beginnende Cx43-Herunterregulation am Wundrand, die nach 6 Stunden noch stärker ausgeprägt ist (**C, D**). Nach 18 Stunden ist kaum mehr Cx43-Lokalisation am Wundrand nachzuweisen, stattdessen wird Cx26 am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis induziert (**E, F**). Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Verwundung treten die ersten Unterschiede zwischen den mit Gap27 behandelten und den Kontrollmodellen bezüglich der Cx-Lokalisation auf (**G, H**). In den Kontrollmodellen ist Cx26 auf den äußersten Wundrand und die neugebildete Epidermis beschränkt, während es in den mit Gap27 behandelten Modellen stärker im gesamten Bereich des Wundrands zu finden ist. Dort ist es auch mit Cx43 co-lokalisiert, welches zu diesem Zeitpunkt am Wundrand re-induziert wird. Ein weiterer Unterschied zwischen der Gap27- und der Kontrollbehandlung ist in der an die Wunde angrenzende nahen Epidermis zu erkennen (**I, J**). Cx26 ist in der Kontrolle auf das oberste *Stratum granulosum* und wenige Zellen des *Stratum basale* begrenzt, wohingegen es in Gap27-behandelten Modellen im *Stratum granulosum*, im oberen *Stratum spinosum* sowie im *Stratum basale* nachzuweisen ist. Die Cx43-Lokalisation ist den Modellen beider Behandlungen vergleichbar. 48 Stunden nach Verwundung ist die Mitte der regenerierenden Epidermis aller Modelle negativ für Cx43 und stark positiv für Cx26 (**K, L**), während sich am Wundrand wieder der Ausgangszustand eingestellt hat, man findet hier eine durchgehende Cx43-Lokalisation und kein Cx26 mehr (nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich Gap27 im porcinen *ex vivo* WHM nicht auf die Cx43-, wohl aber auf die Cx26-Lokalisation und -Regulation auswirkt.

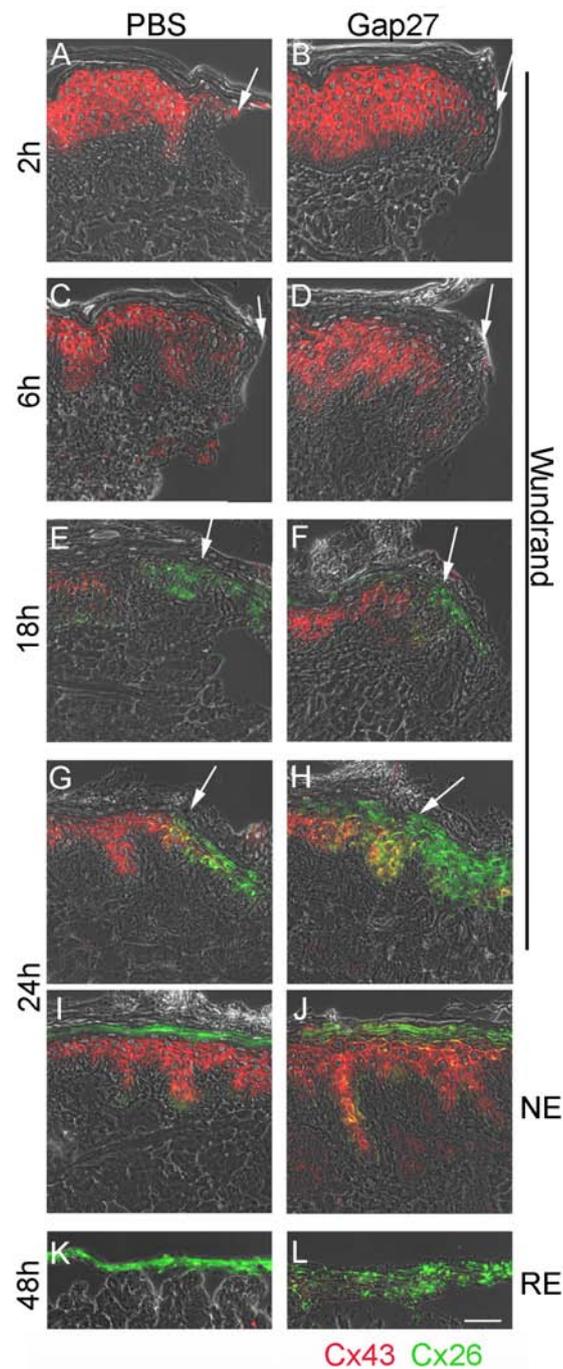


Abbildung 4.2: Effekt von Gap27 auf die Lokalisation und Regulation von Connexinen im porcinen *ex vivo* WHM. Immunhistologischer Nachweis von Cx43 (rot) und Cx26 (grün) und deren Co-Lokalisation (gelb) in porcinen WHM (Überlagerung mit Phasenkontrast), die mit PBS (A, C, E, G, I, K) bzw. 600 μ M Gap27 (B, D, F, H, J, L) inkubiert wurden (Längenmaßstab = 50 μ m). Gezeigt sind die Bereiche der Wundränder (weiße Pfeile kennzeichnen den ursprünglichen Wundrand) zu den Zeitpunkten 2 Stunden (A, B), 6 Stunden (C, D), 18 Stunden (E, F) und 24 Stunden (G, H) nach Verwundung, die dem Wundrand nahe Epidermis (NE) zum Zeitpunkt 24 Stunden (I, J) und die regenerierende Epidermis (RE) zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Verwundung (K, L).

4.1.3 Einfluss von Gap27 auf die epidermale Zellkommunikation

Die natürliche Herunterregulation von Cx43 im Verlauf der Wundheilung geht einher mit einer gehemmten Zellkommunikation in der Epidermis am Wundrand (Goliger and Paul [1995]). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gap27 die Wundheilung im *ex vivo* WHM beschleunigt, ohne jedoch die Cx43-Regulation zu beeinflussen. Hier soll nun untersucht werden, ob Gap27 die Permeabilität von Cx-Kanälen hemmt und sich auf diese Weise positiv auf die Wundheilung auswirkt. Dass Gap27 grundsätzlich in der Lage ist, die Cx-vermittelte Kommunikation sowohl über Gap Junctions als auch über Cx-Halbkanäle zu inhibieren, wurde bereits im *in vitro* System gezeigt (Kandyba et al. [2007]; Braet et al. [2003b]). In der vorliegenden Arbeit wurde nun anhand porciner *ex vivo* Wundheilungsmodelle ermittelt, ob Gap27 diese Effekte auch im dreidimensionalen System hervorruft. Hierzu wurde ein *ex vivo*-Kommunikationsassay durchgeführt, das auf dem Prinzip beruht, dass Keratinozyten in der Epidermis durch GJs verbunden sind, durch die bestimmte Farbstoffe weitergegeben werden können. Um die Diffusion durch GJ-Kanäle zu verfolgen, wurde der Farbstoff Lucifer Yellow (LY) verwendet. Dabei handelt es sich um ein 457 Dalton großes Molekül, das häufig in der Visualisierung Cx-vermittelter Kommunikation Anwendung findet (zur Übersicht siehe Evans and Leybaert [2007]). Als Kontrolle diente hier ein an ein Dextran gekoppelter TRITC-Farbstoff, der mit 4 kDa zu groß für die Diffusion durch Gap Junctions ist. Um den Einfluss von Gap27 auf die Farbstoffausbreitung zu untersuchen, wurden die Wunden porciner WHM für eine Stunde mit 600 μ M Gap27, Gap18 oder PBS (1h) inkubiert, und anschließend wurde für 5 Minuten die Farbstofflösung, bestehend aus LY und TRITC-Dextran, in die Wunde appliziert. Während dieser Zeit konnten die Farbstoffe im Bereich des Wundrandes in die Epidermis eindringen und sich, je nach Permeabilität der Cx-Kanäle, horizontal ausbreiten. Eine zusätzliche Kontrolle stellte die Farbstoffausbreitung zum Zeitpunkt direkt nach der Verwundung dar (0h), an dem die Cx-vermittelte Kommunikation noch unbeeinflusst war. Nach der Inkubationszeit mit der Farbstofflösung wurden die Modelle sofort eingefroren und dienten zur Anfertigung von Gefrierschnitten, auf denen mittels Fluoreszenzmikroskopie die Farbstoffe nachgewiesen und deren Lokalisation und Ausbreitung ermittelt werden konnten.

Abbildung 4.3 **A** zeigt die Diffusionsdistanz von Lucifer Yellow in die Epidermis porciner WHM, die zuvor eine Stunde mit Gap27, Gap18 oder PBS inkubiert worden sind. Die Behandlung mit Gap27 führt zu einer signifikant verminderten Farbstoffausbreitung gegenüber den Kontroll-

Modellen. Die Abbildungen 4.3 **B** und **C** repräsentieren Wundränder von mit Gap18 (**B**) und Gap27 (**C**) behandelten WHM. In den Gap18-WHM dringt Lucifer Yellow deutlich in die Epidermis ein, wohingegen es in Gap27-WHM auf den äußersten Wundrand begrenzt ist. Das TRITC-Dextran ist in beiden Fällen in der ersten Zellreihe am Wundrand zu finden, wo es lediglich in die bei der Stanzenentnahme verletzte Zellen aufgenommen wird und sich nicht über GJs oder Halbkanäle weiter ausbreiten kann. Gap27 hemmt demnach signifikant die Farbstoffausbreitung und somit die epidermale Cx-vermittelte Kommunikation in porcinen WHM.

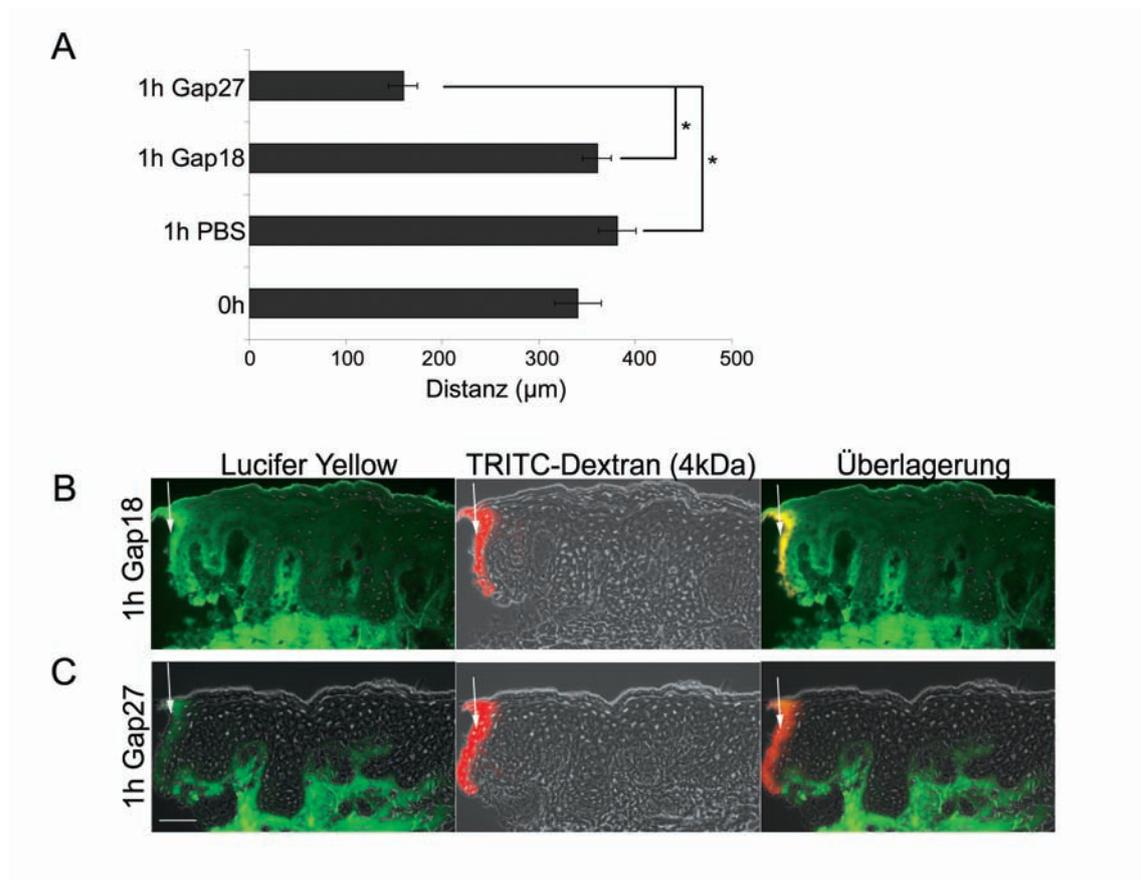


Abbildung 4.3: Effekt von Gap27 auf die epidermale Farbstoffausbreitung im porcinen *ex vivo* WHM. (A) Ausbreitung von Lucifer Yellow in WHM direkt nach Verwundung (0h) bzw. nach 1-stündiger Inkubation mit 600 µM Gap27, Gap18 oder PBS ($n = 6$; *: $p \leq 0.05$; Mittelwerte \pm SEM). (B, C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Wundrändern (weiße Pfeile) von eine Stunde mit Gap18 (B) bzw. Gap27 (C) inkubierten WHM, die die Farbstoffausbreitung von Lucifer Yellow (grün) und TRITC-Dextran (rot) zeigen (Überlagerung mit Phasenkontrast; Längenmaßstab = 50 µm).

4.1.4 Einfluss von Gap27 auf die Keratinozyten-Proliferation

Die Reepithelialisierung, die Bildung einer neuen Epidermis im Wundbereich, geht einher mit der Proliferation von Keratinozyten. Da Gap27 die Wundheilung beschleunigt, wurde im Folgenden untersucht, wie sich Gap27 auf die Proliferation von Keratinozyten in *ex vivo* WHM auswirkt. Hierzu wurden porcine *ex vivo* WHM für 48 Stunden mit 600 μ M Gap27, Gap18 oder PBS inkubiert. Auf Gefrierschnitten dieser Modelle wurde der Proliferationsmarker Ki67 immunhistologisch nachgewiesen und anschließend der relative Anteil proliferierender Zellen in der regenerierenden Epidermis, am Wundrand und in von der Wunde drei Reteleisten entfernter Epidermis ermittelt. Die Anzahl Ki67-positiver Zellen wurde für den Wundrand und die regenerierende Epidermis auf die Gesamtzellzahl des jeweiligen Gesichtsfeldes bezogen. Für die entfernte Epidermis galt die Zellzahl des *Stratum basale* als Gesamtzellzahl, da sich die Proliferation in unverwundeter Haut auf die Basalzellschicht beschränkt.

Abbildung 4.4 zeigt, dass Gap27 keinen Effekt auf die Keratinozytenproliferation am Wundrand hat, und auch die Zellen in weiterer Entfernung vom Wundrand (nicht gezeigt) nicht beeinflusst werden. In der regenerierenden Epidermis kann jedoch ein signifikant höherer Anteil proliferativer Zellen gegenüber den Kontrollmodellen gefunden werden. Ein wahrscheinlicher Mechanismus, mit dem Gap27 die Wundheilung beschleunigt, ist demnach die Erhöhung der Proliferation von epidermalen Zellen in der regenerierenden Epidermis.

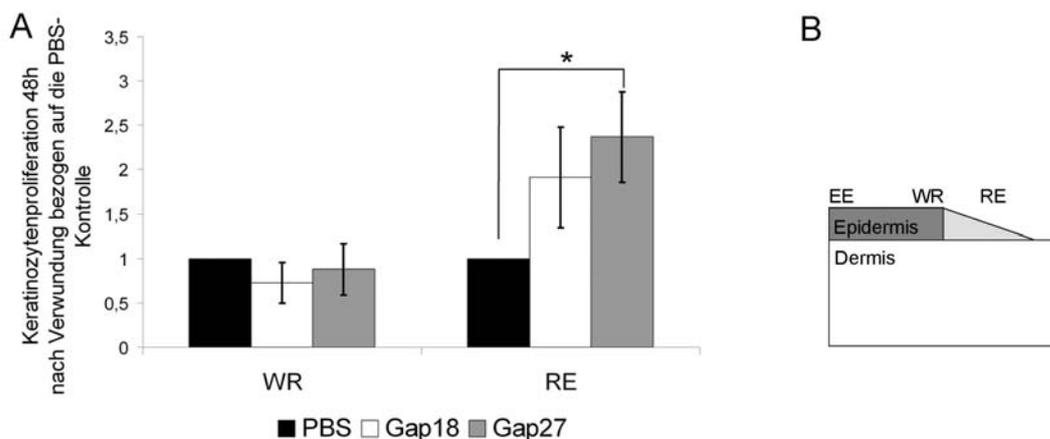


Abbildung 4.4: Effekt von Gap27 auf die Keratinozytenproliferation in *ex vivo* Wundheilungsmodellen. (A) Vergleich der Anteile proliferativer Zellen am Wundrand (WR) bzw. in der regenerierenden Epidermis (RE) in mit 600 μ M Gap27, Gap18 oder PBS behandelten porcinen WHM ($n = 9$; $p \leq 0.05$; Mittelwerte \pm SEM). (B) Schematische Darstellung eines WHM mit den Bereichen, in denen die Keratinozytenproliferation ermittelt wurde: entfernte Epidermis (EE), Wundrand (WR), regenerierende Epidermis (RE).

4.2 *In vitro*-Effekte von Gap27

Das Cx-mimetische Peptid Gap27 führt in dreidimensionalen *ex vivo* WHM zu einer beschleunigten Wundheilung und veränderten Zellkommunikation. Um genauer zu untersuchen, welchen Effekt es im Einzelnen auf die kutanen Zellen hat, wurden *in vitro* Versuche durchgeführt. Hierfür wurden aus infanten Vorhäuten isolierte humane Keratinozyten und Fibroblasten verwendet, die in der dermatologischen Forschung aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit standardmäßig genutzt werden. Die Kulturen wurden mit 60 μ M Gap27 behandelt und die Funktionalität von Cx-Halbkanälen, Cx43-Expression und -Phosphorylierung, sowie Proliferation und Migration ermittelt.

4.2.1 Einfluss von Gap27 auf Cx-Halbkanäle infanter humaner Keratinozyten und Fibroblasten

Die beobachtete Hemmung der epidermalen Farbstoffausbreitung in porcinen *ex vivo* WHM durch Gap27 gibt keinen Aufschluss darüber, ob das mimetische Peptid die Weitergabe von LY durch Gap Junctions oder aber seine Aufnahme durch Cx-Halbkanäle aus dem Extrazellularraum beeinflusst. Aus *in vitro* Versuchen ist bereits bekannt, dass Cx-mimetische Peptide die GJIC in Keratinozyten inhibieren (Kandyba et al. [2007]), über ihren Effekt auf Cx-Halbkanäle in Keratinozyten und Fibroblasten sind jedoch noch keine Daten publiziert worden. Um die Auswirkung von Gap27 auf Cx-Halbkanäle in Zellen der Haut zu untersuchen, wurden an humanen infanten Keratinozyten und Fibroblasten Halbkanalassays durchgeführt, die auf der Farbstoffaufnahme aus dem Extrazellularraum über Cx-Halbkanäle von Zellen beruhen. Hierzu wurden die Zellen in einer sehr geringen Dichte ausgesät, um weitestgehend direkte Zellkontakte zu verhindern und somit die direkte Übertragung von des Farbstoffs über GJs auszuschließen. Die Farbstoffaufnahme, hier Propidium Iodid (PI), stellt demnach ein Maß für die Halbkanalaktivität dar. Propidium Iodid ist ein kationischer Farbstoff, der über Cx-Halbkanäle von Zellen aufgenommen werden kann (zur Übersicht siehe Schalper et al. [2008]). Darüber hinaus diente Calcein als Kontroll-Farbstoff. Dieser ist membrangängig und kann somit in durch die Plasmamembran in jede Zelle eindringen, unabhängig von deren Cx-Halbkanalaktivität. Zur Kontrolle der Viabilität der Zellen wurde ein an ein 4 kDa großes Dextran gekoppelter TRITC-Farbstoff verwendet, der lediglich in tote Zellen eindringen kann. Um den Effekt des Cx-mimetischen Peptids Gap27 auf Cx-Halbkanäle zu un-

tersuchen, wurden die Zellen zunächst mit 60 μM Gap27, Gap18 oder PBS behandelt und dann die Aufnahme von PI, Calcein und TRITC-Dextran bestimmt, indem der Anteil gefärbter Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl ermittelt wurde.

In Abbildung 4.5 sind die Ergebnisse der Farbstoffaufnahme von infanten Keratinozyten (**A**) und Fibroblasten (**B**) dargestellt. Es zeigt sich eine signifikant geringere PI-Aufnahme in mit Gap27 behandelten Zellen gegenüber den Kontrollen. Dies gilt sowohl für Keratinozyten als auch für Fibroblasten. Im Gegensatz dazu wird der Anteil von Zellen, die positiv für Calcein bzw. TRITC-Dextran sind, nicht von den Kulturbedingungen beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Gap27 die Permeabilität von Cx-Halbkanälen von kutanen Zellen beeinflusst.

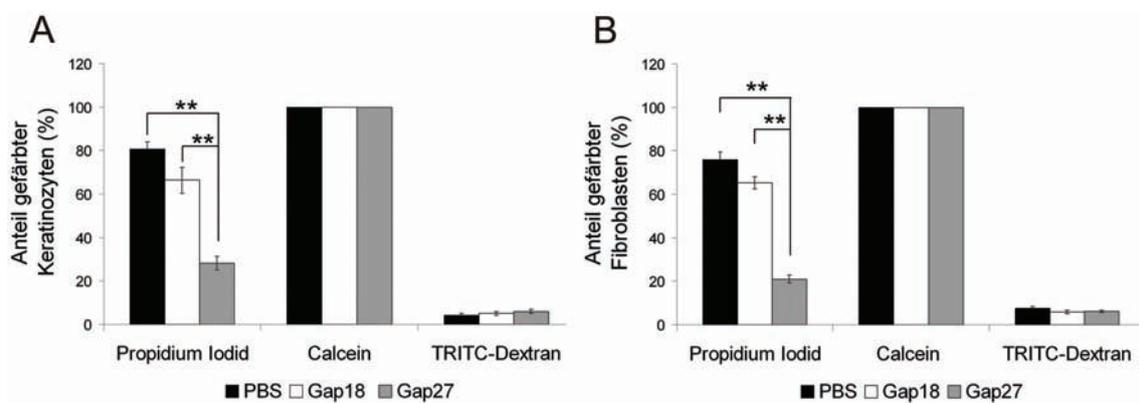


Abbildung 4.5: Effekt von Gap27 auf die Cx-Halbkanal-Aktivität in primären Zellkulturen. Anteil farbstoff-positiver Keratinozyten (**A**) und Fibroblasten (**B**), die mit 60 μM Gap27, Gap18 oder PBS behandelt wurden, bezogen auf die jeweilige Gesamtzellzahl ($n = 9$; *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$; Mittelwerte \pm SEM).

4.2.2 Einfluss von Gap27 auf das Proteinlevel und die Phosphorylierung von Cx43 in infanten Keratinozyten und Fibroblasten

Es ist bekannt, dass das Cx-mimetische Peptid Gap27 in murinen Keratinozyten die GJIC inhibiert, ohne dass die Expression des Cx43-Proteins beeinflusst wird (Kandyba et al. [2007]). Hier wurde nun das Proteinlevel von Cx43 in humanen infanten Keratinozyten und Fibroblasten in Anwesenheit von Gap27 ermittelt. Hierfür wurden konfluente Zellkulturen für 24 Stunden mit 60 μM Gap27 oder PBS inkubiert, anschließend das Gesamtprotein isoliert und das Cx43-Protein mittels Western Blot nachgewiesen. Abbildung 4.6 **A** zeigt die Western Blot Analyse von Cx43 in Gap27 behandelten bzw. Kontrollkulturen infanten Keratinozyten und Fibroblasten. Die Behandlung der

Zellen mit 60 μM Gap27 hat keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Proteinlevel von Cx43 (**B**).

Cx43 ist ein Phosphoprotein, das an seinem C-Terminus zahlreiche Phosphorylierungsstellen aufweist. Es hat sich gezeigt, dass die Phosphorylierung am Serinrest 368 von Cx43 (PS368-Cx43) die Durchlässigkeit von GJs und somit die GJIC hemmt und dass diese Art der Modifikation auch in der Wundheilung eine Rolle spielt (Lampe et al. [2000]; Richards et al. [2004]). Da Gap27 ebenfalls eine Hemmung der Cx-vermittelten Kommunikation bewirkt, wurde hier zusätzlich der Effekt von Gap27 auf den Phosphorylierungsstatus ermittelt, indem ein spezifischer Antikörper gegen PS368-Cx43 verwendet wurde. Das Proteinlevel von PS368-Cx43 ist in Anwesenheit von Gap27 deutlich verstärkt (Abb. 4.6 **A**). Dies wirkt sich auch auf das PS368-Cx43/Cx43-Verhältnis aus, das durch Gap27 sowohl in Keratinozyten als auch in Fibroblasten signifikant erhöht wird (**C**). Dieser Effekt fällt in den Fibroblasten noch etwas stärker aus als in den Keratinozyten.

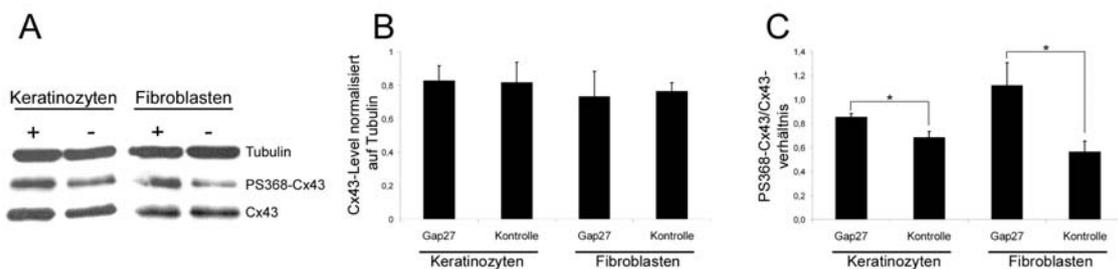


Abbildung 4.6: Einfluss von Gap27 auf die Cx43-Proteinlevel und -Phosphorylierung *in vitro*. (A) Western Blot Analyse der Proteinlevel von Tubulin, PS368-Cx43 und Cx43 in infanten Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen, die für 24 Stunden mit 60 μM Gap27 (+) oder PBS (-) behandelt wurden. (B) Darstellung der auf Tubulin normalisierten Cx43-Level in mit Gap27 behandelten Keratinozyten und Fibroblasten verglichen mit Kontrollzellen. (C) Darstellung des PS368-Cx43/Cx43-Verhältnisses in mit Gap27 behandelten Keratinozyten und Fibroblasten verglichen mit Kontrollzellen ($n = 5$; *: $p \leq 0.05$; Mittelwerte \pm SEM).

4.2.3 Einfluss von Gap27 auf die Proliferation infanter Keratinozyten und Fibroblasten im *Scratch-Assay*

Die Formation des Granulationsgewebes sowie die Reepithelialisierung sind entscheidende Prozesse im Verlauf der kutanen Wundheilung, die mit der Proliferation und Migration von Fibroblasten und Keratinozyten einhergehen. Aus diesem Grund wurde der Effekt des Cx-mimetischen Peptids Gap27 auf die Proliferation und Migration von Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen unter-

sucht. Um *in vitro* eine Wundheilungssituation zu simulieren, wurden die Kulturen mittels *Scratch* verwundet.

Im porcinen *ex vivo* WHM konnte bereits gezeigt werden, dass Gap27 proliferationssteigernd auf die Zellen der regenerierenden Epidermis wirkt. Hier wurde nun der Effekt von Gap27 auf die Proliferation von Keratinozyten und Fibroblasten in *in vitro* Wunden untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen auf Glasdeckgläschen kultiviert. Nach Erreichen vollständiger Konfluenz wurde eine sogenannte *Scratch*-Wunde im Zellrasen gesetzt und anschließend die Proliferation am *Scratch*-Rand zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt, indem der Proliferationsmarker Ki67 immunzytologisch nachgewiesen wurde. Pro Ansatz wurden fünf Gesichtsfelder in 40-facher Vergrößerung fotografiert und ausgezählt.

Abbildung 4.7 zeigt die Auswirkungen von Gap27 auf die Proliferation infanter Keratinozyten- (A) und Fibroblastenkulturen (B) im Proliferationsassay. In beiden Zellarten führt Gap27 gegenüber der Kontrolle zu einer signifikanten Steigerung des Anteils proliferativer Zellen am *Scratch*-Wundrand bezogen auf die Gesamtzellzahl. Dies gilt für alle betrachteten Zeitpunkte (24, 48 und 72 Stunden). Vergleichbar zu den für das WHM gezeigten Ergebnissen findet auch *in vitro* eine durch Gap27 vermittelte Proliferationssteigerung in den Zellen statt, die die Wunde verschließen.

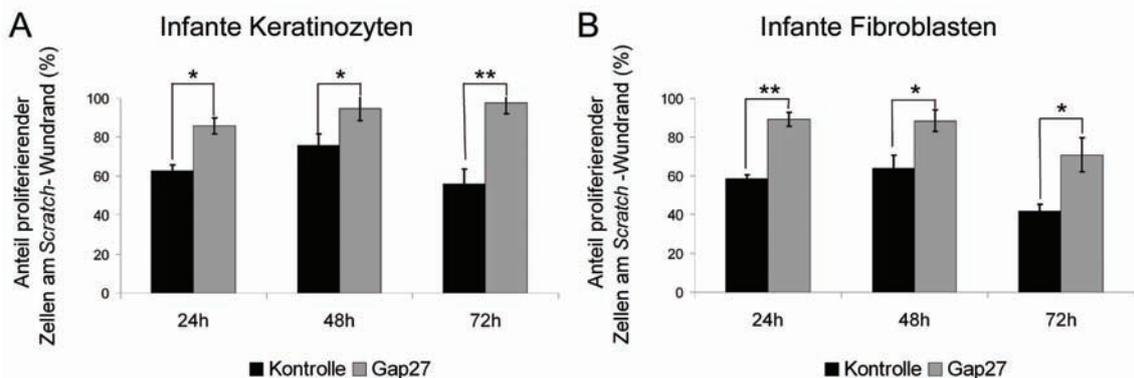


Abbildung 4.7: Effekt von Gap27 auf die Proliferation infanter Zellkulturen im *Scratch*-Assay. Anteil proliferierender (Ki67-positiver) Zellen im Proliferationsassay von humanen infanten Keratinozyten- (A) und Fibroblastenkulturen (B), die mit 60 μ M Gap27 oder PBS (Kontrolle) behandelt wurden, bezogen auf die Gesamtzellzahl (n = 14 (Keratinozyten); n = 10 (Fibroblasten)); *: p ≤ 0,05, **: p ≤ 0,01; Mittelwerte ± SEM).

4.2.4 Einfluss von Gap27 auf die Migration infanter Keratinozyten und Fibroblasten

Um eine fundierte Aussage über den Einfluss von Gap27 auf die Zellmigration treffen zu können, wurden Zellen verwendet, deren Proliferation zuvor durch Bestrahlung inhibiert worden war. Die konfluenten Kulturen wurden dann mittels *Scratch* verletzt und die Breite dieser Wunde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung ausgemessen, wobei die Ausgangsbreite auf 100 % gesetzt wurde.

Abbildung 4.8 zeigt infante Keratinozyten und Fibroblasten im Migrationsassay über einen Zeitraum von 48 Stunden. Gap27 beschleunigt in beiden Zellarten die Migration signifikant gegenüber den mit PBS behandelten Kontrollen (**C**, **D**). In den mit Gap27 behandelten Kulturen ist der *Scratch* zum Zeitpunkt 48 Stunden komplett geschlossen, wohingegen er in den Kontrollkulturen noch 15 – 20 % der Ausgangsbreite aufweist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Gap27 in infanten Kulturen kutaner Zellen die Halbkanalaktivität hemmt, die Phosphorylierung von Cx43 erhöht und zelluläre Prozesse der Wundheilung, nämlich die Proliferation und Migration, fördert.

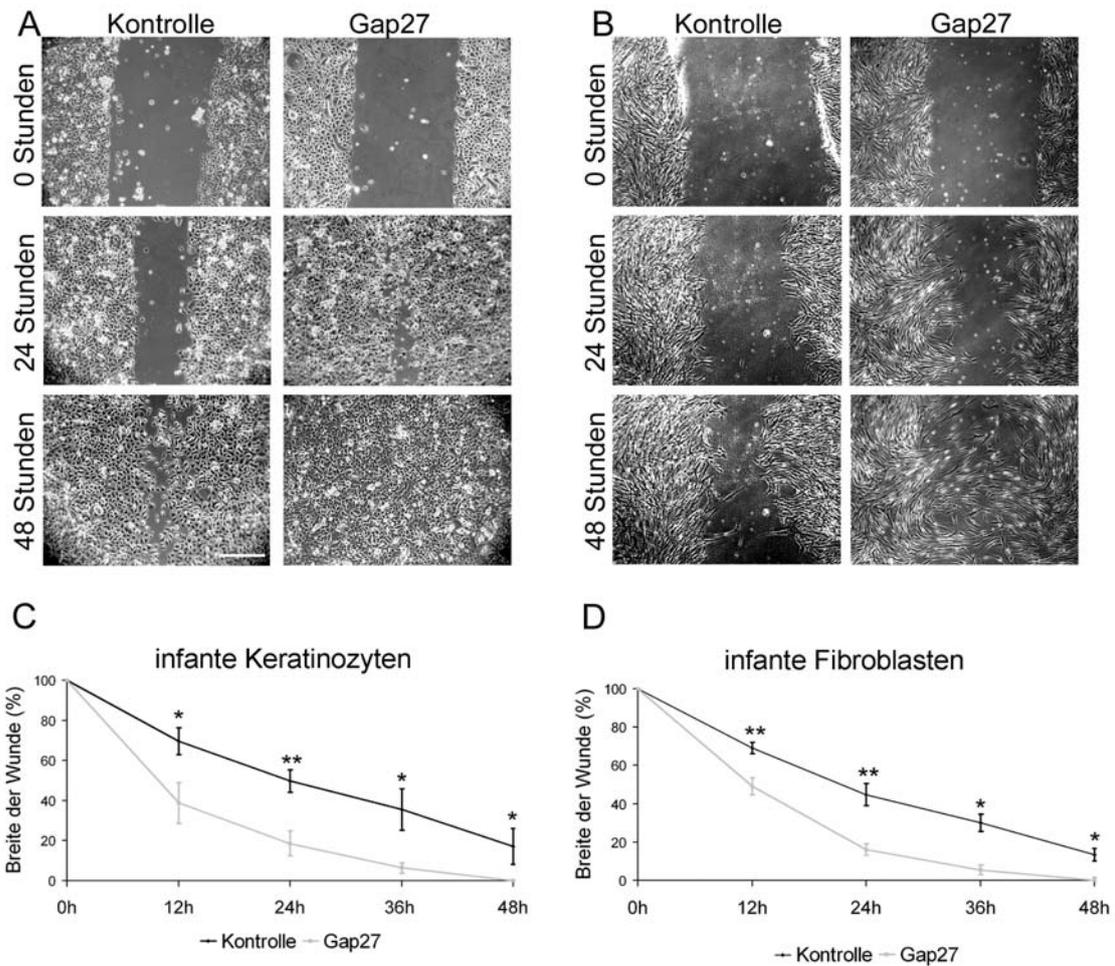


Abbildung 4.8: Effekt von Gap27 auf die Migration infanten Zellkulturen. (A, B) Migrationsassay mit proliferationsinhibierten primären Keratinozyten (A) und Fibroblasten (B), die mit 60 μ M Gap27 oder PBS (Kontrolle) behandelt wurden (Längenmaßstab = 100 μ m). (C, D) Breite der *Scratch*-Wunde in Keratinozyten- (C) und Fibroblastenkulturen (D), die mit 60 μ M Gap27 oder PBS (Kontrolle) behandelt wurden, zu den Zeitpunkten 0, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach Verwundung (n = 14; *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$; Mittelwerte \pm SEM; Hinweis: Ein niedrigerer Wert bedeutet eine schnellere Migration).

4.3 Einfluss von Gap27 auf adulte diabetische und nicht-diabetische Zellen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das Cx-mimetische Peptid Gap27 einen proliferations- und migrationssteigernden Effekt auf infante humane Keratinozyten und Fibroblasten hat. Als potentielles Wundheilungstherapeutikum ist es jedoch wichtig, dass die Wirksamkeit auch für adulte Zellen getestet wird, da eine spätere Anwendung vor allem für ältere Menschen interessant sein wird. Da ein Großteil der Wundpatienten an einem Diabetes Mellitus Typ II leidet und beschrieben wurde, dass sich Zellen diabetischen Ursprungs *in vitro* anders verhalten als Zellen von stoffwechselgesunden Spendern (Loots et al. [2002]; Lerman et al. [2003]; Brandner et al. [2008]), wurden zusätzlich adulte diabetische Keratinozyten und Fibroblasten untersucht.

4.3.1 Einfluss von Gap27 auf die Proliferation adulter Zellen im *Scratch*-Assay

In konfluenten Kulturen von adulten nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten und Fibroblasten wurde eine *Scratch*-Wunde gesetzt und ein Proliferationsassay durchgeführt, wie in Abschnitt 4.2.3 für infante Zellen beschrieben wurde.

In Abbildung 4.9 ist zu erkennen, dass Gap27 die Proliferation von adulten nicht-diabetischen Keratinozyten (**A**) und Fibroblasten (**B**) signifikant erhöht, in den Keratinozyten zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden, in den Fibroblasten zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Verwundung. Es kann demnach ein ähnlicher Effekt wie auf infante Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 4.7), wenn auch nicht ganz so ausgeprägt. Im Gegensatz dazu hat die Behandlung mit Gap27 keinen Effekt auf die Proliferation diabetischer Keratinozyten (Abb. 4.9 **C**) und Fibroblasten (Abb. 4.9 **D**), solange sie sich in frühen Passagen (P2 – P5) befinden. In späteren Passagen (P12 – P15) jedoch sprechen sie, ähnlich wie nicht-diabetische Zellen, auf die Gap27-Behandlung an (Abb. 4.9 **E, F**). Zudem ist auffällig, dass die diabetischen Zellen in frühen Passagen eine sehr viel geringere Proliferation aufweisen als die nicht-diabetischen. Auch diese Beobachtung gilt für die späten Passagen der diabetischen Zellen nicht mehr.

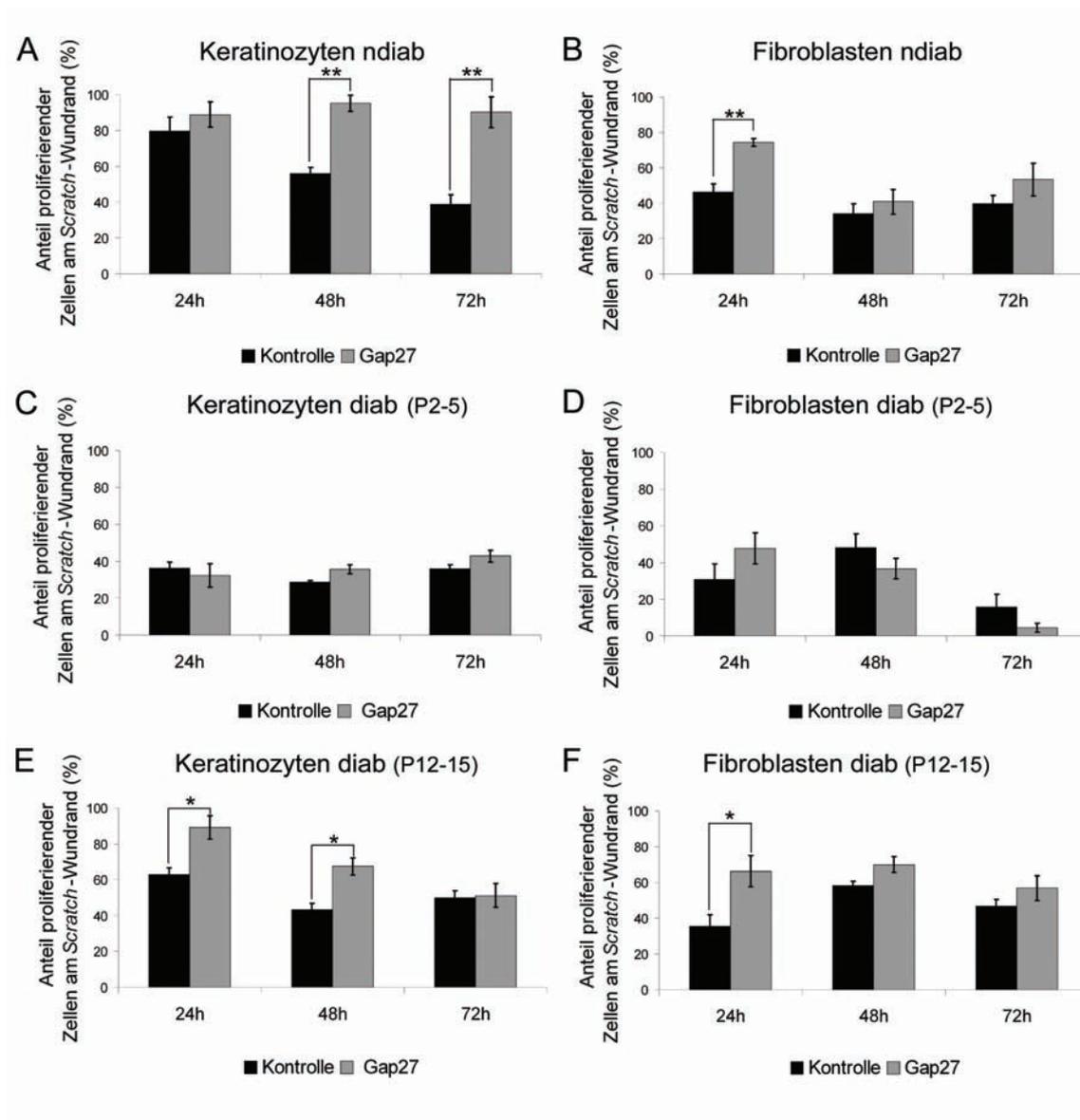


Abbildung 4.9: Effekt von Gap27 auf die Proliferation in adulten Zellkulturen im *Scratch*-Assay. Anteil proliferierender (Ki67-positiver) Zellen im *Scratch*-Assay in humanen adulten nicht-diabetischen (ndiab) Keratinocyten (A) und Fibroblasten (B), adulten diabetischen (diab) Keratinocyten (C) und Fibroblasten (D) in frühen Passagen (P2 – P5) sowie adulten diabetischen Keratinocyten (E) und Fibroblasten (F) in späten Passagen (P12 – P15), die mit 60 μ M Gap27 oder PBS (Kontrolle) behandelt wurden, bezogen auf die Gesamtzellzahl am Wundrand (n = 10; *: p ≤ 0.05, **: p ≤ 0.01; Mittelwerte ± SEM).

4.3.2 Einfluss von Gap27 auf die Migration adulter Zellen

Analog zu den in Abschnitt 4.2.4 beschriebenen Experimenten wurde mit diabetischen und nicht-diabetischen Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen ein Migrationsassay durchgeführt, um den Effekt von Gap27 auf die Mobilität adulter Zellen zu untersuchen. Das Ergebnis stellt sich ähnlich dar wie bei den Untersuchungen zur Proliferation (Abschnitt 4.3.1). Abbildung 4.10 **A** und **B** zeigen die Migration von nicht-diabetischen Keratinozyten und Fibroblasten. 60 μM Gap27 führt zu einer signifikant beschleunigten Migration im Vergleich zur Kontrolle, wobei dieser Effekt, vor allem im Fall der Fibroblasten, nicht ganz so stark ausgeprägt ist wie bei infanten Zellen (Abb. 4.8). Diabetische Zellen in frühen Passagen zeigen kein Ansprechen auf 60 μM Gap27 (Abb. 4.10 **C**, **D**), und auch Konzentrationen von 6 bzw. 600 μM führen zu keiner Änderung des Migrationsverhaltens (nicht gezeigt). Die gleichen Zellen in späteren Passagen werden durch Gap27 jedoch signifikant zur Migration stimuliert (**E**, **F**). Dieser Unterschied zwischen frühen und späten Passagen ist allerdings bei den Keratinozyten stärker ausgeprägt als bei den Fibroblasten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Zellen diabetischen Ursprungs eine geringere Sensitivität gegenüber dem Cx-mimetischen Peptid Gap27 zeigen als Zellen nicht-diabetischen Ursprungs. Diabetische Keratinozyten und Fibroblasten verfügen zudem in den ersten Passagen über einen Phänotyp, der bei längerer Kultivierung verloren geht.

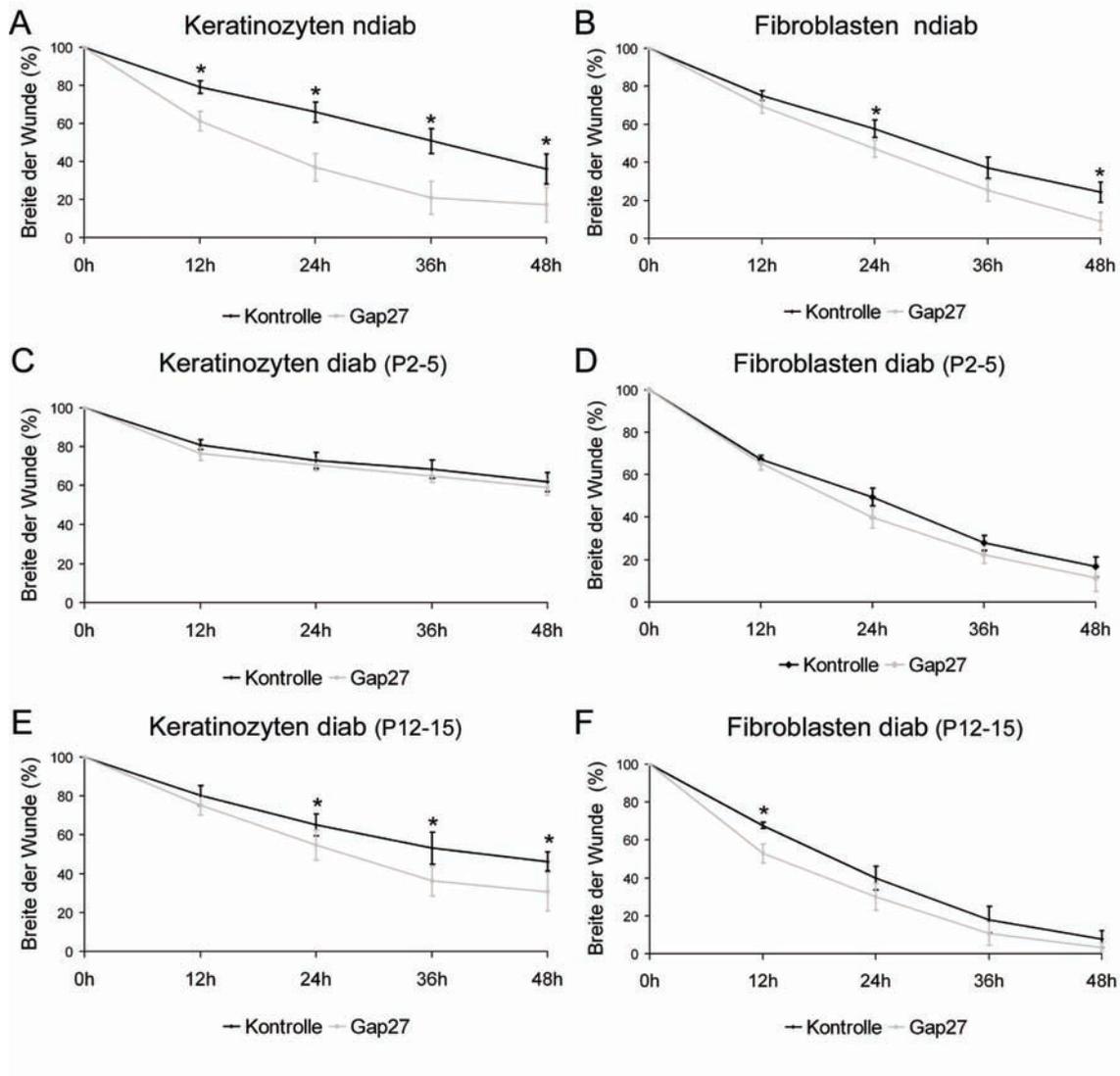


Abbildung 4.10: Effekt von Gap27 auf die Migration primärer Zellkulturen. Breite der *Scratch*-Wunde in proliferationsinhibierten humanen adulten nicht-diabetischen (ndiab) Keratinozyten (A) und Fibroblasten (B), adulten diabetischen (diab) Keratinozyten (C) und Fibroblasten (D) in frühen Passagen (P2 – P5) sowie adulten diabetischen Keratinozyten (E) und Fibroblasten (F) in späten Passagen (P12 – P15), die mit 60 μ M Gap27 oder PBS (Kontrolle) behandelt wurden, zu den Zeitpunkten 0, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach Verwundung (n = 14; *: p \leq 0.05; Mittelwerte \pm SEM).

4.3.3 Einfluss von Gap27 auf das Proteinlevel und die Phosphorylierung von Cx43 in adulten Zellen

Es stellte sich nun die Frage nach der Ursache der unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Gap27, die Zellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs aufweisen. Deshalb wurde untersucht, ob die in frühen Passagen beobachteten Unterschiede zwischen adulten Zellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs auf Unterschiede in der Cx-Epression zurückzuführen sind. Zu diesem Zweck wurden in konfluenten Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen das Proteinlevel sowie die Lokalisation von Cx43 ermittelt.

Es besteht kein Unterschied in der immunzytologischen Lokalisation von Cx43 zwischen adulten nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten und Fibroblasten (siehe Abbildung 4.11 **A, B, D, E**). Auch die Western Blot Analysen zeigen vergleichbare Proteinlevel von Cx43 in den Zellen verschiedenen Ursprungs (Abb. 4.11 **C, F, G, H**).

In Abschnitt 4.2.2 wurde beschrieben, dass Gap27 in infanten Keratinozyten und Fibroblasten Cx43 nicht beeinflusst, aber eine Änderung des Phosphorylierungsstatus von Cx43 bewirkt. Auch in adulten nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten und Fibroblasten verändert Gap27 nicht das Proteinlevel von Cx43 (Abb. 4.11 **G, H**), verursacht aber eine deutliche Erhöhung des PS368-Cx43/Cx43-Verhältnisses (**I, J**). Dieser Effekt ist jedoch nur im Fall von Fibroblasten statistisch signifikant.

Es kann festgehalten werden, dass die beobachteten Unterschiede zwischen Zellen nicht-diabetischen und diabetischen Ursprungs nicht mit Unterschieden im Proteinlevel von Cx43 zu erklären sind. Zudem scheint die vermehrte Phosphorylierung von Cx43 durch Gap27 ein Phänomen zu sein, das unabhängig vom Ursprung der Zellen auftritt.

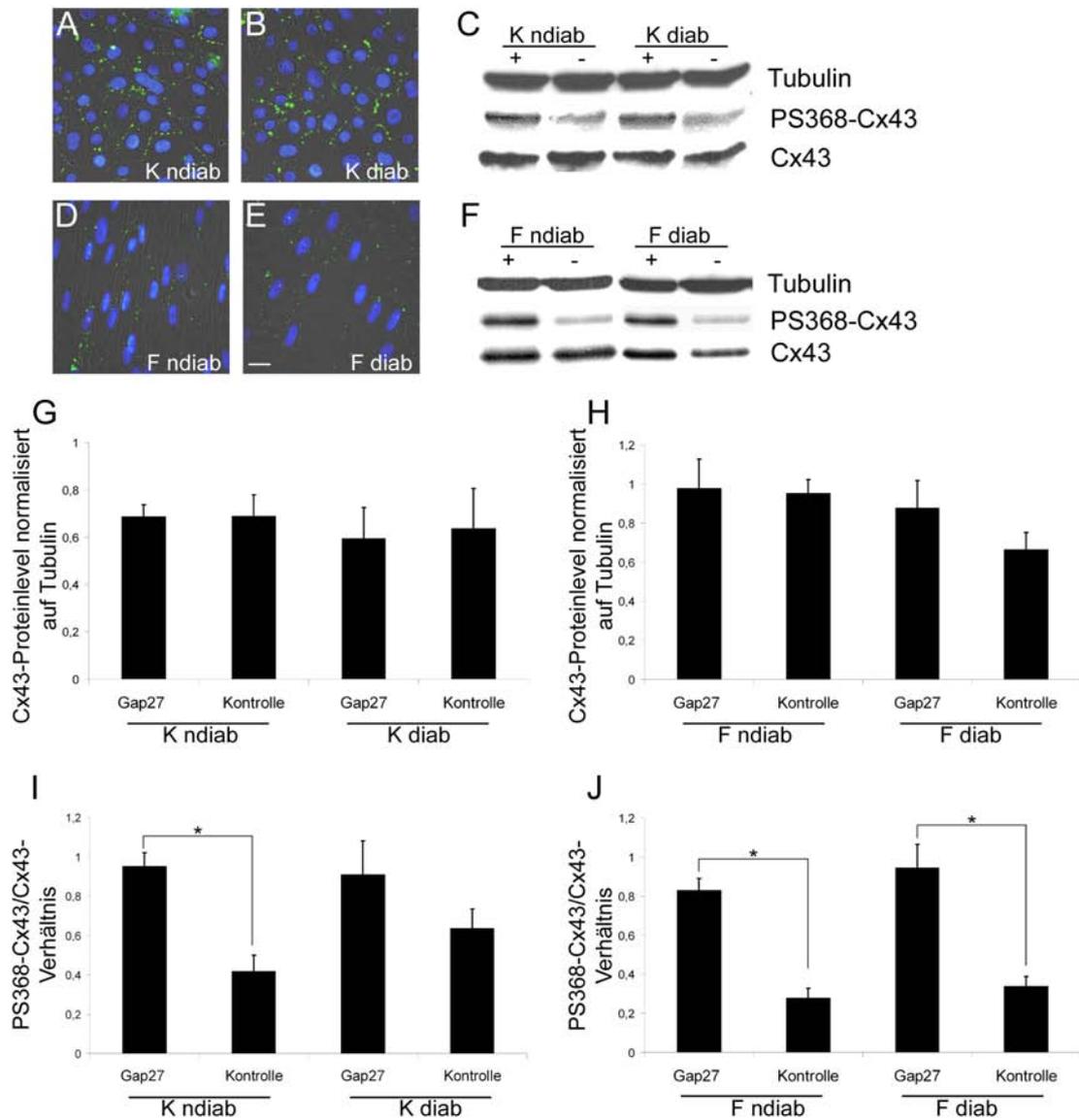


Abbildung 4.11: Vergleich der Cx43-Proteinlevel in adulten nicht-diabetischen und diabetischen Zellen. (A, B) Immunzytologischer Nachweis von Cx43 (grün) in nicht-diabetischen (K ndiab) und diabetischen (K diab) Keratinozytenkulturen (Zellkerne sind mit DAPI blau markiert). (C) Western Blot Analyse der Expression von Tubulin, PS368-Cx43 und Cx43 in nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozytenkulturen, die für 24 Stunden mit 60 μM Gap27 (+) oder PBS (-) behandelt wurden. (D, E) Immunzytologischer Nachweis von Cx43 (grün) in nicht-diabetischen (F ndiab) und diabetischen (F diab) Fibroblastenkulturen (Zellkerne sind mit DAPI blau markiert). (F) Western Blot Analyse der Expression von Tubulin, PS368-Cx43 und Cx43 in nicht-diabetischen und diabetischen Fibroblastenkulturen, die für 24 Stunden mit 60 μM Gap27 (+) oder PBS (-) behandelt wurden. (G, H) Darstellung der Cx43-Expression in nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten (G) und Fibroblasten (H) in An- und Abwesenheit von 60 μM Gap27 normiert auf die Tubulin-Level. (I, J) Statistische Darstellung des PS368-Cx43/Cx43-Verhältnisses in nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten (I) und Fibroblasten (J) in An- und Abwesenheit von 60 μM Gap27 (Längenmaßstab = 20 μm ; n = 5; *: $p \leq 0.05$; Mittelwerte \pm SEM).

4.3.4 Einfluss von Gap27 auf Cx-Halbkanäle adulter Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Gap27 einen signifikanten Einfluss auf Cx-Halbkanäle von infanten Keratinozyten und Fibroblasten hat. Hier sollte untersucht werden, ob auch in adulten Zellen die Farbstoffaufnahme durch Gap27 reduziert wird. Dazu wurden Halbkanalassays mit nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten und Fibroblasten (P2 – P5), wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, durchgeführt.

Abbildung 4.12 zeigt zunächst die Gegenüberstellung der Aufnahme des Farbstoffs Propidium Iodid von infanten, adulten nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten (**A**) und Fibroblasten (**B**). In beiden Zellarten fällt die Farbstoffaufnahme von diabetischen Zellen signifikant geringer aus als die der infanten Zellen. Bei den Keratinozyten ist auch der Unterschied zwischen adulten nicht-diabetischen und diabetischen Zellen signifikant. Im Gegensatz dazu zeigen adulte nicht-diabetische Fibroblasten eine ähnlich geringe Farbstoffaufnahme wie diabetische und signifikant weniger als infantile Zellen. Die Behandlung der Kulturen mit 60 μ M Gap27, Gap18 oder PBS führt zu einer signifikant reduzierten PI-Aufnahme in adulten Keratinozyten (**C**) und Fibroblasten (**D**) im Vergleich zu den Kontrollen. Auch in diabetischen Zellen führt Gap27 zu einer verminderten PI-Aufnahme, dieser Effekt fällt jedoch sehr viel geringer aus (**E**, **F**). Gap27 hat keinen Effekt auf die zelluläre Aufnahme der Kontrollfarbstoffe TRITC-Dextran und Calcein.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass sich Gap27 auf adulte nicht-diabetische Zellen einen vergleichbaren Effekt hat wie auf infantile Zellen. In diabetischen Keratinozyten und Fibroblasten wirkt es sich jedoch wesentlich geringer auf die Cx-Halbkanalaktivität aus als in nicht-diabetischen Zellen. In Keratinozyten findet man *per se* zudem deutliche Unterschiede in der Halbkanalaktivität zwischen Zellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs.

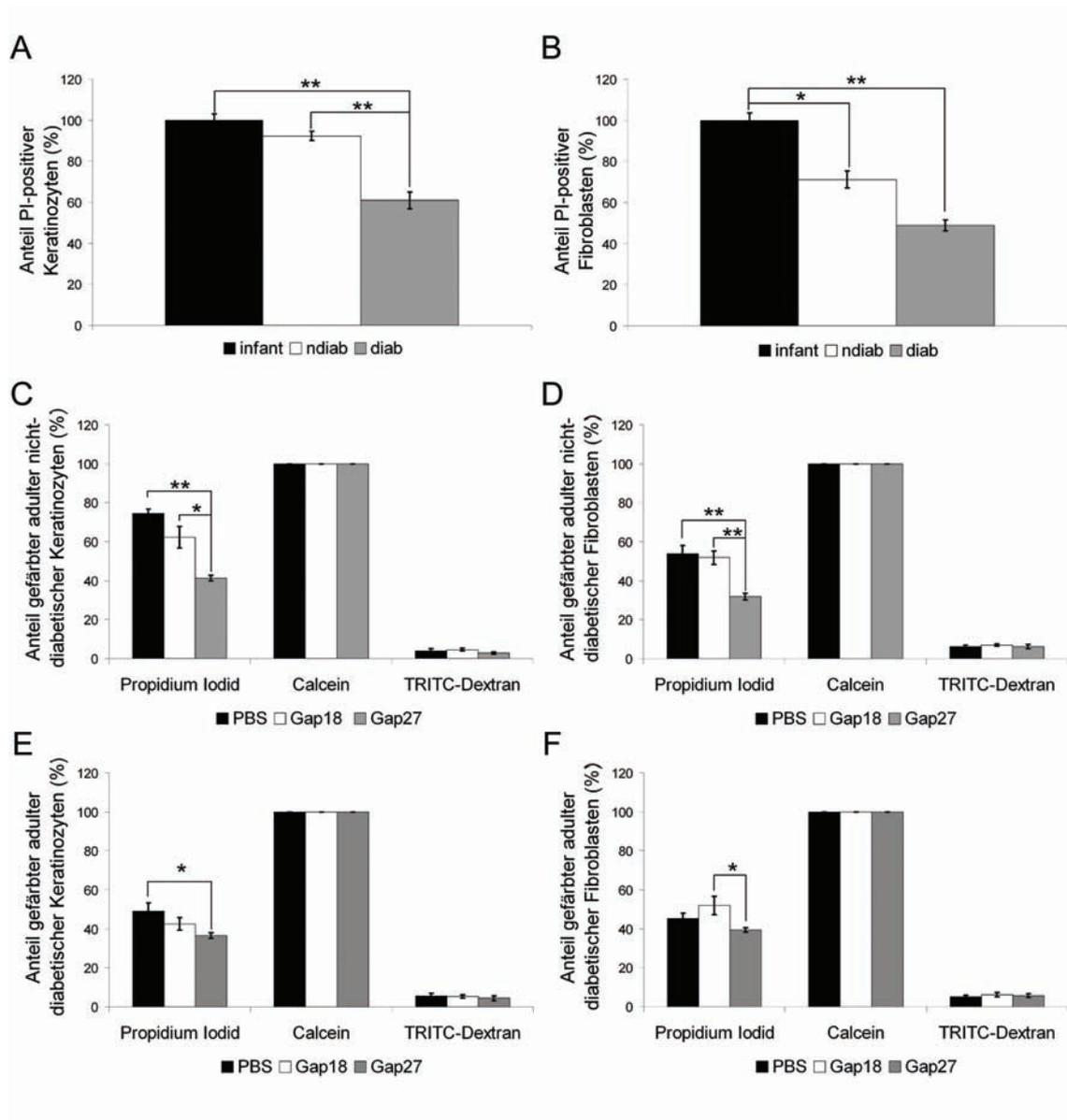


Abbildung 4.12: Effekt von Gap27 auf die Cx-Halbkanal-Aktivität in primären Zellkulturen. Anteil Propidium Iodid (PI) positiver Keratinozyten (A) und Fibroblasten (B) unterschiedlichen Ursprungs bezogen auf die für infantile Zellen ermittelten Werte (ndiab = nicht-diabetisch, diab = diabetisch). Anteil farbstoff-positiver adulter nicht-diabetischer Keratinozyten (C) und Fibroblasten (D) sowie adulter diabetischer Keratinozyten (E) und Fibroblasten (F), die mit 60 μ M Gap27, Gap18 oder PBS behandelt wurden, bezogen auf die jeweilige Gesamtzellzahl (n = 9; *: p \leq 0.05, **: p \leq 0.01; Mittelwerte \pm SEM).

4.3.5 Einfluss der Herkunft und Gap27-Behandlung auf die MMP-Sekretion primärer Keratinozyten

Matrixmetalloproteasen (MMPs) sind für die Keratinozyten-Migration während der Wundheilung wichtig. Sie ermöglichen die Bewegung über das Granulationsgewebe, indem sie kollagene Fasern verdauen, die den Zellen den Weg versperren (Saarialho-Kere et al. [1993]). Ihre Expression wird in akuten Wunden räumlich und zeitlich streng reguliert (Soo et al. [2000]). Hierfür sind die Inhibitoren der MMPs, die TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), verantwortlich. Diabetische Wunden zeichnen sich im Gegensatz zu akuten Wunden durch eine durchgehend erhöhte MMP-Expression und ein gesteigertes MMP/TIMP-Verhältnis aus (Yager and Nwomeh [1999]). Da in der vorliegenden Arbeit deutliche Unterschiede zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Keratinozyten bezüglich ihrer Migration, Proliferation und Cx-Halbkanalaktivität identifiziert werden konnten, wurde hier mit Hilfe eines Antikörper-Arrays (RayBio) die Sekretion von MMPs und TIMPs dieser Zellen während eines Migrationsassays untersucht, welcher auf Kollagen-beschichteten 12-Well-Platten durchgeführt worden war. Zu diesem Zweck wurden die Zellkulturüberstände 48 Stunden nach *Scratch*-Verwundung von jeweils fünf Keratinozytenlinien infanter, adulter diabetischer und adulter nicht-diabetischer Spender gesammelt und als *gepoolte* Probe in das Array eingesetzt.

In Abbildung 4.13 **A** ist die Auswirkung des Ursprungs der Zellen auf die Sekretion von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-10 sowie TIMP-1 und TIMP-2 dargestellt. Dabei handelt es sich um Moleküle, die nachweislich am Wundheilungsprozess beteiligt sind (zur Übersicht siehe Kähäri and Saarialho-Kere [1997]). Keratinozyten diabetischen Ursprungs zeigen eine 6-fach bzw. 2-fach höhere MMP-1 Expression als infante bzw. adulte nicht-diabetische Zellen. Ihr MMP-2-Level fällt dagegen geringer aus als in den Kontrollen. Adulte Zellen weisen, unabhängig von ihrer Herkunft, höhere MMP-3-Level auf als infante Zellen. MMP-9 wird wiederum von diabetischen Keratinozyten sehr stark sekretiert, das Level liegt 2-fach bzw. 10-fach höher als in infanten bzw. adulten nicht-diabetischen Zellen. Auch von MMP-10 werden die höchsten Level in diabetischen Kulturen gefunden, ebenso wie die des Proteaseinhibitors TIMP-1. Die Menge an TIMP-2 in den Zellkulturüberständen ist in adulten Zellen, unabhängig von ihrer Herkunft, geringer als in infanten Zellen.

Da die Migration infanter und adulter nicht diabetischer Keratinozyten durch das Cx-mimetische Peptid Gap27 signifikant erhöht werden konnte, diabetische Zellen jedoch nicht auf die Behandlung ansprachen, wurde auch der Effekt von Gap27 auf die MMP-Sekretion untersucht. Eine „gute“ Wundheilung zeichnet sich durch ein ausgeglichenes Verhältnis von MMPs zu TIMPs aus, da diese im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 aneinander binden (Kähäri and Saarialho-Kere [1997]). Aus diesem Grund wurde hier das MMP/TIMP-Verhältnis in Keratinozyten unterschiedlichen Ursprungs verglichen und untersucht, ob sich Gap27 auf dieses auswirkt. Da TIMP-1 und TIMP-2 grundsätzlich das Potential haben, jeden MMP-Typ zu inhibieren (Woessner [1999]), wurden hier alle untersuchten MMPs (1, 2, 3, 9, 10) und TIMPs (1, 2) einbezogen. Insgesamt ist das MMP/TIMP-Verhältnis *per se* in Keratinozyten diabetischen Ursprungs deutlich größer als in infanten und adulten nicht-diabetischen Zellen. Die Anwesenheit von Gap27 wirkt sich in allen untersuchten Zellen nur wenig auf das MMP/TIMP-Verhältnis aus (Abbildung 4.13 B).

Zusammenfassend zeigt das MMP-Array, dass Keratinozyten diabetischen Ursprungs insgesamt eine höhere MMP-Sekretion aufweisen als infantile und adulte nicht-diabetische Zellen. Die Gap27-Behandlung hat in keiner der untersuchten Kulturen einen Einfluss auf das MMP/TIMP-Verhältnis. Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass die verminderte Sensitivität diabetischer Zellen gegenüber dem migrationssteigernden Effekt von Gap27 auf einen unterschiedlichen Einfluss von Gap27 auf die Expression von MMPs und ihren Inhibitoren zurückzuführen ist.

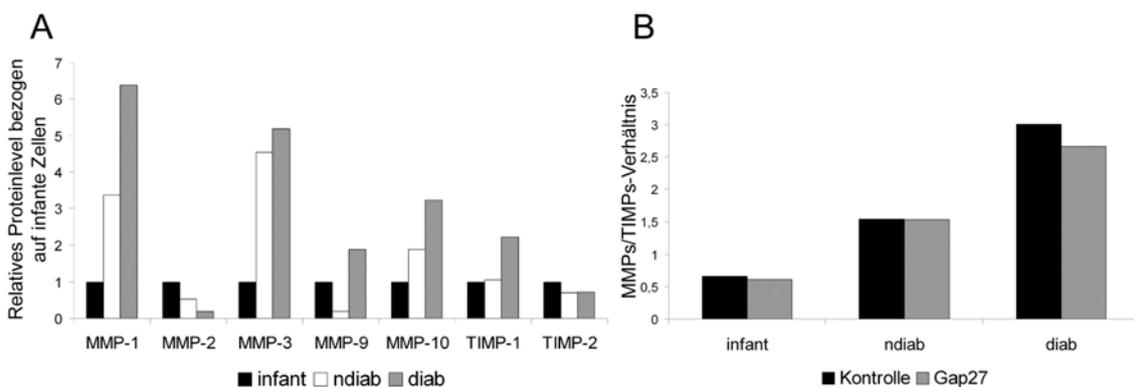


Abbildung 4.13: Einfluss der Herkunft und Gap27-Behandlung auf die MMP-Sekretion primärer Keratinozyten. (A) Relative Proteinlevel von MMP-1, MMP-2, MMP-9 und TIMP-2 in Zellkulturüberständen von Keratinozyten unterschiedlichen Ursprungs bezogen auf infantile Zellen. (B) Relatives MMP/TIMP-Verhältnis in Keratinozyten unterschiedlicher Herkunft und Behandlung bezogen auf die PBS-behandelte Kontrolle (ndiab = nicht-diabetisch, diab = diabetisch).

4.4 *In vitro* Effekte von Gap27 unter hyperglycämischen Bedingungen

Aufgrund der beobachteten Unterschiede zwischen Zellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Gap27 sowie ihrer Cx-Halbkanalaktivität ergab sich die Frage nach der Ursache dieser Unterschiede. Da eine Diabeteserkrankung mit einem gestörten Glucosestoffwechsel assoziiert ist, könnte die Hyperglycämie, der die Zellen diabetischen Ursprungs ausgesetzt waren, ein möglicher Grund für die beobachteten Unterschiede sein. Deshalb wurden *in vitro* Versuche mit infanten Zellen durchgeführt, die unter hohen Glucosekonzentrationen kultiviert wurden. Die Manipulation der Glukosekonzentration ist ein häufig genutztes System, um in der Zell- und Gewebekultur eine diabetische Umgebung zu simulieren (Spravchikov et al. [2001]; Terashi et al. [2005]; Lan et al. [2008, 2009]).

4.4.1 Einfluss von Hyperglycämie auf die Lokalisation und das Proteinlevel von Cx43

Hohe Glucosekonzentrationen wirken sich *in vitro* negativ auf die Mobilität, Proliferation und Genexpression von Zellen aus (Sibbitt et al. [1989]; Terashi et al. [2005]; Lan et al. [2008]). Welchen Effekt Glucose auf die Cx-Expression und Migration von humanen Keratinozyten und Fibroblasten hat, ist bisher noch unbekannt und wurde hier aus diesem Grund untersucht. Um die Vergleichbarkeit des hier verwendeten Systems mit veröffentlichten Daten zu validieren, wurde zusätzlich das Protein Fibronectin untersucht. Dieses ECM-Molekül wird in diabetischen Wunden häufig überexprimiert. Seine Induktion in hyperglycämischen Zellkulturen, u.a. in Fibroblasten, wurde bereits gezeigt (Kreisberg et al. [1994]; Benazzoug et al. [1998]; Yevdokimova and Podpryatov [2007]). Humane infanten Keratinozyten und Fibroblasten wurden für 48 Stunden in Anwesenheit von 6 bzw. 25 mM Glucose im Kulturmedium kultiviert und anschließend die Lokalisation sowie das Proteinlevel von Cx43 und Fibronectin mittels Immunzytologie bzw. Western Blot Analyse bestimmt.

Die immunzytologischen Aufnahmen zeigen, dass Cx43 in Keratinozyten in Anwesenheit von 25 mM Glucose weniger an den Zellgrenzen lokalisiert ist (Abb. 4.14 **A**, **B**). Eine vergleichbare Tendenz ist auch in der Western Blot Analyse zu erkennen (**E**), die ein signifikant geringeres

Cx43-Level in Keratinozyten zeigt, die mit 25 mM Glucose kultiviert worden sind (**F**). Im Gegensatz dazu kann eine deutlich verstärkte Lokalisation von Fibronektin in den hyperglycämischen Keratinozyten gefunden werden (Abb. 4.14 **C, D**). Im Western Blot ergibt sich ein signifikant erhöhtes Proteinlevel von Fibronektin (**E, F**).

Im Gegensatz zu der bei Keratinozyten beobachteten Herunterregulation von Cx43 unter „diabetischen“ Bedingungen ergibt sich bei Fibroblasten keine Veränderung der Cx43-Expression in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration (Abb. 4.14 **G, H, K, L**). Wie bereits beschrieben (Benazzoug et al. [1998]), wird auch hier die Fibronektin-Expression in Anwesenheit von 25 mM Glucose signifikant heraufreguliert (Abb. 4.14 **I, J, K, L**).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich hohe Glucosekonzentrationen wenig (Keratinozyten) bzw. gar nicht (Fibroblasten) auf die Expression von Cx43 auswirken. Hier sind deutliche Parallelen zu den Zellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs festzustellen, in denen ebenfalls keine unterschiedlichen Cx43-Level gefunden wurden (siehe Abschnitt 4.3.3).

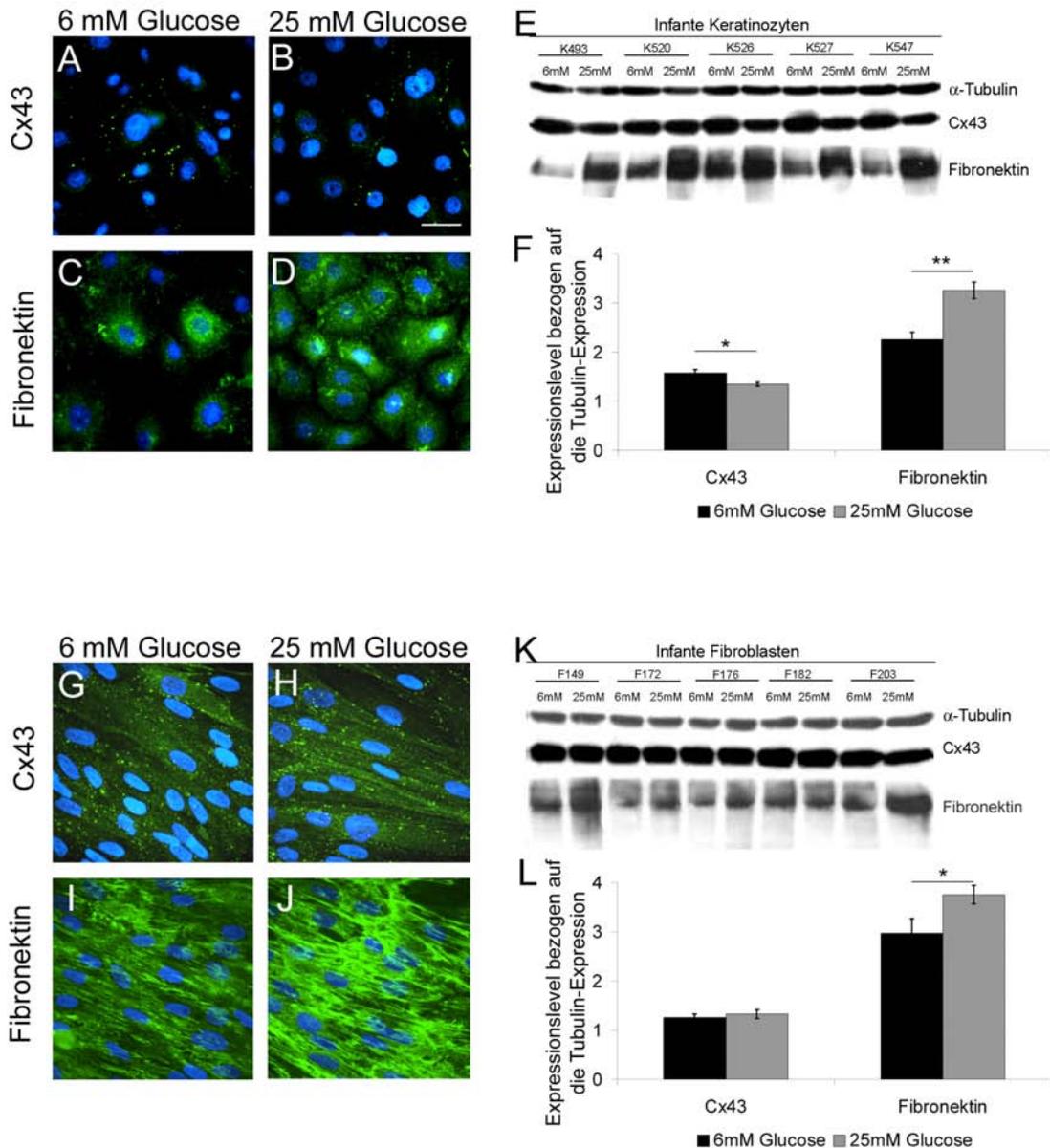


Abbildung 4.14: Effekte von Glucose auf Lokalisation und Expression von Cx43 und Fibronectin in Keratinozyten und Fibroblasten. (A – D) Immunzytologische Lokalisation von Cx43 (grün; A, B) und Fibronectin (grün; C, D) in mit 6 mM (A, C) bzw. 25 mM (B, D) Glucose inkubierten infanten Keratinozyten (Zellkerne sind mit DAPI blau markiert; Längenmaßstab = 20 µm). (E) Western Blot Analyse von fünf infanten Keratinozytenlinien, die in 6 mM bzw. 25 mM Glucose kultiviert wurden. (F) Relative Expression von Cx43 und Fibronectin in infanten Keratinozyten bezogen auf die Tubulin-Expression, die in 6 mM bzw. 25 mM Glucose kultiviert wurden (n = 5; *: p ≤ 0.05; **: p ≤ 0.01 Mittelwerte ± SEM). (G – J) Immunzytologische Lokalisation von Cx43 (G, H) und Fibronectin (I, J) in mit 6 mM (G, I) bzw. 25 mM (H, J) Glucose inkubierten infanten Fibroblasten (Längenmaßstab = 20 µm). (K) Western Blot Analyse von fünf infanten Fibroblastenlinien, die in 6 mM bzw. 25 mM Glucose kultiviert wurden. (L) Relative Expression von Cx43 und Fibronectin in infanten Fibroblasten bezogen auf die Tubulin-Expression, die in 6 mM bzw. 25 mM Glucose kultiviert wurden (n = 5; *: p ≤ 0.05; Mittelwerte ± SEM).

4.4.2 Vergleich des Einflusses von Hyperglycämie und Herkunft auf die Migration von Keratinozyten und Fibroblasten

Um die Ursachen des Einflusses einer diabetischen Umgebung auf die Mobilität kutaner Zellen zu analysieren, wurde der Effekt von Hyperglycämie auf die Migration humaner infanter Keratinozyten und Fibroblasten untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Migration nach *Scratch*-Verwundung in proliferationsinhibierten Kulturen in Anwesenheit von 6, 12 und 25 mM Glucose verfolgt.

Abbildung 4.15 zeigt, dass eine Erhöhung der Glucosekonzentration sowohl in Keratinozyten (**A**) als auch in Fibroblasten (**B**) zu einer konzentrationsabhängigen signifikanten Hemmung der Migrationsgeschwindigkeit führt. Ähnliche Tendenzen beobachtet man auch beim Vergleich diabetischer und nicht-diabetischer Keratinozyten. Keratinozyten, die aus diabetischen Patienten isoliert worden sind, migrieren signifikant langsamer als die nicht-diabetischen Kontrollzellen (**C**). Bei Fibroblasten allerdings zeigen tendenziell die diabetischen Zellen eine schnellere Migration (**D**).

Es kann somit festgestellt werden, dass sich Hyperglycämie negativ auf die Migration von Keratinozyten und Fibroblasten auswirkt. Dies spiegelt das Verhalten diabetischer Keratinozyten, nicht jedoch diabetischer Fibroblasten wider.

4.4.3 Einfluss von Gap27 auf die Migration von Zellen unter hyperglycämischen Bedingungen

Da Zellen diabetischen Ursprungs weniger sensitiv auf eine Gap27-Behandlung reagierten als nicht-diabetische Zellen, wurde nun untersucht, ob dies auch bei Zellen der Fall ist, die unter hyperglycämischen Bedingungen kultiviert worden sind. Dafür wurde die Migration nach *Scratch*-Verwundung in proliferationsinhibierten Kulturen in Anwesenheit von Gap27 über einen Zeitraum von 48 Stunden verfolgt.

In Keratinozyten, die mit 25 mM Glucose kultiviert worden sind, führt die Anwesenheit von 60 μ M Gap27 zu keinem migrationsfördernden Effekt (Abb. 4.16 **A**). In Fibroblastenkulturen kann eine leicht beschleunigte Migration in Anwesenheit von Gap27 beobachtet werden (**B**), die jedoch sehr viel geringer ausfällt als in Zellen, die unter physiologischen Bedingungen kultiviert worden sind (siehe Abschnitt 4.2.4).

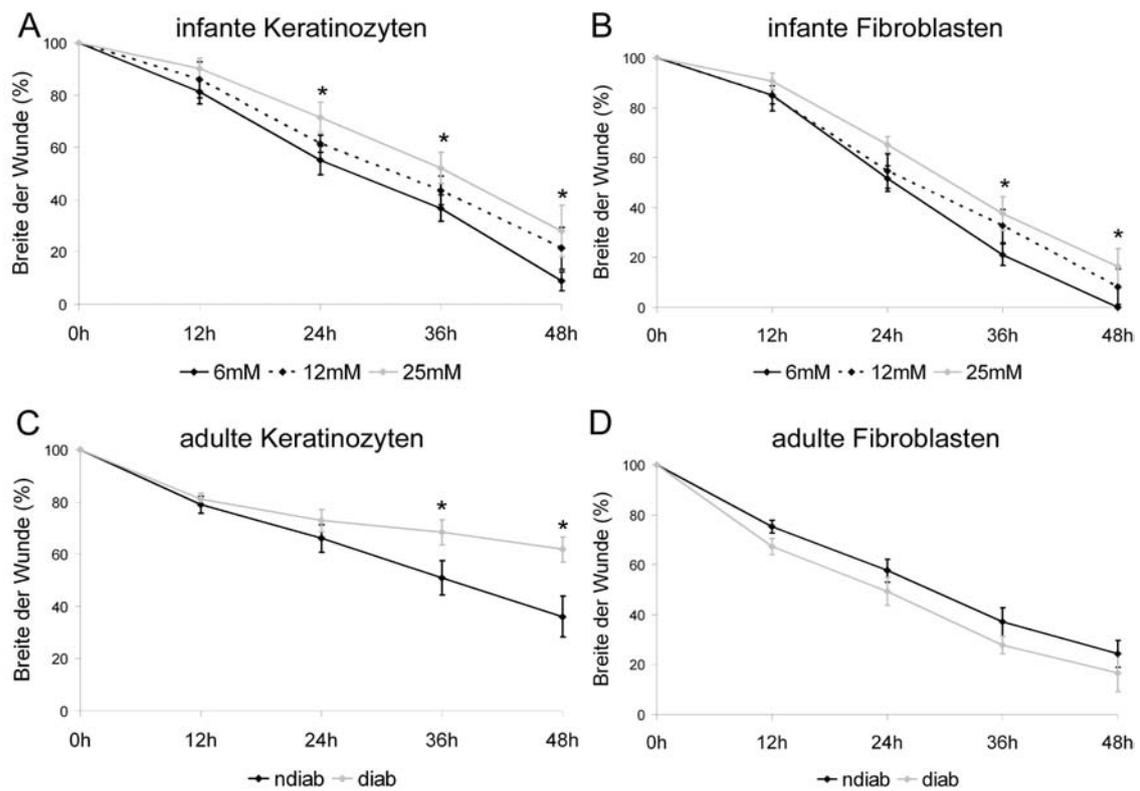


Abbildung 4.15: Effekte einer diabetischen Umgebung auf die Migration von Keratinozyten und Fibroblasten. (A, B) Migration nach *Scratch*-Verwundung in infanten Keratinozyten- (A) und Fibroblastenkulturen (B) in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Kulturmedium (n = 14; *: $p \leq 0.05$ (Unterschied zwischen 6mM und 25mM); Mittelwerte \pm SEM). (C, D) Migration nach *Scratch*-Verwundung in adulten diabetischen (diab) und nicht-diabetischen (ndiab) Keratinozyten- (C) und Fibroblastenkulturen (D; n = 6; *: $p \leq 0.05$; Mittelwerte \pm SEM).

Hyperglycämie führt in humanen infanten Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen demnach zu einer verminderten Sensitivität gegenüber Gap27, ein Effekt, der ebenso in Zellen diabetischer Herkunft beobachtet werden kann (siehe Abschnitte 4.3.1 und 4.3.2).

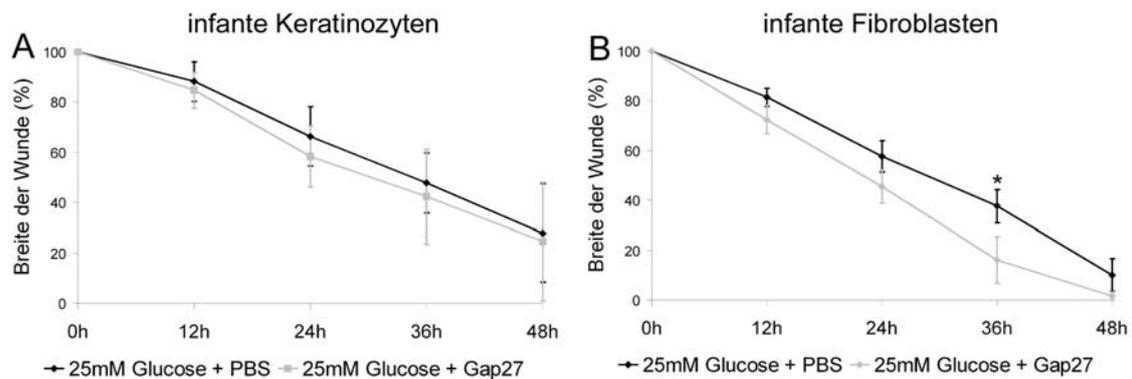


Abbildung 4.16: Effekt von Gap27 auf Zellen unter „diabetischen“ Bedingungen. Migration nach *Scratch*-Verwundung in proliferationsinhibierten humanen infanten Keratinozyten- (A) und Fibroblastenkulturen (B), die in Anwesenheit von 25 mM Glucose mit 60 μ M Gap27 behandelt wurden ($n = 6$; *: $p \leq 0.05$; Mittelwerte \pm SEM).

4.5 Effekt von Cx43-Antisense-Oligonukleotiden auf die Wundheilung

Die Applikation von Cx43-spezifischen *Antisense*-Oligonukleotiden in kutane Wunden von Mäusen und Ratten führt zu einer signifikant beschleunigten Heilung (Qiu et al. [2003]; Mori et al. [2006]). Zudem wurde beschrieben, dass diese Methode auch bei diabetischen Wunden von Nagern (Ratten) wirkt (Wang et al. [2007]). Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit beobachteten eingeschränkten Wirkung von Gap27 in humanen Zellen diabetischen Ursprungs wurden deshalb Cx43-spezifische *Antisense*-Oligonukleotide als alternative Methode verwendet.

4.5.1 Eignung verschiedener Cx43-Antisense-Sequenzen

Aus der Literatur sind zwei Sequenzen von Cx43-spezifischen *Antisense*-Oligonukleotiden (Cx43as-ODNs) bekannt, die als DB1 bzw. a1605 bezeichnet werden und auf unterschiedlichen Bereichen der Cx43-mRNA lokalisiert sind (Law et al. [2006]). Hier wurden sowohl DB1 als auch a1605

verwendet, wobei ihre Sequenz auf die jeweilige Cx43-Sequenz verschiedener Spezies angeglichen wurde: murin (ms), porcin (sw) und human (hu).

Interessanterweise konnte nur DB1-ms eine Herunterregulation der Cx43-Expression in infanten Keratinozyten hervorrufen (siehe Abbildung 4.17), die gegenüber der Expression in der *Sense*-Kontrolle signifikant war (Abb. 4.17 B). Dementsprechend wurde für alle nachfolgenden Experimente die DB1-ms Sequenz verwendet. DB1-ms wird im Folgenden als Cx43as-ODN bezeichnet.

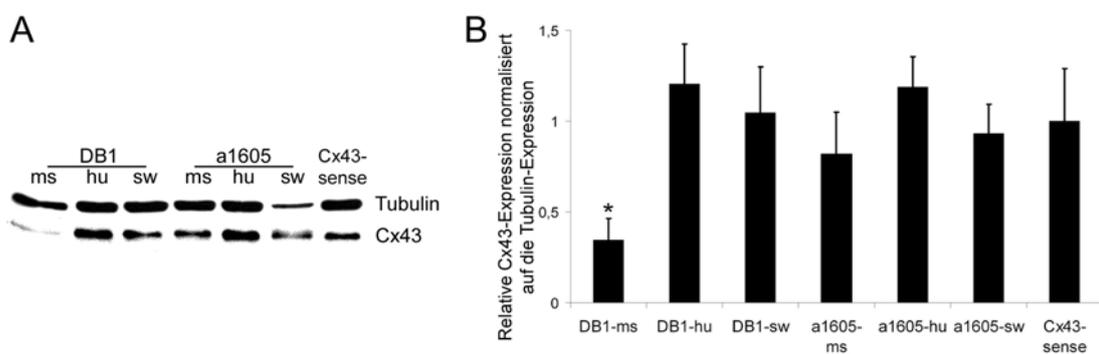


Abbildung 4.17: Vergleich der Effizienz verschiedener Cx43-Antisense-Sequenzen. (A) Beispielhafte Western Blot Analyse von humanen infanten Keratinozyten, die mit 20 µM Cx43-spezifischen *Antisense*-Oligonukleotiden bzw. der *Sense*-Kontrolle behandelt wurden. (B) Cx43-Proteinlevel in mit Cx43as-ODNs behandelten Keratinozyten normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level ($n = 4$; *: $p \leq 0.05$; Mittelwerte \pm SEM). Bei der hier dargestellten Kontrolle handelt es sich um die DB1-ms-*Sense*-Sequenz, die stellvertretend für alle *Sense*-Sequenzen aufgeführt ist.

4.5.2 Einfluss von Cx43as-ODNs auf die porcine *ex vivo* Wundheilung

Es wurde mehrfach von einer Arbeitsgruppe beschrieben, dass die Gabe der Cx43as-ODNs in 30 % Pluronic F-127 Gel die effizienteste Cx43-Herunterregulation in dreidimensionalen Systemen zur Folge hat, da das Gel eine Art Reservoir darstellt, das die ODNs sukzessive an das umliegende Gewebe abgibt (Qiu et al. [2003]; Mori et al. [2006]; Law et al. [2006]). Dabei handelt es sich um ein Polymer, dessen chemische Eigenschaften dazu führen, dass es in Wasser gelöst bei Raumtemperatur ein Gel ausbildet, wohingegen es bei Temperaturen unter 4°C in flüssiger Form vorliegt. Hier wurde die Effizienz von Cx43-*Antisense*-Oligonukleotiden gelöst in Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich) bzw. in DEPC-Wasser im WHM verglichen. Zu diesem Zweck wurden 20 µM Cx43as-ODNs in den beiden zu testenden Applikationsformen für 48 Stunden in porcinen *ex vivo*

WHM inkubiert und anschließend der Wundheilungsfortschritt ermittelt, wobei die Behandlung nach 24 Stunden wiederholt wurde.

In Abbildung 4.18 ist der Wundheilungsfortschritt zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Behandlung mit Cx43as-ODNs dargestellt. Cx43as-ODNs in Pluronic F-127 haben keinerlei positiven Einfluss auf die Wundheilung (**A**), während die gleiche Konzentration an ODNs in DEPC-Wasser zu einer signifikant beschleunigten Wundheilung im Vergleich zu der *Sense*-Kontrolle führt (Faktor 2,3; **B**). Aus diesem Grund wurden die Cx43as-ODNs in den nachfolgenden Experimenten in DEPC-Wasser in die *ex vivo* Wundmodelle appliziert.

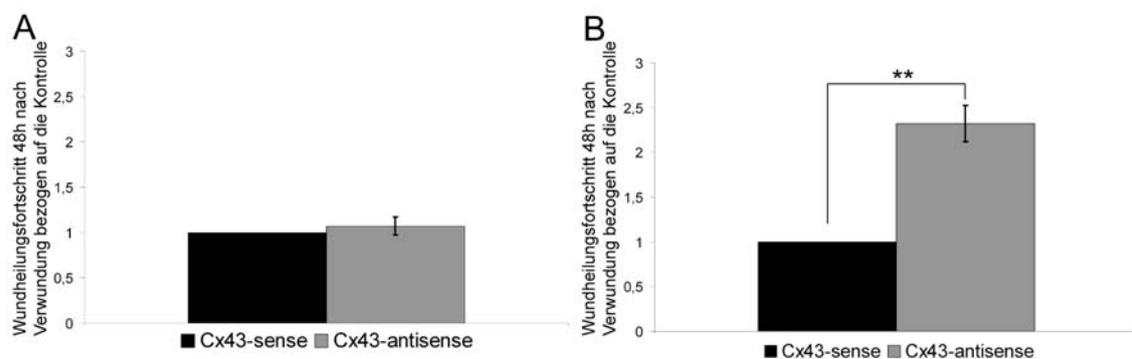


Abbildung 4.18: Effekt von Cx43-spezifischen *Antisense*-Oligonukleotiden auf die Wundheilung in *ex vivo* Wundheilungsmodellen. Vergleich des Wundheilungsfortschritts in porcinen WHM nach Behandlung mit 20 μ M *Antisense*-Oligonukleotiden gelöst in Pluronic F-127 Gel (**A**) bzw. in DEPC-Wasser (**B**) bezogen auf die *Sense*-Kontrolle (n = 6; **: p \leq 0.01; Mittelwerte \pm SEM).

4.5.3 Einfluss von Cx43as-ODNs auf die Cx-Lokalisation im *ex vivo* WHM

Cx43-spezifische *Antisense*-Oligonukleotide führen im WHM zu einer signifikant beschleunigten Wundheilung. Es wurde beschrieben, dass die Applikation von Cx43as-ODNs in murine Wunden innerhalb von 2 Stunden zu einer gegenüber der *Sense*-Kontrolle signifikant verstärkten Herunterregulation von Cx43 führt (Qiu et al. [2003]; Mori et al. [2006]). Deshalb wurde nun der Einfluss von Cx43as-ODNs auf die Cx43- und Cx26-Lokalisation und -Regulation in porcinen *ex vivo* Wundheilungsmodellen untersucht. Dazu wurden von WHM, die für unterschiedliche Zeiträume (2, 6, 18, 24 und 48 Stunden) mit 20 μ M Cx43as- bzw. Cx43s-ODNs inkubiert wurden, Gefrierschnitte angefertigt, auf denen immunhistologisch Cx43 und Cx26 nachgewiesen wurde.

Abbildung 4.19 zeigt den immunhistologischen Nachweis von Cx43 (rot) und Cx26 (grün) bzw. ihrer Co-Lokalisation (gelb) in porcinen *ex vivo* WHM zu den Zeitpunkten 2, 6, 18, 24 und

48 Stunden nach Verwundung. Nach 2 Stunden kann man in den Cx43as-ODNs behandelten Modellen bereits eine deutliche Cx43-Herunterregulation erkennen, die in den Kontroll-Modellen sehr viel schwächer ausfällt (Abb. 4.19 **A, B**). Zudem wird in den *Antisense*-Modellen bereits zu diesem frühen Zeitpunkt eine schwache Cx26-Expression induziert, die in den Kontroll-Modellen erst 6 Stunden nach der Verwundung beginnt (Abb. 4.19 **C**). Zu diesem Zeitpunkt ist in den *Antisense*-Modellen bereits eine sehr starke Cx26-Expression zu verzeichnen, wohingegen Cx43 im Bereich des Wundrandes schon stark herunterreguliert ist (Abb. 4.19 **D**). Zum Zeitpunkt 18 Stunden nach Verwundung ist Cx43 in beiden Fällen nicht mehr am Wundrand nachzuweisen (**E, F**). Cx26 wird in den *Sense*-behandelten Modellen am äußeren Wundrand und der regenerierenden Epidermis sehr stark exprimiert. In den *Antisense*-Modellen findet man es im gesamten Bereich des Wundrandes. Nach 24 Stunden wird Cx43 in beiden Modellen re-induziert (Abb. 4.19 **G, H**). In den mit Cx43as-ODNs behandelten Modellen wird Cx26 im gesamten Bereich des Wundrandes und der regenerierenden Epidermis exprimiert, während es sich in den Kontrollmodellen auf die regenerierende Epidermis beschränkt. In der an die Wunde grenzende nahen Epidermis ist in beiden Fällen eine normale Cx43-Lokalisation in allen lebenden Schichten zu erkennen (Abb. 4.19 **I, J**). Cx26 ist in der Kontrolle auf das oberste *Stratum granulosum* begrenzt, wohingegen es in Gap27 behandelten Modellen im *Stratum granulosum*, im oberen *Stratum spinosum* sowie im *Stratum basale* gebildet wird. Die regenerierende Epidermis in der Mitte der Wunde ist zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Verwundung in der Kontrolle negativ für Cx43 und stark positiv für Cx26 (Abb. 4.19 **K**). In den mit Cx43as-ODNs behandelten Modellen ist bereits vermehrt eine Cx43-Expression in der neuen Epidermis zu beobachten (Abb. 4.19 **L**).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Cx43-spezifische *Antisense*-ODNs im porcinen *ex vivo* WHM sich im Gegensatz zu Gap27 auf die Cx43-Lokalisation auswirken. Dagegen beeinflussen sowohl Cx43as-ODNs als auch Gap27 die Cx26-Lokalisation.

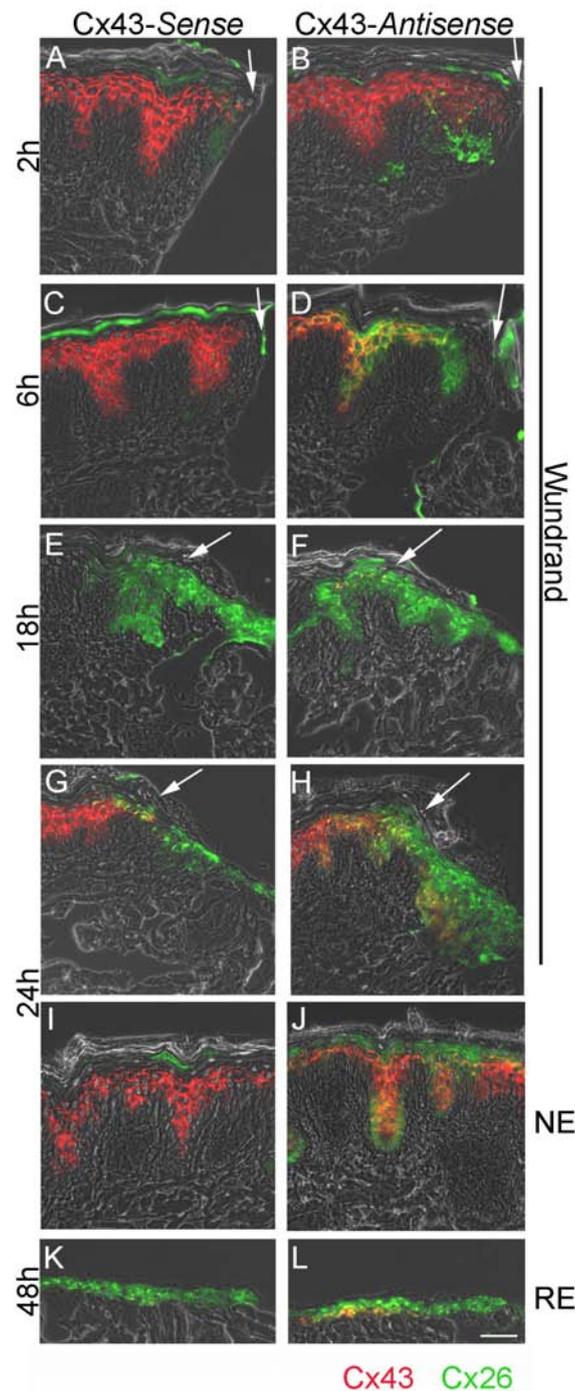


Abbildung 4.19: Effekt von Cx43as-ODNs auf die Expression von Connexinen im porcinen *ex vivo* WHM. Immunhistologischer Nachweis von Cx43 (rot) und Cx26 (grün) und deren Co-Lokalisation (gelb) in porcinen WHM (Überlagerung mit Phasenkontrast), die mit 20 μ M Cx43-Sense-ODNs (A, C, E, G, I, K) bzw. 20 μ M Cx43-Antisense-ODNs (B, D, F, H, J, L) inkubiert wurden (Längenmaßstab = 50 μ m). Gezeigt sind die Bereiche des Wundrandes (weiße Pfeile kennzeichnen den ursprünglichen Wundrand) zu den Zeitpunkten 2 Stunden (A, B), 6 Stunden (C, D), 18 Stunden (E, F) und 24 Stunden (G, H) nach Verwundung sowie die dem Wundrand nahe Epidermis (NE) zum Zeitpunkt 24 Stunden (I, J) und die regenerierende Epidermis (RE) zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Verwundung (K, L).

4.5.4 Einfluss von Cx43as-ODNs auf die Migration primärer Keratinozyten und Fibroblasten

Bei der *in vitro* Migration von Keratinozyten nach *Scratch*-Verwundung kommt es, ähnlich wie am Wundrand in der Haut, zu einer Herunterregulation von Cx43 in den Zellen am *Scratch*-Wundrand (Richards et al. [2004]). Dementsprechend wird vermutet, dass die Migration mit Hilfe von *Antisense*-Oligonukleotiden, die zusätzlich die Cx43-Expression auf mRNA-Ebene herunterregulieren, beschleunigt werden kann. Dies konnte bereits für die Migration von murinen 3T3-Fibroblasten gezeigt werden (Mori et al. [2006]). Um den Einfluss von Cx43as-ODNs auf die Migration humaner infantiler Keratinozyten und Fibroblasten zu untersuchen, wurde die Migration nach *Scratch*-Verwundung in proliferationsinhibierten Kulturen in Anwesenheit von 20 μ M Cx43-*Antisense*-ODNs bzw. der *Sense*-Kontrolle über einen Zeitraum von 48 Stunden verfolgt.

Die Migration von humanen infantilen Keratinozyten und Fibroblasten konnte durch Cx43-spezifische *Antisense*-Oligonukleotide signifikant beschleunigt werden (Abb. 4.20). Dieser Effekt ist vergleichbar mit den für Gap27 gezeigten Auswirkungen (Abschnitt 4.2.4).

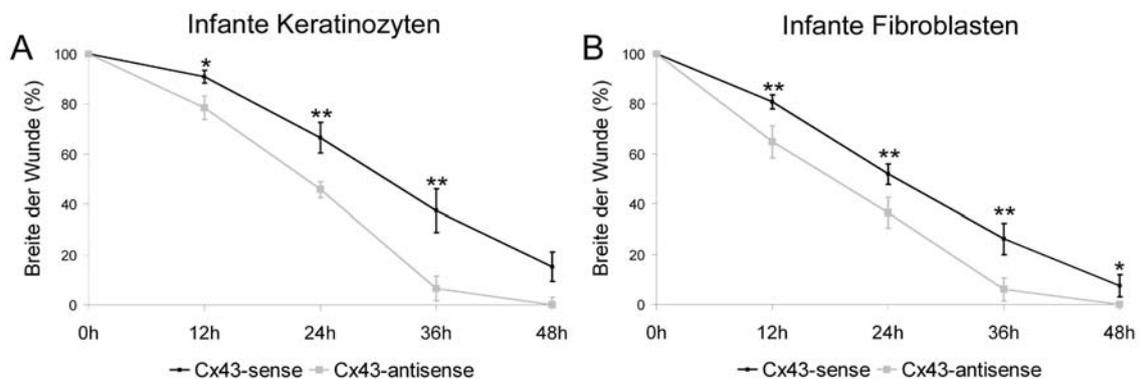


Abbildung 4.20: Effekt von Cx43-spezifischen *Antisense*-Oligonukleotiden auf die Migration infantiler Zellkulturen. Breite der *Scratch*-Wunde in proliferationsinhibierten humanen infantilen Keratinozyten- (A) und Fibroblastenkulturen (B), die mit 20 μ M Cx43as-ODNs oder der *Sense*-Kontrolle behandelt wurden, zu den Zeitpunkten 0, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach Verwundung ($n = 6$; *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$; Mittelwerte \pm SEM).

4.5.5 Einfluss von Cx43as-ODNs auf die Migration infanter Zellen unter hyperglycämischen Bedingungen

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Zellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs war es hier nicht möglich, die Wirkung von Cx43-spezifischen *Antisense*-ODNs auf adulte Zellen zu untersuchen. Stattdessen wurden, analog zu den Gap27-Experimenten, Migrationsassays unter hyperglycämischen Bedingungen mit infanten Zellen durchgeführt.

In Zellen, die in Anwesenheit von 25 mM Glucose kultiviert worden sind, führt die Applikation von 20 μ M Cx43as-ODNs zu keinem migrationsfördernden Effekt (Abb. 4.21). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den für Gap27 gemachten Beobachtungen (Abschnitt 4.4.2).

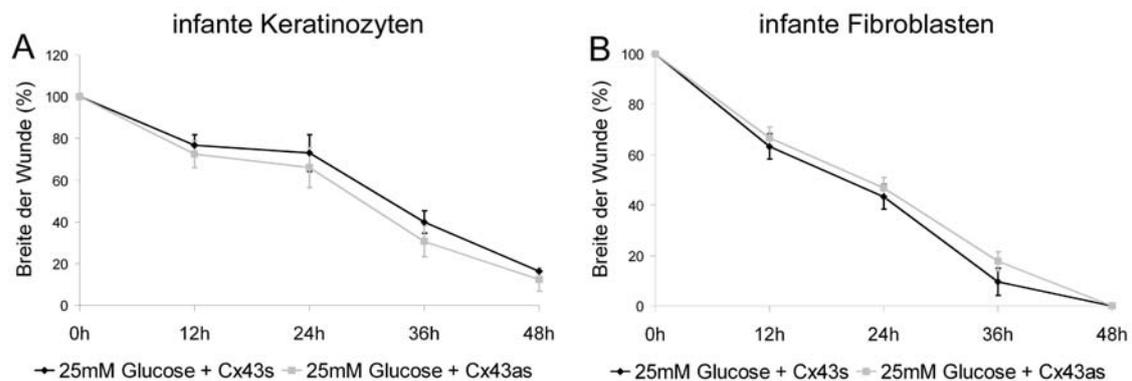


Abbildung 4.21: Effekt von Cx43as-ODNs unter hyperglycämischen Bedingungen. Migration nach *Scratch*-Verwundung in proliferationsinhibierten humanen infanten Keratinozyten- (A) und Fibroblastenkulturen (B), die in Anwesenheit von 25 mM Glucose mit 20 μ M Cx43as-ODNs behandelt wurden ($n = 6$; *: $p \leq 0.05$; Mittelwerte \pm SEM).

Kapitel 5

Diskussion

Cx43 wird im Verlauf der Wundheilung am epidermalen Wundrand herunterreguliert (Goliger and Paul [1995]), und auch am Rand von *in vitro Scratch*-Wunden kutaner Zellen kann eine verminderte Cx43-Expression gefunden werden (Richards et al. [2004]; Wright et al. [2009]). Dass Cx43 eine bedeutende Rolle in der Wundheilung spielt, haben zahlreiche Veröffentlichungen der letzten Jahre gezeigt. Der künstliche *Knockdown* der Cx43-Expression mittels *Antisense*-Technologie wirkt sich im murinen System positiv auf die Wundheilung und damit assoziierte zelluläre Prozesse wie Proliferation und Migration aus (Qiu et al. [2003]; Mori et al. [2006]). Darüber hinaus konnten Kretz et al. zeigen, dass Cx43-defiziente Mäuse eine beschleunigte Wundheilung im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (Kretz et al. [2003]). Um das Potential von Cx43 als möglichen therapeutischen Angriffspunkt für die Behandlung menschlicher akuter und chronischer/diabetischer Wunden zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung des *Cx43-Targeting* mittels Cx-mimetischen Peptiden in porcinen und humanen *ex vivo* Wundheilungsmodellen, an humanen infanten sowie adulten Keratinozyten und Fibroblasten diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs untersucht.

5.1 Gap27 fördert die humane und porcine Wundheilung

Eine Möglichkeit zur Manipulation der Funktion von Cx43 auf Proteinebene stellen Cx-mimetische Peptide dar, die zur spezifischen Inhibition der zellulären Kommunikation über Gap Junctions entwickelt wurden (zur Übersicht siehe Evans and Boitano [2001]). Sie haben gegenüber der An-

tisense-Technologie den Vorteil, dass sie die Expression von Connexinen nicht beeinträchtigen und dementsprechend weniger in die Zellphysiologie eingreifen. Das Cx-mimetische Peptid Gap27 weist zwar grundsätzlich eine Sequenzhomologie zu mehreren Connexinen auf (Cx32, Cx37, Cx43), hat jedoch den mit Abstand größten Einfluss auf Cx43-Kanäle von Zellen, u.a. von Keratinozyten und Fibroblasten (Chaytor et al. [2001]; Griffith et al. [2004]; Wright et al. [2009]). Aus diesem Grund bietet Gap27 eine gute Möglichkeit, die Funktionalität von Cx43-vermittelter Kommunikation relativ spezifisch zu beeinflussen. Der exakte Wirkmechanismus von Cx-mimetischen Peptiden ist jedoch noch weitgehend unbekannt und sehr umstritten. Möglicherweise hemmen sie die Assemblierung von Halbkanälen zu funktionellen GJ-Kanälen oder inhibieren die Durchlässigkeit bereits bestehender Gap Junctions (zur Übersicht siehe Evans and Leybaert [2007]; Dahl [2007]).

In der vorliegenden Arbeit konnte an humanen und porcinen *ex vivo* Modellen gezeigt werden, dass die Applikation des Cx-mimetischen Peptids Gap27 zu einer deutlich beschleunigten Wundheilung führt. Diese Ergebnisse bestätigen zuvor am porcinen Modell beschriebene Daten aus der Dissertation von A.-C. Pfeiffer [2008]. Das porcine wurde hier zusätzlich zum humanen Modell verwendet. Aufgrund seiner besseren Verfügbarkeit konnten größere experimentelle Ansätze durchgeführt und somit die Signifikanz der Beschleunigung der Wundheilung durch Gap27 nachgewiesen werden. Da der Aufbau der Haut, der Ablauf der Wundheilung und die Verteilung der Connexine sich in Mensch und Schwein sehr ähneln (Sullivan et al. [2001]; Meyer [1996]; Brandner et al. [2006]), stellt das porcine Modell ein System dar, das einem murinen Modell überlegen ist. Die Wundheilung von Nagern ist durch eine starke Beteiligung der Wundkontraktion gekennzeichnet, die in menschlicher Haut nur mäßig ausgeprägt ist. Darüber hinaus sind sowohl Cx43 als auch Cx26 in der Epidermis von Nagern anders lokalisiert als in Mensch und Schwein (Salomon et al. [1994]). Die Ergebnisse aus unserem dreidimensionalen Modell, das sowohl die Epidermis als auch die Dermis mit ihren verschiedenen Zelltypen umfasst, bestärken zudem vorherige Beobachtungen aus *in vitro* Systemen. Dabei konnte an murinen bzw. humanen Keratinozyten und Fibroblasten sowie an murinen organotypischen Epidermis-Modellen mittels Gap27 ein beschleunigter Wundverschluss nach *Scratch*-Verwundung gezeigt werden (Kandyba et al. [2007]; Wright et al. [2009]). Dies macht deutlich, dass die Herunterregulation von Cx43, unabhängig von den Unterschieden im Cx-Expressionsmuster zwischen Spezies und unabhängig vom gewählten Modellsystem, universal wichtig für den Ablauf der Wundheilung ist (Salomon

et al. [1994], zur Übersicht siehe Richard [2000]). Die vorliegende Arbeit zeigt demnach, dass Cx43 als Angriffspunkt in der Wundheilungstherapie auch im humanen System in Frage kommt und dass Gap27 ein möglicher Wirkstoff für eine solche Therapie sein könnte.

Im Folgenden wurde gezielt untersucht, welche molekularen und zellulären Prozesse durch Gap27 beeinflusst werden, indem seine Auswirkungen auf die Lokalisation, Proteinlevel und Phosphorylierung von Cx43, auf die Cx-vermittelte Kommunikation sowie die Proliferation und Migration kutaner Zellen ermittelt wurden. Während Gap27 keinen Einfluss auf die Cx43-Lokalisation in den *ex vivo* Wundheilungsmodellen (WHM) hat, führt es interessanterweise zu einer veränderten Lokalisation und Regulation von Cx26. Dieses Connexin wird in normaler, unverwundeter Haut nur in *Palmae*, *Plantae* und in Haarfollikeln und Drüsen exprimiert, wird jedoch im Verlauf der Wundheilung in interfollikulärer Haut induziert und ist charakteristisch für (hyper-)proliferative Zellen (Rivas et al. [1997]; Labarthe et al. [1998]; Lucke et al. [1999]). In Mäusen, die Cx26 überexprimieren, wurde eine starke Hyperproliferation in der Epidermis nachgewiesen (Djalilian et al. [2006]). Somit scheint eine vermehrte Cx26-Expression ein Indiz für eine erhöhte Proliferation zu sein. Die Tatsache, dass Cx26 in den Gap27-Modellen verstärkt vorhanden ist, deutet demnach darauf hin, dass die Applikation von Gap27 die Proliferation fördert. Tatsächlich weisen die mit Gap27 behandelten WHM 48 Stunden nach Verwundung in der regenerierenden Epidermis einen signifikant höheren Anteil Ki67-positiver Zellen auf. Auch *in vitro* führt die Gap27-Behandlung in primären infanten und adulten Keratinozyten und Fibroblasten zu einer verstärkten Proliferation am Rand von *Scratch*-Wunden. In beiden Systemen weisen also die Zellen, die die Wunde verschließen, eine gesteigerte Zellteilungsrate auf. Mori et al. konnten zeigen, dass ebenso die Applikation von Cx43-spezifischen *Antisense*-ODNs (Cx43as-ODNs) in murine Wunden zu einer gesteigerten Proliferation in der regenerierenden Epidermis führen. Außerdem deutete der von ihnen beobachtete erhöhte Gehalt an Granulationsgewebe in den mit Cx43as-ODNs behandelten Wunden auf eine gesteigerte Fibroblastenproliferation hin (Mori et al. [2006]). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ein Cx43- *Targeting* in der Haut bzw. in kutanen Zellkulturen grundsätzlich mit einer verstärkten Zellproliferation einhergeht. Interessanterweise zeichnen sich auch hochproliferative Tumoren der Haut, beispielsweise das maligne Melanom oder das Merkelzellkarzinom, durch die Abwesenheit von Cx43 aus (zur Übersicht siehe Haass et al. [2006]). Über den Einfluss von Connexinen auf die Zellproliferation in anderen Geweben und Zellarten wurden bis-

her sehr heterogene Beobachtungen publiziert. Cx43-defiziente proepikardiale Zellen (embryonale Vorläufer) zeichnen sich durch eine verstärkte Proliferation aus, dagegen findet man sowohl in Cx43-defizienten Zellen der Neuralleiste als auch in Cx43as-ODN behandeltem Netzhautgewebe eine reduzierte Proliferation (Huang et al. [1998]; Becker and Mobbs [1999]; Li et al. [2002]).

Ein weiterer wichtiger Parameter in der Wundheilung ist die Zellmigration, die sowohl für epidermale als auch für dermale Zellen eine Rolle spielt. Da es im *ex vivo* WHM jedoch nicht möglich ist, die Migration zu untersuchen, wurden hier *in vitro* Versuche an proliferationsinhibierten Kulturen durchgeführt, anhand derer die Zellmigration nach *Scratch*-Verwundung analysiert werden konnte. Sowohl für infantile als auch für adulte Keratinozyten und Fibroblasten kann in Anwesenheit von Gap27 eine signifikant beschleunigte Migration im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Diese Daten bestätigen, dass die Cx-vermittelte Kommunikation einen wichtigen Faktor in der Mobilität infanter humaner Hautzellen darstellt (Wright et al. [2009]). Auch in murinen Zellen konnte dies beobachtet werden (Kandyba et al. [2007]; Mori et al. [2006]). Die hier gezeigten Daten machen auch deutlich, dass dieser positive Effekt nicht auf murine bzw. infantile humane Zellen beschränkt ist, sondern auch in adulten humanen Zellen zu finden ist. Aufgrund der Tatsache, dass die Zielgruppe für eine mögliche therapeutische Anwendung von Cx-mimetischen Peptiden eher ältere Menschen umfasst, ist es von großer Wichtigkeit, die Wirksamkeit von Gap27 auch an adulten Zellen bestätigen zu können. Interessanterweise wurde, je nach Zelltyp, entweder bei Anwesenheit oder bei Abwesenheit von Cx43 eine Steigerung der Migration beobachtet (Li et al. [2002]; Huang et al. [1998]). Die Unterschiede im Einfluss von Cx43-vermittelter Kommunikation auf die Migration von Zellen reflektieren möglicherweise Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen und ob sie als Einzelzellen oder innerhalb einer Kommunikationsgruppe migrieren (Mori et al. [2006]).

Zusammengefasst zeigen die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse in Verbindung mit bereits veröffentlichten Daten, dass das *Targeting* von Cx43 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in eine gesteigerte Proliferation und Migration resultiert und dass Gap27 sowohl auf infantile als auch auf adulte Zellen wirkt.

Um zu untersuchen, wie das Cx-mimetische Peptid Gap27 sich molekular auf Cx43 in humanen Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen auswirkt, wurde das Proteinlevel sowie der Phosphorylierungsstatus von Cx43 in Anwesenheit von Gap27 analysiert. Weder in Keratinozyten noch in

Fibroblasten hat die Anwesenheit von Gap27 einen Einfluss auf das Proteinlevel von Cx43. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit denen anderer Gruppen vereinbaren. Martin et al. [2005] und Kandyba et al. [2007] konnten in vaskulären Zellen von Ratten bzw. in murinen Keratinozyten ebenfalls keine Auswirkungen von Gap27 auf die Proteinlevel von Cx43 beobachten. Zudem wurde weder die Anzahl noch die Größe von Gap Junction Plaques verändert (Martin et al. [2005]). Somit machen die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse deutlich, dass eine Hemmung der Cx43-Funktion, nicht aber notwendigerweise der komplette Verlust des Cx43-Proteins wichtig für die Wundheilung ist, und dass diese Tatsache unabhängig von der Spezies gilt.

Die durch die Proteinkinase C vermittelte Phosphorylierung von Cx43 am Serinrest 368 (PS368-Cx43) beeinflusst die Funktion von Cx43-GJs und reguliert somit die GJIC (*Gap Junctional Intercellular Communication*; Lampe et al. [2000], zur Übersicht siehe Solan and Lampe [2009]). Dynamische Veränderungen im Ser³⁶⁸-Phosphorylierungsstatus sind mit der Rolle von Cx43 in der Wundheilung assoziiert, indem möglicherweise zeitlich und räumlich regulierte Kommunikationskompartimente generiert werden. Richards et al. konnten zeigen, dass in unverwundeter Haut eine gleichmäßige Verteilung von phosphoryliertem Ser³⁶⁸-Cx43 gefunden werden kann. In *in vivo* Wunden wurden jedoch 24 Stunden nach Verwundung hohe Level von PS368-Cx43 in den basalen Keratinozyten detektiert, wohingegen in der suprabasalen Epidermis PS368-Cx43, ebenso wie unphosphoryliertes Cx43, kaum mehr nachweisbar war. Auch in der *in vitro* Wundheilung spielt die Phosphorylierung von Cx43 am Ser³⁶⁸ eine Rolle. In humanen Vorhaut-Keratinozyten wurde 24 Stunden nach *Scratch*-Verwundung die Expression von PS368-Cx43 am Wundrand dramatisch verstärkt, was mit einer Inhibition der GJIC einherging (Richards et al. [2004]). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Behandlung von infanten und adulten humanen Keratinozyten und Fibroblasten mit Gap27 zu einer signifikant gesteigerten Phosphorylierung am Ser³⁶⁸ von Cx43 führt. Diese Beobachtung wird hier zum ersten Mal beschrieben und lässt auf bisher nicht diskutierte Wirkmechanismen von Cx-mimetischen Peptiden schließen, die möglicherweise eine zusätzliche Erklärung für den inhibierenden Effekt von Gap27 auf die GJIC von murinen und humanen Hautzellen liefern (Kandyba et al. [2007]; Wright et al. [2009]).

Die Cx-vermittelte Kommunikation zwischen Zellen lässt sich durch die Ausbreitung von Farbstoffen darstellen. In verwundeter Haut von Ratten, an deren Wundrand es zu einer Cx43-Herunterregulation kam, konnte gezeigt werden, dass diese sich durch eine gehemmte Farbstoff-

ausbreitung im Vergleich zu unverwundeter Haut auszeichnet (Goliger and Paul [1995]). Zudem kommt es in der Haut von Cx43-defizienten Mäusen zu einer um 40 % verminderten Farbstoffausbreitung gegenüber den Wildtypkontrollen (Kretz et al. [2003]). Dies verdeutlicht, dass die Herunterregulation von Cx43 im Verlauf der Wundheilung zu einer Reduktion der Cx-vermittelten Kommunikation führt, und dass diese verminderte Kommunikation wichtig für das Fortschreiten der Wundheilung sein könnte. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch durch die Applikation von Gap27 in porcine *ex vivo* WHM die Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow (LY) in der Epidermis signifikant vermindert wird. LY gelangt in die durch die Verwundung verletzten Zellen am äußersten Wundrand und kann von dort aus weiter in die Epidermis vordringen. Hierbei sind prinzipiell zwei Wege möglich: Der interzelluläre Weg über GJs direkt von einer Zelle zur nächsten oder der extrazelluläre Weg, bei dem der Farbstoff sich über den Extrazellulärraum ausbreitet und dann über Cx-Halbkanäle in die Zellen aufgenommen wird. Die verminderte Farbstoffausbreitung spricht dafür, dass die GJs oder Cx-Halbkanäle durch Gap27 vermehrt in die geschlossene Konformation übergehen. *In vitro* wurde mittels Farbstoffausbreitung nach Mikroinjektion bereits gezeigt, dass Cx-mimetische Peptide in der Lage sind, die direkte Kommunikation (GJIC) zwischen zahlreichen verschiedenen Zelltypen, wie z.B. glatten Muskelzellen, vaskulären Endothelzellen und Immunzellen zu inhibieren (Griffith et al. [2004]; Chaytor et al. [2001]; Gomes et al. [2006]; Oviedo-Orta et al. [2000]). Wright *et al.* konnten beobachten, dass dies auch in humanen Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen der Fall ist (Wright et al. [2009]). In der vorliegenden Arbeit wurde nun gezeigt, dass Gap27 auch Auswirkungen auf Kommunikation über Cx43-Halbkanäle von *in vitro* Kulturen humaner Keratinozyten und Fibroblasten hat. Die Aufnahme des Farbstoffs Propidium Iodid (PI), die ein Maß für die Halbkanalpermeabilität ist, wird in infanten und adulten Keratinozyten und Fibroblasten durch Gap27 signifikant verringert. Aus diesem Grund kann die hier beschriebene gehemmte Farbstoffausbreitung in mit Gap27 behandelten WHM sowohl auf eine Hemmung der Kommunikation zwischen Zellen via GJs als auch auf eine Hemmung von Cx-Halbkanälen zurückzuführen sein. Braet et al. waren die ersten, die einen Einfluss von Cx-mimetischen Peptiden auf Cx-Halbkanäle in zerebralen Endothelzellen beschrieben (Braet et al. [2003a,b]). Diese Beobachtung ist nicht verwunderlich, da die Sequenzen des extrazellulären *Loops* von Connexinen, mit dem Cx-mimetische Peptide vermutlich interagieren, im Fall von Cx-Halbkanälen frei zugänglich im Extrazellulärraum vorliegen. Interessanterweise treten

die Effekte auf Cx-Halbkanäle innerhalb von Minuten auf, während Inkubationszeiten von einer Stunde oder länger erforderlich sind, um Auswirkungen auf Gap Junctions beobachten zu können. Auch in anderen Zellarten, wie z.B. kornealen Endothelzellen oder retinalem Pigmentepithel, konnte bereits ein Effekt von Gap27 auf Cx-Halbkanäle nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe Evans et al. [2006]).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Beobachtungen zusammen mit veröffentlichten Daten lassen vermuten, dass Gap27 die Cx-vermittelte Kommunikation sowohl über Gap Junctions als auch über Cx-Halbkanäle inhibiert und sich so positiv auf die *ex vivo* Wundheilung auswirkt. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass die Rolle und Funktion von Cx-Halbkanälen *in vivo* noch nicht geklärt ist (Evans et al. [2006]). *In vitro* stellen Cx-Halbkanäle einen Weg dar, parakrine Signalmoleküle wie ATP, Glutamat, NAD⁺ und Prostaglandin E₂ freizusetzen und ermöglichen den Zellen so, auf Einflüsse von außen zu reagieren (Bruzzone et al. [2001]; Braet et al. [2003a]; Leybaert et al. [2003]; Ye et al. [2003]; Parpura et al. [2004]; Cherian et al. [2005]).

5.2 Zellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs sind unterschiedlich sensitiv gegenüber Gap27

In der Vergangenheit konnten zahlreiche zelluläre und molekulare Vorgänge in der Wundheilung identifiziert werden, die durch die Stoffwechselerkrankung Diabetes Mellitus beeinflusst werden und mit einer gestörten Wundheilung korrelieren. Hier sind beispielsweise eine chronische Inflammation, gestörte Vaskularisierung, veränderte Wachstumsfaktorproduktion sowie ein gestörtes Verhältnis von Proteasen zu ihren Inhibitoren zu nennen (zur Übersicht siehe Lioupis [2005]; Brem and Tomic-Canic [2007]; Blakytyn and Judel [2009]; Peppas et al. [2009]). Zudem zeichnen sich Keratinozyten an chronischen diabetischen Wundrändern häufig durch gestörte Migration, Proliferation und Differenzierung aus (Usui et al. [2008]). Auch Fibroblasten, die aus Wundrändern diabetischer Ulcera isoliert wurden, zeigen eine geringere Proliferation sowie eine verminderte Sensitivität gegenüber Wachstumsfaktor-Stimuli im Vergleich zu Zellen aus akuten Wunden (Loots et al. [2002]). Inwieweit es aber bereits in unverwundeter Haut von Diabetikern zu molekularen und zellulären Schädigungen kommt, ist bisher noch nicht abschließend geklärt. In der vorliegenden Arbeit kann zum einen eine signifikant verminderte Migration in diabetischen Keratinozyten im

Vergleich zu nicht-diabetischen Keratinozyten gefunden werden. Zum anderen zeigen Keratinozyten und Fibroblasten, die aus unverwundeter Haut von Diabetikern und Nicht-Diabetikern isoliert worden sind, deutliche Unterschiede bezüglich der Sensitivität gegenüber Gap27. Die Behandlung mit dem Cx-mimetischen Peptid führt in diabetischen Zellen zu keiner gesteigerten Proliferation und Migration. Aufgrunddessen, dass adulte Zellen nicht-diabetischen Ursprungs eine ähnliche Reaktion auf Gap27 zeigen wie infantile Zellen, kann hier ein im Alter der Spender begründeter Unterschied ausgeschlossen werden. Stattdessen lässt sich ein „diabetischer Phänotyp“ vermuten. Interessanterweise nimmt die Sensitivität der diabetischen Zellen gegenüber Gap27 im Verlauf der Kultivierung zu, so dass ihr Verhalten in späten Passagen mit dem von nicht-diabetischen Zellen vergleichbar ist. Diese Beobachtungen geben Grund zur Annahme, dass diabetische Zellen *in vitro* über eine Art „Gedächtnis“ an ihre Herkunft verfügen, vor allem, wenn sie sich in einer wundheilungs-ähnlichen Situation wie der Migration nach einem *Scratch* befinden. Loots et al. beschrieben einen ähnlich veränderten Phänotyp in Fibroblasten, die aus chronischen diabetischen Ulcera isoliert worden waren. Hier konnte sogar noch in späten Passagen (P10) ein signifikanter Unterschied zu Zellen aus akuten Wunden bezüglich der Sensitivität gegenüber Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden (Loots et al. [2002]). Dies spricht dafür, dass sich die Vorschädigung der Zellen in unverwundeter diabetischer Haut im Fall eines Ulcus noch verstärkt und daher auch *in vitro* länger bestehen bleibt. In den Kulturüberständen migrierender Keratinozyten diabetischen Ursprungs können zudem im Vergleich zu den Kontrollen deutlich erhöhte Level von MMP-1, MMP-3, MMP-9 und MMP-10 gefunden werden. Dabei handelt es sich um Matrixmetalloproteasen, die auch in chronischen diabetischen Ulcera vermehrt exprimiert werden (Yager and Nwomeh [1999]; Lobmann et al. [2002]). Diese Überproduktion könnte ein Grund für die hier beobachtete verlangsamte Migration diabetischer Keratinozyten sein. Erst kürzlich konnten Reiss et al. zeigen, dass eine Überproduktion von MMP-9 in murinen Wunden die Migration der Keratinozyten über das Wundbett signifikant verlangsamt (Reiss et al. [2010]). Dafür spricht auch das hier beobachtete erhöhte Verhältnis von MMPs zu ihren Inhibitoren (TIMPs) in diabetischen Keratinozyten im Vergleich zu infantilen und adulten nicht-diabetischen Zellen. Dieses Missverhältnis findet man auch in chronischen Ulcera, wo es vermutlich einen positiven Rückkopplungseffekt auf inflammatorische Zellen verursacht, die dann wiederum die Proteaseproduktion stimulieren (Mast and Schultz [1996]). Interessanterweise konnte in statischen Kulturen diabetischer und nicht-

diabetischer Keratinozyten kein Unterschied in der MMP-Expression gefunden werden, dagegen zeigten die gleichen Zellen nach Transplantation in *ex vivo* WHM eine signifikant erhöhte MMP-1-Produktion sowie ein gesteigertes MMP2/TIMP2-Verhältnis (Brandner et al. [2008]). Diese Ergebnisse bestärken die Annahme, dass der „diabetische Phänotyp“ von Zellen diabetischen Ursprungs sich vor allem in einer wundheilungsähnlichen Situation offenbart. Brandner et al. konnten noch weitere Unterschiede im *in vitro*-Verhalten von Keratinozyten und Fibroblasten diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs beobachten. So verfügten Keratinozyten, die aus diabetischen Patienten isoliert worden waren, über eine signifikant verminderte IL-1 β -Produktion. Nach der Transplantation in porcine *ex vivo* WHM zeigten die Zellen diabetischen Ursprungs im Vergleich zu nicht-diabetischen Zellen deutliche Unterschiede in ihrer IL-1 β - und TNF- α -Expression (Brandner et al. [2008]). Fibroblasten diabetischer (db/db) Mäuse zeichnen sich durch eine signifikant erhöhte MMP9- bzw. verminderte VEGF-Expression, verlangsamte Migration sowie eine verminderte Sensitivität gegenüber einem Hypoxie-Stimulus aus (Lerman et al. [2003]).

Im Gegensatz zu den Unterschieden, die diabetische und nicht-diabetische Zellen in ihrer Gap27-Sensitivität zeigen, unterscheiden sich Kulturen von Zellen unterschiedlichen Ursprungs bezüglich ihrer Cx43-Expression und Lokalisation nicht. Diese Beobachtungen sind vergleichbar mit den auf mRNA-Ebene beschriebenen Ergebnissen (Brandner et al. [2008]). Hier konnte weder in den Hautbiopsien von Diabetikern und Nicht-Diabetikern, noch in den daraus isolierten und kultivierten Keratinozyten eine unterschiedliche Cx43-Expression gefunden werden. Auch Abdullah et al. beschrieben vergleichbare Cx43-Level in Fibroblasten diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs (Abdullah et al. [1999]). Ebenso wie in infanten und adulten nicht-diabetischen Keratinozyten und Fibroblasten kann in der vorliegenden Arbeit zudem die Induktion von Ser³⁶⁸-Phosphorylierung von Cx43 durch Gap27-Behandlung auch in diabetischen Zellen beobachtet werden, eine Modifikation von Cx43, die die Kommunikation über GJs und Cx-Halbkanäle hemmt. Daher bietet die Cx43-Phosphorylierung vermutlich keine Erklärung für die Unterschiede zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Zellen. Tatsächlich beschrieben Abdullah et al. sogar eine gesteigerte GJIC in humanen infanten Fibroblasten diabetischen Ursprungs, wodurch die Komplexität dieses Systems deutlich wird (Abdullah et al. [1999]). Aus diesem Grund müssen GJIC-unabhängige Funktionen von Cx43 in Betracht gezogen werden, die möglicherweise in nicht-diabetischen, nicht aber in diabetischen Zellen von Gap27 beeinflusst werden. In der vorliegenden Arbeit kann generell

eine verminderte Halbkanalpermeabilität in Keratinozyten diabetischer Herkunft im Vergleich zu nicht-diabetischen Zellen nachgewiesen werden. Cx-Halbkanäle sind *in vitro* unter physiologischen Bedingungen geschlossen und öffnen sich aufgrund von äußeren Stimuli wie der Verringerung der extrazellulären Calciumkonzentration, Membrandepolarisation, mechanischem Stress oder metabolischer Inhibition (Harris [2001]; Sáez et al. [2005]), so dass die Vermutung naheliegt, dass die Signalweiterleitung und damit die Reaktion der diabetischen Zellen auf äußere Einflüsse gestört sein könnte. Die Behandlung von diabetischen Keratinozyten und Fibroblasten mit Gap27 hat zwar einen signifikanten Effekt auf die Halbkanalaktivität, dieser fällt allerdings sehr viel geringer aus als in nicht-diabetischen Zellen. Die Frage, welchen Einfluss die unterschiedliche Cx-Halbkanalaktivität auf die Sensitivität der Zellen gegenüber der migrations- und proliferationssteigernden Wirkung von Gap27 hat, muss noch spezifischer untersucht werden.

Interessanterweise scheinen Keratinozyten einen ausgeprägteren „diabetischen Phänotyp“ zu entwickeln als Fibroblasten, da nur Keratinozyten eine signifikant gehemmte Migration und Halbkanalaktivität im Vergleich zu den nicht-diabetischen Kontrollen zeigen. Sowohl Keratinozyten als auch Fibroblasten diabetischen Ursprungs zeichnen sich jedoch durch eine signifikant verminderte Sensitivität gegenüber Gap27 aus. Frühere Veröffentlichungen zeigen, dass Zellen diabetischen Ursprungs geringer auf Wachstumsfaktorgabe bzw. Hypoxie reagieren als die Kontrollzellen (Loots et al. [2002]; Lerman et al. [2003]). Vor diesem Hintergrund wäre denkbar, dass der veränderte Phänotyp der diabetischen Zellen grundsätzlich eine gestörte Reaktion der Zellen auf Stimuli von außen bewirkt. Dies würde sowohl das geringe Ansprechen auf Gap27 als auch die verminderte Halbkanalaktivität erklären.

5.3 Einfluss von Hyperglycämie auf die Wundheilung und kutane Zellen

Die vorliegende Arbeit zeigt zum Teil drastische Unterschiede zwischen Zellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs auf. Es stellte sich nun die Frage nach der molekularen Ursache dieses Unterschieds. Diabetische Hyperglycämie, die charakteristisch für eine Diabetes-Erkrankung ist, trägt vermutlich direkt zu der gestörten Wundheilung und damit zur Ulcusentstehung in diabetischen Patienten bei. Sie vermittelt die Glycosylierung von ECM-Molekülen, inhibiert Zellmi-

gration und vermindert die Sensitivität von Zellen gegenüber Wachstumsfaktoren (zur Übersicht siehe Peppas et al. [2009]). Somit ist eine Vorschädigung der hier verwendeten diabetischen Zellen aufgrund von Hyperglycämie denkbar. Bei den diabetischen Spendern der Hautbiopsien ergab sich ein mittlerer HbA1c-Wert von $7,44 \pm 1,1$ % im Gegensatz zu $5,59 \pm 0,4$ % bei den nicht-diabetischen Spendern. Im Fall eines Diabetes Mellitus Typ II wird in der Regel ein Wert $\leq 7,0$ % (manchmal sogar $\leq 6,5$ %) als Therapieziel angestrebt. Somit handelt es sich bei den hier vertretenen Spendern um Patienten mit einer noch nicht optimal eingestellten Blutglucose. Welche starken Auswirkungen bereits Änderungen in der ersten Nachkommastelle des HbA1c-Wertes haben, wurde in der Vergangenheit häufig beschrieben (zur Übersicht siehe Standl et al. [2009]). So bewirkt die absolute Reduktion des HbA1c-Wertes um nur 1 % bereits eine 10 – 15 %ige Reduktion des Risikos, an Herz-Kreislauf-Versagen zu sterben. Ein niedriger HbA1c-Wert hat *in vivo* ebenfalls positiven Einfluss auf die Heilungsgeschwindigkeit diabetischer Ulcera (Marston and Group [2006]; Markuson et al. [2009]). Bisher existiert keine Studie, die den direkten Zusammenhang zwischen HbA1c-Wert und zellulären Schädigungen in der Haut beschreibt. Aufgrund von *in vitro* Ergebnissen, die direkte Auswirkungen von Hyperglycämie auf kultivierte Zellen zeigen, ist eine direkte Verbindung jedoch wahrscheinlich (Sibbitt et al. [1989]; Lan et al. [2009]).

Um zu überprüfen, inwieweit eine erhöhte Glucosekonzentration für die in diabetischen Zellen beobachteten Veränderungen ursächlich sein könnte, wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich *in vitro* Versuche mit infanten Zellen unter hyperglycämischen Bedingungen durchgeführt, die eine diabetische Umgebung simulieren sollten. Ausgehend von veröffentlichten *in vitro* Daten wurde eine Glucosekonzentration von 6 mM als physiologische Kontrolle verwendet, für hyperglycämische Bedingungen wurden Konzentrationen von 12 bzw. 25 mM eingesetzt (siehe z.B. Lan et al. [2009]). In der vorliegenden Arbeit kann in infanten Keratinozytenkulturen eine konzentrationsabhängige Migrationshemmung durch Glucose beobachtet werden. Dies lässt sich gut mit dem für diabetische Keratinozyten beobachteten Migrationsverhalten vereinbaren, die ebenfalls signifikant langsamer migrieren als nicht-diabetische. Auch Lan et al. beschrieben in zwei Studien, dass Keratinozyten auf Glucose mit einer verminderten Mobilität reagierten (Lan et al. [2008, 2009]). Da diese Zellen jedoch nicht proliferationsinhibiert waren, konnte bisher keine spezifische Aussage über die Auswirkungen von Hyperglycämie auf die Migration kutaner Zellen getroffen werden. In der Vergangenheit wurden bereits *in vitro* Effekte von Hyperglycämie auf Hautzellen

beschrieben, welche die hier beobachteten Unterschiede zwischen Keratinozyten unterschiedlichen Ursprungs erklären könnten. So bewirkt Glucose eine veränderte Morphologie, beschleunigte Differenzierung, gehemmte Proliferation sowie eine verminderte DNA- und Proteinsynthese in Keratinozyten. Außerdem wurden eine gestörte Glucoseaufnahme, eine Herunterregulation der Expression von Zytokeratin-16 und $\alpha_2\beta_1$ -Integrin beschrieben, Proteine, die wichtig für die Adhäsion und Migration sind (Spravchikov et al. [2001]; Terashi et al. [2005]; Lan et al. [2008, 2009]).

Auch in dermalen Fibroblasten ist der Effekt von Hyperglycämie auf zelluläre Funktionen untersucht worden. Bereits 1989 beschrieben Sibbitt et al. eine inhibierte Proliferation, kürzere Lebensdauer und eine verfrüht auftretende Seneszenz von Fibroblasten, die unter hohen Glukosekonzentrationen kultiviert worden waren (Sibbitt et al. [1989]). Sie reagierten zudem mit einer gesteigerten Produktion von CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) sowie einer veränderten mRNA-Expression von Kollagenuntereinheiten vom Typ I und III (Yevdokimova and Podpryatov [2007]; Andreea et al. [2008]). Es wurde für mehrere Zellarten, u.a. für dermale Fibroblasten und mesangiale Zellen der Niere beschrieben, dass sie unter Hyperglycämie mit einer gesteigerten Fibronectin-Expression reagierten (Benazzoug et al. [1998]; Yevdokimova and Podpryatov [2007]; Kreisberg et al. [1994]). Fibronectin spielt als Bestandteil der extrazellulären Matrix in der Wundheilung eine entscheidende Rolle, wobei eine starke Hochregulation zu einer verminderten Migration führt. In der vorliegenden Arbeit kann eine gehemmte Migration von Keratinozyten und Fibroblasten unter Hyperglycämie beobachtet werden. Darüber hinaus zeigen diese Zellen eine signifikant gesteigerte Fibronectin-Expression. Es ist bekannt, dass sich diabetische Wunden häufig durch eine Überproduktion und gestörte Degradation der ECM-Moleküle auszeichnen (zur Übersicht siehe King and Brownlee [1996]) und dass auch diabetische Mäuse über eine gesteigerte Fibronectin-Produktion verfügen (Phan-Thanh et al. [1987]). Somit stimmt die erhöhte Fibronectin-Expression zwischen hyperglycämischen und diabetischen Fibroblasten überein. Allerdings ist das Migrationsverhalten zwischen den beiden Zellarten unterschiedlich. Während Hyperglycämie die Migration signifikant verlangsamt wird, hat der diabetische Ursprung nur einen geringen, aber gegenläufigen Effekt.

Der Vergleich von diabetischen und nicht-diabetischen Zellen bezüglich ihrer Cx43-Level zeigt hier keine signifikanten Unterschiede. In anderen Zellarten wurden bereits Glucose-Effekte auf die

Cx-Expression bzw. die Cx-vermittelte Kommunikation beschrieben. In Endothelzellen führt Hyperglycämie zur Herunterregulation sowie einer vermehrten Degradation von Cx43 (Sato et al. [2002]; Fernandes et al. [2004]), wohingegen Zellen aus dem renalen Sammelduktus mit einer gesteigerten Cx43-Expression reagieren (Hills et al. [2009]). Hier kann gezeigt werden, dass Hyperglycämie in primären humanen Keratinozyten sowohl zu einer verminderten immunzytologischen Lokalisation als auch zu einer leichten, aber signifikanten Herunterregulation des Cx43-Proteins führt. Dies lässt vermuten, dass die Hyperglycämie sich in humanen Zellkulturen stärker auf Cx43 auswirkt als der „diabetische Phänotyp“ von Zellen diabetischen Ursprungs, was eventuell dafür spricht, dass nicht die Hyperglycämie allein diesen Phänotyp verursacht. Veröffentlichte Daten in diabetischen Ratten beschreiben, dass Cx43 dort in der Haut direkt durch eine Diabeteserkrankung beeinflusst wird. Wang et al. konnten in der Epidermis diabetischer Ratten eine signifikant geringere Anzahl von Cx43-Plaques detektieren (Wang et al. [2007]). In Fibroblastenkulturen kommt es unter Hyperglycämie zu keiner nennenswerten Änderung der Cx43-Level oder -Lokalisation. Dies lässt sich gut mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen für diabetische und nicht-diabetische Fibroblasten vereinbaren, die sich ebenfalls nicht in ihrer Cx43-Expression unterscheiden. Sowohl Keratinozyten als auch Fibroblasten zeichnen sich unter hyperglycämischen Bedingungen durch eine deutlich verminderte Sensitivität gegenüber Gap27 aus. Dies entspricht den Beobachtungen, die auch für Zellen diabetischen Ursprungs gemacht wurden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Hyperglycämie sich in humanen Keratinozyten und Fibroblasten auf die Mobilität, auf die Fibronectin-Expression sowie auf die Sensitivität der Zellen gegenüber Gap27 auswirkt. Nur in Keratinozyten wirkt es sich auch auf die Cx43-Expression aus. Hier ergeben sich deutliche Parallelen zu den für diabetische Zellen gefundenen Ergebnissen, es gibt jedoch auch Unterschiede. Diese Feststellung ist ein Indiz dafür, dass die hier untersuchten Zellen diabetischen Ursprungs zumindest zum Teil aufgrund einer in der Diabeteserkrankung begründeten Hyperglycämie vorgeschädigt sein könnten und sich deshalb *in vitro* anders verhalten als nicht-diabetische Zellen. Zukünftige Arbeiten müssen noch untersuchen, welchen Einfluss Hyperglycämie auf die Cx-Halbkanal-Aktivität hat, da sich Keratinozyten diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs in diesem Punkt deutlich unterscheiden. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Kultivierung von Zellen unter hyperglycämischen Bedingungen in gewissem Umfang und bei geeigneter Fragestellung als Modellsystem für diabetische Zellen verwendet werden kann.

5.4 Einfluss Cx43-spezifischer *Antisense*-Oligonukleotide auf die Wundheilung, Cx43-Proteinlevel und Migration

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Zellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs unterschiedlich sensitiv auf das Cx-mimetische Peptid Gap27 reagieren. Dasselbe gilt für Zellen, die unter hyperglycämischen Bedingungen kultiviert wurden. Um herauszufinden, ob diese Beobachtung Gap27-spezifisch ist, oder auch für das *Targeting* von Cx43 auf mRNA-Ebene gilt, wurden Cx43-spezifische *Antisense*-Oligonukleotide verwendet. Interessanterweise führt von den sechs verschiedenen *Antisense*-ODNs nur die mausspezifische Sequenz DB1 im humanen System zu einem signifikanten *Knockdown* von Cx43 und ist auch im porcinen System wirksam. Es konnte jedoch nur mit in DEPC-Wasser und nicht mit in *Pluronic F-127* Gel gelösten ODNs ein wundheilungsfördernder Effekt erzielt werden. Diese Beobachtung war überraschend, da mehrere Studien, die allerdings alle von der gleichen Arbeitsgruppe veröffentlicht wurden, gezeigt haben, dass die Applikation von Cx43-spezifischen *Antisense*-ODNs in *Pluronic* Gel in Wunden sehr hohe Effizienz erreicht (Becker et al. [1999a]; Law et al. [2006]; Mori et al. [2006]; Wang et al. [2007]). Zukünftige Versuche müssen klären, ob eine Darreichungsform ähnlich dem *Pluronic F-127* für eine spätere Applikation in humane Wunden von Vorteil wäre.

Die Behandlung von infanten Keratinozyten und Fibroblasten mit Cx43as-ODNs führt hier zu einer signifikant gesteigerten Migration, vergleichbar mit der für die Gap27-Behandlung und den für nicht proliferationsinhibierte 3T3-Fibroblasten veröffentlichten Ergebnissen (Mori et al. [2006]). Auch im *ex vivo* Wundheilungsmodell führt die Applikation von Cx43as-ODNs zu einer gesteigerten Wundheilung. Dies geht einher mit einer veränderten Cx-Expression am epidermalen Wundrand. Die Cx43-Herunterregulation setzt hier sehr viel früher ein als in den Kontrollmodellen. Dies zeigt, dass, im Gegensatz zu den mit Gap27 behandelten Modellen, bei denen keine Veränderung der Cx43-Lokalisation gefunden werden kann, hier tatsächlich das Protein verloren geht. Zudem wird die Cx43-Expression in der regenerierenden Epidermis früher re-induziert (zum Zeitpunkt 48 Stunden). A.-C. Pfeiffer konnte in ihrer Doktorarbeit zeigen, dass dies signifikant mit einer gesteigerten Wundheilung korreliert (Pfeiffer [2008]). Der direkte Effekt von Cx43as-ODNs auf die Cx43-Expression wurde auch in kornealem Epithel von Ratten und in der Haut von Ratten und Mäusen gezeigt (Qiu et al. [2003]; Law et al. [2006]; Mori et al. [2006]; Wang et al. [2007]).

Zusätzlich kann in der vorliegenden Arbeit eine Veränderung der Cx26-Regulation am Wundrand porciner WHM festgestellt werden, wobei Cx26 in den mit Cx43as-ODN behandelten Modellen früher induziert wird als in den *Sense*-Kontrollen. Analog zu den für Gap27 gezeigten Ergebnissen lässt dies auf eine Steigerung der Proliferation in Zusammenhang mit der Wundheilungsbeschleunigung schließen (siehe Abschnitt 5.1).

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von diabetischen Zellen war es nicht möglich, die Wirkung der Cx43-spezifischen *Antisense*-Oligonukleotide auf diese Zellen zu untersuchen. Da die Sensitivität gegenüber Gap27 aber sowohl in diabetischen als auch in hyperglycämischen Kulturen vermindert wird, wurde die Kultivierung unter hyperglycämischen Bedingungen hier als Modellsystem verwendet. Interessanterweise zeigen auch Cx43as-ODNs keinerlei Einfluss auf die Migration in hyperglycämischen Keratinozyten und Fibroblasten, während sie unter physiologischen Glucosebedingungen zu einer signifikanten Migrationssteigerung in diesen Zellen führen. Somit können hier für Gap27 und Cx43as-ODNs vergleichbare Ergebnisse bezüglich ihres Einflusses auf hyperglycämische (diabetische) Zellen gefunden werden. Dies war überraschend, da Wang et al. in diabetischen Ratten einen positiven Effekt von Cx43as-ODNs auf die Wundheilung nachweisen konnten (Wang et al. [2007]). Die Diskrepanz zu den hier gezeigten Daten könnte in Unterschieden zwischen den untersuchten Spezies begründet sein, da sich speziell die Cx-Expressionsmuster in der Haut von Menschen und Nagern stark voneinander unterscheiden (Salomon et al. [1994]). Zudem konnten Wang et al. auch eine erniedrigte Zahl von Cx43-Plaques in der Haut dieser Ratten beobachten, während in Hautbiopsien menschlicher Diabetiker kein Unterschied in der Cx43-Expression gefunden werden konnte (Brandner et al. [2008]). Darüber hinaus wurden die Ratten in der zitierten Studie einmalig mit einer Streptozotocin-Injektion behandelt, was zu einer Degradation von Insulin-produzierenden β -Zellen im Pankreas führt. Bei dieser Technik handelt es sich um eine häufig verwendete Methode zur Induktion von Diabetes in Versuchstieren. Trotzdem bleibt zu bedenken, dass es sich hier um Tiere mit absolutem Insulinmangel handelt, was einem Diabetes vom Typ I entspricht. Ein geeigneteres Modell für einen Typ II Diabetes ist beispielsweise die genetisch veränderte db/db-Maus, die einen spontanen Diabetes entwickelt und sich durch Insulinresistenz, eine reduzierte Anzahl von β -Zellen und eine charakteristische Fettleibigkeit auszeichnet (Kim et al. [1998], zur Übersicht siehe Islam and Loots [2009]). Natürlich ist aber nicht komplett auszuschließen, dass die Behandlung von humanen diabetischen Zellen mit Cx43as-

ODNs andere Ergebnisse liefert. Während Gap27 lediglich die Kommunikation durch Cx-GJs und -Halbkanäle blockiert, führt eine Cx43as-ODN-Behandlung zu einer kompletten Herunterregulation von Cx43 und könnte somit auch eventuelle kommunikationsunabhängige Funktionen von Cx43 beeinflussen. Auch lässt sich nicht ausschließen, dass eine *in vivo* Applikation von Gap27 oder Cx43as-ODNs in diabetische Wunden erfolgreich sein könnte, z.B. aufgrund einer möglichen Wirkung auf das im *ex vivo* Modell nicht vorhandene Immunsystem. Zukünftige Experimente müssen den Vergleich der Wirksamkeit von Cx-mimetischen Peptiden *versus* der *Antisense*-Technologie in diabetischer Wundheilung vertiefen.

5.5 Ausblick: Cx43 als therapeutisches *Target* zur Beschleunigung der Wundheilung

Es stellt sich nun abschließend die Frage nach der möglichen klinischen Anwendbarkeit des Cx43-*Targetings* durch Gap27 oder Cx43as-ODNs. Die Beschleunigung der Wundheilung auf der Grundlage von Cx43-*Targeting* ist für verschiedene Bereiche akuter Wunden interessant. Beispielsweise in der kosmetischen Chirurgie wäre der Einsatz von Cx43-gerichteten Therapeutika denkbar, da im murinen System gezeigt werden konnte, dass Cx43-spezifische *Antisense*-Oligonukleotide neben einer schnelleren Wundheilung außerdem eine reduzierte Narbenbildung zur Folge haben (Coutinho et al. [2005]; Mori et al. [2006]). Ein weiteres mögliches Anwendungsgebiet sind akute Brandwunden. Speziell im Fall von großflächigen Wunden ist eine beschleunigte Heilung wünschenswert, da sie das Risiko weiterer Komplikationen, wie z.B. Infektionen, vermindern kann. Zudem ist die Herunterregulation von Cx43 mittels *Antisense*-ODNs mit einer reduzierten Inflammation assoziiert (Mori et al. [2006]).

Chronische Ulzerationen können aufgrund extrinsischer (Trauma, Ischämie, Infektion) oder intrinsischer Faktoren (Wachstumsfaktoren, ECM-Moleküle, zelluläre Abnormalitäten) entstehen. Wegen der Individualität und Heterogenität der möglichen Störungen wird derzeit eine Vielzahl von neuen Therapieoptionen für die Behandlung chronischer Wunden erforscht. Zu diesen zählen beispielsweise die Gabe von Wachstumsfaktoren, die Transplantation von Hautersatz, Angiogenesestimuli und Stammzell- sowie Gentherapie (zur Übersicht siehe Petrova and Edmonds [2006]). Die Tatsache, dass chronische Wundränder im Gegensatz zu akuten Wunden eine Cx43-

Expression aufweisen (Brandner et al. [2004]), macht auch Cx43 zu einem vielversprechenden neuen Angriffspunkt für die Behandlung chronischer Wunden. Dies wird durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse unterstützt, die einen wundheilungsfördernden Effekt von Gap27 im humanen und porcinen *ex vivo* WHM sowie auf infante und vor allem adulte Keratinozyten und Fibroblasten zeigen. Die Wirksamkeit im adulten System ist wichtig, da es sich bei Ulkus-Patienten in der Regel um ältere Menschen handelt. Zukünftige Arbeiten müssen klären, in welcher Form das Cx-mimetische Peptid Gap27 in offene Wunden appliziert werden könnte. Im Fall von Cx43-spezifischen *Antisense*-Oligonukleotiden wurde das *Pluronic F-127* Gel als effiziente Darreichungsform bei Nagern beschrieben (Qiu et al. [2003]; Mori et al. [2006]; Wang et al. [2007]). Obwohl diese Erkenntnis hier im porcinen System nicht bestätigt werden konnte, bietet eine Applikationsform, die den jeweiligen Wirkstoff sukzessive aus einem Depot freisetzt, grundsätzlich viele Vorteile. Daher ist für Gap27 prinzipiell ein ähnlicher Ansatz denkbar, wobei die Effizienz von *Pluronic F-127* in der porcinen/humanen Wundheilung zunächst validiert werden muss. Zudem muss auch der Faktor der zeitlich begrenzten Peptidstabilität berücksichtigt werden, die *in vitro* auf etwa 8 – 12 Stunden begrenzt ist (Wright et al. [2009]).

Die Tatsache allerdings, dass Zellen diabetischen Ursprungs eine geringere Sensitivität gegenüber Gap27 aufweisen und Zellen unter hyperglycämischen Bedingungen sowohl auf Gap27 als auch Cx43as-ODNs eingeschränkt reagieren, offenbart mögliche Limitationen des Cx43-*Targetings* und wirft Fragen bezüglich der Rolle von Cx43 in normaler *versus* diabetischer Wundheilung auf. Die Klärung dieser Fragen muss in zukünftigen Arbeiten im Vordergrund stehen, bevor Cx-mimetische Peptide oder Cx43as-ODNs als mögliche Wirkstoffe zur Wundheilungsförderung für diabetische Wunden in Betracht kommen.

Zusammenfassung

Die Herunterregulation des Gap Junction Proteins Connexin 43 am epidermalen Wundrand ist wichtig für den korrekten Ablauf der Wundheilung, da sie die Migration und Proliferation von Fibroblasten und Keratinozyten positiv beeinflusst. Die Tatsache, dass Cx43 am Rand chronischer nicht-heilender (z.B. diabetischer) Wunden bestehen bleibt, verdeutlicht die Rolle der Cx-vermittelten Kommunikation für die Wundheilung und macht Cx43 zu einem vielversprechenden Angriffspunkt in der Wundtherapieforschung. Sein künstlicher *Knockdown* mittels *Antisense*-Technologie auf mRNA-Ebene führt in Nagern zu einer beschleunigten Wundheilung sowie gesteigerter Zellmigration und -proliferation. Eine weitere Möglichkeit, die Cx-Funktion zu hemmen, bietet das Cx-mimetische Peptid Gap27. Dieses synthetische Peptid hemmt über einen bislang nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus die Kommunikation über GJs bzw. Cx-Halbkanäle und fand in den letzten Jahren in der Erforschung der zellulären Kommunikation in zahlreichen Gewebe- und Zelltypen Anwendung. Gap27 hat gegenüber Cx43-spezifischen *Antisense*-Oligonukleotiden (Cx43as-ODNs) den Vorteil, dass es die Expression und mögliche Kommunikations-unabhängige Funktionen von Cx43 nicht beeinflusst und somit weniger in die Zellphysiologie eingreift.

In der vorliegenden Arbeit wurde an humanen und porcinen *ex vivo* und *in vitro* Wunden untersucht, wie sich Gap27 auf einzelne Prozesse der kutanen Wundheilung auswirkt. Durch die Applikation von Gap27 in humane und porcine *ex vivo* Wundheilungsmodelle (WHM) konnte deren Wundheilung signifikant gesteigert werden, wobei es zu keiner veränderten Cx43-Lokalisation im Gewebe kam. Im Gegensatz dazu konnte eine veränderte Regulation von Cx26 gefunden werden, ein Connexin, das charakteristisch für (hyper-)proliferative Zellen ist. Tatsächlich zeigte sich auch eine signifikant erhöhte Proliferationsrate in der regenerierenden Epidermis der Gap27-behandelten Modelle. Gap27 wirkte sich zudem auf die Zellkommunikation der epidermalen Zellen aus, was zu einer signifikant verminderten Farbstoffausbreitung über Cx-Kanäle führt. Um die Auswirkungen von Gap27 auf einzelne zelluläre Prozesse untersuchen zu können, wurden *in vitro* Experimente an infanten humanen Keratinozyten und Fibroblasten durchgeführt. Das Cx-mimetische Peptid bewirkte in diesen Zellen eine signifikante Hemmung der Cx-Halbkanalaktivität. Es führte außerdem zur signifikanten Steigerung der Proliferation sowie der Migrationsgeschwindigkeit im *Scratch*-Assay. Dabei wurde weder das Proteinlevel noch die Lokalisation von Cx43 beeinflusst, es kam jedoch zu einer signifikant erhöhten Gap27-vermittelten Phosphorylierung am Serinrest 368 von Cx43. Diese Modifikation führt zu undurchlässigen GJs und ist auch im Verlauf der normalen Wundheilung in der Epidermis von Bedeutung.

Für eine mögliche zukünftige Anwendung in der Wundheilungstherapie war es essentiell, dass Gap27 auch auf adulte Zellen wirkt, da häufig ältere Menschen an Wundheilungsstörungen leiden. Von speziellem Interesse sind auch diabetische Wunden. Aus diesem Grund wurden Versuche mit Keratinozyten und Fibroblasten durchgeführt, die aus Hautbiopsien adulter nicht-diabetischer und diabetischer Spender isoliert worden waren. Gap27 hatte eine deutliche Wirkung auf adulte nicht-diabetische Zellen, indem es ihre Proliferation und Migration signifikant beeinflusste und ihre Cx-Halbkanalaktivität signifikant hemmte. Im Gegensatz dazu zeichneten sich sowohl diabetische Keratinozyten als auch Fibroblasten in frühen Passagen durch eine stark reduzierte Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Gap27 aus. In späten Passagen jedoch reagieren sie ähnlich wie die nicht-diabetischen Kontrollen. Diese Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass Zellen diabetischen Ursprungs über einen veränderten Phänotyp verfügen, der eine eingeschränkte Reaktion auf Signale von außen bewirkt und im Verlauf längerer Kultivierung verlorengeht. Im Proteinlevel von Cx43 unterschieden sich Zellen unterschiedlichen Ursprungs nicht und auch die Gap27-vermittelte Phosphorylierung am Serin 368 fand unabhängig von der Herkunft der Zellen statt. Allerdings zeigten diabetische Keratinozyten eine signifikant langsamere Migration und Cx-Halbkanalaktivität. Zudem sezernierten sie während ihrer Migration deutlich erhöhte Mengen an Matrixmetalloproteasen (MMPs) im Vergleich zu nicht-diabetische Zellen und verfügten darüber hinaus über ein größeres MMP/TIMP-Verhältnis. Zur Untersuchung der möglichen Ursachen der beobachteten Unterschiede zwischen Zellen verschiedener Herkunft wurde in Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen mittels Hyperglycämie eine diabetische Umgebung simuliert. Während dies in Fibroblasten keinen Effekt auf Cx43 hatte, wurde es in Keratinozyten vermindert gefunden. Es kam jedoch in beiden Zelltypen zu einer signifikant verlangsamten Migration und zu einer stark reduzierten Sensitivität gegenüber Gap27. Da sich hier zum Teil deutliche Parallelen zu den Zellen diabetischen Ursprungs ergaben, liegt die Vermutung nahe, dass deren veränderter Phänotyp zumindest zum Teil auf durch Hyperglycämie vermittelte Vorschädigung zurückzuführen ist. Da Gap27, also das Cx43-Targeting auf Proteinebene, in den diabetischen und auch in den hyperglycämischen Zellen keine Wirkung auf deren Migration zeigte, wurde zusätzlich untersucht, wie hyperglycämische Zellen auf das Cx43-Targeting auf mRNA-Ebene reagieren. Während es unter physiologischen Bedingungen zu einer signifikanten Migrationssteigerung in Keratinozyten und Fibroblasten kam, zeigten die gleichen Zellen unter hyperglycämischen Bedingungen, ähnlich wie bei Gap27, ein stark vermindertes Ansprechen.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Potential von Cx43 als mögliches therapeutisches Target für die Wundheilungstherapie für das humane System gezeigt werden. Dabei könnte das Cx-mimetische Peptid Gap27 sowohl in der Behandlung akuter als auch chronischer Wunden von Patienten aller Altersklassen Anwendung finden, da es sowohl auf infante als auch auf adulte Zellen wirkt. Die hier gezeigten Daten lassen jedoch Limitierungen in der Behandlung diabetischer Wunden vermuten, da Zellen diabetischen Ursprungs eine sehr eingeschränkte Sensitivität gegenüber Gap27 aufweisen. Somit ergeben sich Fragen über mögliche Unterschiede der Rolle von Cx43 in normaler und diabetischer Wundheilung, deren Beantwortung im Hinblick auf die zukünftige Entwicklung effizienter Behandlungsmethoden diabetischer Wunden wichtig ist.

Abkürzungen

Allgemeine Abkürzungen

Abb.
bFGF
CSF-1
CTGF
Cx
Cx43as-ODNs
Cx43s-ODNs
deion.
DEPC
DFS
DMSO
DNA
ECM
EDTA
ER
FCS
g
GJ
GJIC
Gy
IF
IFN- γ
IGF
IL
Lsg.
LY
MMP
MRP
mRNA
NGS

Erklärung

Abbildung
basic Fibroblast Growth Factor
Colony Stimulating Factor 1
Connective Tissue Growth Factor
Connexin
Cx43-*Antisense*-Oligonukleotide
Cx43-*Sense*-Oligonukleotide
deionisiert
Diethylpyrocarbonat
Diabetisches Fußsyndrom
Dimethylsulfoxid
Desoxyribonucleinsäure
Extrazelluläre Matrix
Ethylendiaminotetraessigsäure
Endoplasmatisches Reticulum
Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ ms}^{-2}$)
Gap Junction
Gap Junctional Intercellular Communication
Gray (Einheit für Strahlungsdosis)
Immunfluoreszenz
Interferon γ
Insulin-like Growth Factor
Interleucin
Lösung
Lucifer Yellow
Matrixmetalloprotease
Meerrettich-Peroxidase
Messenger RNA
Normal Goat Serum

OD	Optische Dichte
ODNs	Oligodeoxynukleotide
P	Passage
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
pH	potentium hydrogenii
PI	Propidium Iodid
pS368	Phosphoserin 368
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
Tab.	Tabelle
TGF- β	<i>transforming Growth Factor β</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>
TMH	Transmembranhelix
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
Tris	(Tris(hydroxymethyl)aminomethan)
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Iso-Thiocyanat
üN	über Nacht
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WB	Western Blot
WHM	Wundheilungsmodell

Einheit	Erklärung
A	Ampere
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
min	Minute
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (Zentrifugalkraft)
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
V	Volt
sec	Sekunde
M	Molar (Mol pro Liter)
l	Liter

Literaturverzeichnis

- Abdullah, K. M., Luthra, G., Bilski, J. J., Abdullah, S. A., Reynolds, L. P., Redmer, D. A., and Grazul-Bilska, A. T. (1999). Cell-to-cell communication and expression of gap junctional proteins in human diabetic and nondiabetic skin fibroblasts: effects of basic fibroblast growth factor. *Endocrine*, 10(1):35–41.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2001). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 2. Auflage*. Wiley-VCH.
- Andreea, S. I., Marieta, C., and Anca, D. (2008). Ages and glucose levels modulate type i and iii procollagen mrna synthesis in dermal fibroblasts cells culture. *Exp Diabetes Res*, 2008:473603.
- Bajpai, S., Shukla, V. K., Tripathi, K., Srikrishna, S., and Singh, R. K. (2009). Targeting connexin 43 in diabetic wound healing: future perspectives. *J Postgrad Med*, 55(2):143–149.
- Baumgartner-Parzer, S. M., Wagner, L., Pettermann, M., Grillari, J., Gessl, A., and Waldhäusl, W. (1995). High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes*, 44(11):1323–1327.
- Becker, D., Lin, J., and Green, C. (1999a). *Antisense Technology in the Central Nervous System*, chapter Pluronic gel as means of antisense-delivery, pages 149 – 157. Oxford University Press.
- Becker, D. L., McGonnell, I., Makarenkova, H. P., Patel, K., Tickle, C., Lorimer, J., and Green, C. R. (1999b). Roles for alpha 1 connexin in morphogenesis of chick embryos revealed using a novel antisense approach. *Dev Genet*, 24(1-2):33–42.
- Becker, D. L. and Mobbs, P. (1999). Connexin alpha1 and cell proliferation in the developing chick retina. *Exp Neurol*, 156(2):326–332.
- Bellingan, G. J., Caldwell, H., Howie, S. E., Dransfield, I., and Haslett, C. (1996). In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *J Immunol*, 157(6):2577–2585.
- Benazzoug, Y., Borchiellini, C., Labat-Robert, J., Robert, L., and Kern, P. (1998). Effect of high-glucose concentrations on the expression of collagens and fibronectin by fibroblasts in culture. *Exp Gerontol*, 33(5):445–455.

- Blakytyn, R. and Judel, E. B. (2009). Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*, 8(2):95–104.
- Bowman, N. N., Donahue, H. J., and Ehrlich, H. P. (1998). Gap junctional intercellular communication contributes to the contraction of rat osteoblast populated collagen lattices. *J Bone Miner Res*, 13(11):1700–1706.
- Braet, K., Aspeslagh, S., Vandamme, W., Willecke, K., Martin, P. E. M., Evans, W. H., and Leybaert, L. (2003a). Pharmacological sensitivity of atp release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells. *J Cell Physiol*, 197(2):205–213.
- Braet, K., Vandamme, W., Martin, P. E. M., Evans, W. H., and Leybaert, L. (2003b). Photoliberating inositol-1,4,5-trisphosphate triggers atp release that is blocked by the connexin mimetic peptide gap 26. *Cell Calcium*, 33(1):37–48.
- Brandner, J., Houdek, P., Quitschau, T., Siemann-Harms, U., Ohnemus, U., Willhardt, I., and Moll, I. (2006). An ex vivo model to evaluate dressings and drugs for wound healing. *EWMA Journal*, 6 (2):11 – 15.
- Brandner, J. M., Houdek, P., Hüsing, B., Kaiser, C., and Moll, I. (2004). Connexins 26, 30, and 43: differences among spontaneous, chronic, and accelerated human wound healing. *J Invest Dermatol*, 122(5):1310–1320.
- Brandner, J. M., Zacheja, S., Houdek, P., Moll, I., and Lobmann, R. (2008). Expression of matrix metalloproteinases, cytokines and connexins in diabetic and non-diabetic human keratinocytes before and after transplantation into an ex-vivo wound healing model. *Diabetes Care*.
- Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2007). Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest*, 117(5):1219–1222.
- Brisette, J. L., Kumar, N. M., Gilula, N. B., Hall, J. E., and Dotto, G. P. (1994). Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(14):6453–6457.
- Brown, E. J. (1995). Phagocytosis. *Bioessays*, 17(2):109–117.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., and A, D. F. (2001). Connexin 43 hemichannels mediate ca²⁺-regulated transmembrane nad⁺ fluxes in intact cells. *FASEB J*, 15(1):10–12.
- Chaytor, A. T., Martin, P. E., Edwards, D. H., and Griffith, T. M. (2001). Gap junctional communication underpins edhf-type relaxations evoked by ach in the rat hepatic artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(6):H2441–H2450.

- Cherian, P. P., Siller-Jackson, A. J., Gu, S., Wang, X., Bonewald, L. F., Sprague, E., and Jiang, J. X. (2005). Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell*, 16(7):3100–3106.
- Clark, R. A. (1990). Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. *J Invest Dermatol*, 94(6 Suppl):128S–134S.
- Contreras, J. E., Sánchez, H. A., Eugenin, E. A., Speidel, D., Theis, M., Willecke, K., Bukauskas, F. F., Bennett, M. V. L., and Sáez, J. C. (2002). Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1):495–500.
- Coutinho, P., Qiu, C., Frank, S., Tamber, K., and Becker, D. (2003). Dynamic changes in connexin expression correlate with key events in the wound healing process. *Cell Biol Int*, 27(7):525–541.
- Coutinho, P., Qiu, C., Frank, S., Wang, C. M., Brown, T., Green, C. R., and Becker, D. L. (2005). Limiting burn extension by transient inhibition of connexin43 expression at the site of injury. *Br J Plast Surg*, 58(5):658–667.
- Dahl, G. (2007). Gap junction-mimetic peptides do work, but in unexpected ways. *Cell Commun Adhes*, 14(6):259–264.
- Darby, I. A., Bisucci, T., Hewitson, T. D., and MacLellan, D. G. (1997). Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol*, 29(1):191–200.
- Di, W. L., Rugg, E. L., Leigh, I. M., and Kelsell, D. P. (2001). Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. *J Invest Dermatol*, 117(4):958–964.
- Djalilian, A. R., McGaughey, D., Patel, S., Seo, E. Y., Yang, C., Cheng, J., Tomic, M., Sinha, S., Ishida-Yamamoto, A., and Segre, J. A. (2006). Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. *J Clin Invest*, 116(5):1243–1253.
- Dobrowolski, R. and Willecke, K. (2009). Connexin-caused genetic diseases and corresponding mouse models. *Antioxid Redox Signal*, 11(2):283–295.
- Evans, W. H. and Boitano, S. (2001). Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 4):606–612.
- Evans, W. H. and Leybaert, L. (2007). Mimetic peptides as blockers of connexin channel-facilitated intercellular communication. *Cell Commun Adhes*, 14(6):265–273.
- Evans, W. H., Vuyst, E. D., and Leybaert, L. (2006). The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J*, 397(1):1–14.

- Fernandes, R., Girão, H., and Pereira, P. (2004). High glucose down-regulates intercellular communication in retinal endothelial cells by enhancing degradation of connexin 43 by a proteasome-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 279(26):27219–27224.
- Fritsch, P. (1998). *Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas, 2. Auflage*. Springer Verlag.
- Goldberg, G. S., Moreno, A. P., and Lampe, P. D. (2002). Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and atp. *J Biol Chem*, 277(39):36725–36730.
- Goldberg, G. S., Valiunas, V., and Brink, P. R. (2004). Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta*, 1662(1-2):96–101.
- Goliger, J. A. and Paul, D. L. (1995). Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol Biol Cell*, 6(11):1491–1501.
- Gomes, P., Srinivas, S. P., Vereecke, J., and Himpens, B. (2006). Gap junctional intercellular communication in bovine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*, 83(5):1225–1237.
- Goodenough, D. A. and Paul, D. L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(4):285–294.
- Greenhalgh, D. G. (2003). Wound healing and diabetes mellitus. *Clin Plast Surg*, 30(1):37–45.
- Griffith, T. M., Chaytor, A. T., and Edwards, D. H. (2004). The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization. *Pharmacol Res*, 49(6):551–564.
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193):314–321.
- Haass, N. K., Wladykowski, E., Kief, S., Moll, I., and Brandner, J. M. (2006). Differential induction of connexins 26 and 30 in skin tumors and their adjacent epidermis. *J Histochem Cytochem*, 54(2):171–182.
- Harris, A. L. (2001). Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys*, 34(3):325–472.
- Hehenberger, K., Heilborn, J. D., Brismar, K., and Hansson, A. (1998). Inhibited proliferation of fibroblasts derived from chronic diabetic wounds and normal dermal fibroblasts treated with high glucose is associated with increased formation of l-lactate. *Wound Repair Regen*, 6(2):135–141.
- Heldin, C. and Westermark, B. (1996). *The Molecular and cellular Biology of Wound Repair*, chapter The role of platelet derived growth factor in vivo, pages 249 – 273. New York Plenum Press.

- Hills, C. E., Bland, R., Bennett, J., Ronco, P. M., and Squires, P. E. (2009). Tgf-beta1 mediates glucose-evoked up-regulation of connexin-43 cell-to-cell communication in hcd-cells. *Cell Physiol Biochem*, 24(3-4):177–186.
- Huang, G. Y., Cooper, E. S., Waldo, K., Kirby, M. L., Gilula, N. B., and Lo, C. W. (1998). Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *J Cell Biol*, 143(6):1725–1734.
- Islam, M. S. and Loots, D. T. (2009). Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 31(4):249–261.
- Jung, E. G. (1995). *Dermatologie - Duale Reihe (3. Auflage)*. Hippokrates Verlag Stuttgart.
- Kandel, E., Schwartz, J., and Jessell, T. (1995). *Principles of Neural Science, 3. Auflage*. Elsevier Science Publishing Cooperation, New York, USA.
- Kandyba, E. E., Hodgins, M. B., and Martin, P. E. (2007). A murine living skin equivalent amenable to live-cell imaging: Analysis of the roles of connexins in the epidermis. *J Invest Dermatol*.
- Kähäri, V. M. and Saarialho-Kere, U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol*, 6(5):199–213.
- Kim, J. H., Nishina, P. M., and Naggert, J. K. (1998). Genetic models for non insulin dependent diabetes mellitus in rodents. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 9(2-4):325–345.
- King, G. L. and Brownlee, M. (1996). The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25(2):255–270.
- Ko, K., Arora, P., Lee, W., and McCulloch, C. (2000). Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(1):C147–C157.
- Kreisberg, J. I., Garoni, J. A., Radnik, R., and Ayo, S. H. (1994). High glucose and tgf-beta 1 stimulate fibronectin gene expression through a camp response element. *Kidney Int*, 46(4):1019–1024.
- Kretz, M., Euwens, C., Hombach, S., Eckardt, D., Teubner, B., Traub, O., Willecke, K., and Ott, T. (2003). Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J Cell Sci*, 116(Pt 16):3443–3452.
- Kumar, N. M. and Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*, 84(3):381–388.
- Kwak, B. R., Pepper, M. S., Gros, D. B., and Meda, P. (2001). Inhibition of endothelial wound repair by dominant negative connexin inhibitors. *Mol Biol Cell*, 12(4):831–845.

- Labarthe, M. P., Bosco, D., Saurat, J. H., Meda, P., and Salomon, D. (1998). Upregulation of connexin 26 between keratinocytes of psoriatic lesions. *J Invest Dermatol*, 111(1):72–76.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Lairds, D. W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J*, 394(Pt 3):527–543.
- Lampe, P. D., TenBroek, E. M., Burt, J. M., Kurata, W. E., Johnson, R. G., and Lau, A. F. (2000). Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase c regulates gap junctional communication. *J Cell Biol*, 149(7):1503–1512.
- Lan, C.-C. E., Liu, I.-H., Fang, A.-H., Wen, C.-H., and Wu, C.-S. (2008). Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes. *Br J Dermatol*, 159(5):1103–1115.
- Lan, C.-C. E., Wu, C.-S., Kuo, H.-Y., Huang, S.-M., and Chen, G.-S. (2009). Hyperglycaemic conditions hamper keratinocyte locomotion via sequential inhibition of distinct pathways: new insights on poor wound closure in patients with diabetes. *Br J Dermatol*, 160(6):1206–1214.
- Larjava, H., Salo, T., Haapasalmi, K., Kramer, R. H., and Heino, J. (1993). Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J Clin Invest*, 92(3):1425–1435.
- Larson, D. (1990). *Cell Intercommunication*, chapter Junctional Communication and the wound healing response. CRC Press.
- Law, L. Y., Zhang, W. V., Stott, N. S., Becker, D. L., and Green, C. R. (2006). In vitro optimization of antisense oligodeoxynucleotide design: an example using the connexin gene family. *J Biomol Tech*, 17(4):270–282.
- Lerman, O. Z., Galiano, R. D., Armour, M., Levine, J. P., and Gurtner, G. C. (2003). Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Pathol*, 162(1):303–312.
- Leybaert, L., Braet, K., Vandamme, W., Cabooter, L., Martin, P. E. M., and Evans, W. H. (2003). Connexin channels, connexin mimetic peptides and atp release. *Cell Commun Adhes*, 10(4-6):251–257.
- Li, W. E. I., Waldo, K., Linask, K. L., Chen, T., Wessels, A., Parmacek, M. S., Kirby, M. L., and Lo, C. W. (2002). An essential role for connexin43 gap junctions in mouse coronary artery development. *Development*, 129(8):2031–2042.
- Lioupis, C. (2005). Effects of diabetes mellitus on wound healing: an update. *J Wound Care*, 14(2):84–86.

- Lobmann, R., Ambrosch, A., Schultz, G., Waldmann, K., Schiweck, S., and Lehnert, H. (2002). Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia*, 45(7):1011–1016.
- Loots, M. A., Kenter, S. B., Au, F. L., van Galen, W. J. M., Middelkoop, E., Bos, J. D., and Mekkes, J. R. (2002). Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with egf, igf-i, bfgf and pdgf-ab compared to controls. *Eur J Cell Biol*, 81(3):153–160.
- Loots, M. A., Lamme, E. N., Zeegelaar, J., Mekkes, J. R., Bos, J. D., and Middelkoop, E. (1998). Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol*, 111(5):850–857.
- Lorenzi, M., Cagliero, E., and Toledo, S. (1985). Glucose toxicity for human endothelial cells in culture. delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. *Diabetes*, 34(7):621–627.
- Lucke, T., Choudhry, R., Thom, R., Selmer, I. S., Burden, A. D., and Hodgins, M. B. (1999). Upregulation of connexin 26 is a feature of keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis, vaginal epithelium, and buccal epithelium. *J Invest Dermatol*, 112(3):354–361.
- Madri, J., Sankar, S., and Romanic, A. (1996). *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, chapter Angiogenesis, pages 355 – 371. New York Plenum Press.
- Markuson, M., Hanson, D., Anderson, J., Langemo, D., Hunter, S., Thompson, P., Paulson, R., and Rustvang, D. (2009). The relationship between hemoglobin a(1c) values and healing time for lower extremity ulcers in individuals with diabetes. *Adv Skin Wound Care*, 22(8):365–372.
- Marston, W. A. and Group, D. D. F. U. S. (2006). Risk factors associated with healing chronic diabetic foot ulcers: the importance of hyperglycemia. *Ostomy Wound Manage*, 52(3):26–8, 30, 32 passim.
- Martin, P. E. M., Wall, C., and Griffith, T. M. (2005). Effects of connexin-mimetic peptides on gap junction functionality and connexin expression in cultured vascular cells. *Br J Pharmacol*, 144(5):617–627.
- Masgrau-Peya, E., Salomon, D., Saurat, J. H., and Meda, P. (1997). In vivo modulation of connexins 43 and 26 of human epidermis by topical retinoic acid treatment. *J Histochem Cytochem*, 45(9):1207–1215.
- Mast, B. A. and Schultz, G. S. (1996). Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen*, 4(4):411–420.
- Matic, M., Petrov, I. N., Rosenfeld, T., and Wolosin, J. M. (1997). Alterations in connexin expression and cell communication in healing corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(3):600–609.

- Mese, G., Richard, G., and White, T. W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127(11):2516–2524.
- Meyer, W. (1996). [comments on the suitability of swine skin as a biological model for human skin]. *Hautarzt*, 47(3):178–182.
- Moore, L. K. and Burt, J. M. (1994). Selective block of gap junction channel expression with connexin-specific antisense oligodeoxynucleotides. *Am J Physiol*, 267(5 Pt 1):C1371–C1380.
- Mori, R., Power, K. T., Wang, C. M., Martin, P., and Becker, D. L. (2006). Acute downregulation of connexin43 at wound sites leads to a reduced inflammatory response, enhanced keratinocyte proliferation and wound fibroblast migration. *J Cell Sci*, 119(Pt 24):5193–5203.
- Moulin, V. (1995). Growth factors in skin wound healing. *Eur J Cell Biol*, 68(1):1–7.
- Moyer, K. E., Davis, A., Saggars, G. C., Mackay, D. R., and Ehrlich, H. P. (2002). Wound healing: the role of gap junctional communication in rat granulation tissue maturation. *Exp Mol Pathol*, 72(1):10–16.
- Musil, L. S., Le, A. C., VanSlyke, J. K., and Roberts, L. M. (2000). Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem*, 275(33):25207–25215.
- O'Carroll, S. J., Alkadhi, M., Nicholson, L. F. B., and Green, C. R. (2008). Connexin 43 mimetic peptides reduce swelling, astrogliosis, and neuronal cell death after spinal cord injury. *Cell Commun Adhes*, 15(1):27–42.
- Oviedo-Orta, E., Errington, R. J., and Evans, W. H. (2002). Gap junction intercellular communication during lymphocyte transendothelial migration. *Cell Biol Int*, 26(3):253–263.
- Oviedo-Orta, E., Gasque, P., and Evans, W. H. (2001). Immunoglobulin and cytokine expression in mixed lymphocyte cultures is reduced by disruption of gap junction intercellular communication. *FASEB J*, 15(3):768–774.
- Oviedo-Orta, E., Hoy, T., and Evans, W. H. (2000). Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood and tonsil human lymphocyte subpopulations. *Immunology*, 99(4):578–590.
- Parpura, V., Scemes, E., and Spray, D. C. (2004). Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction hemichannels, purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochem Int*, 45(2-3):259–264.
- Paterson, B. M., Roberts, B. E., and Kuff, E. L. (1977). Structural gene identification and mapping by dna-mrna hybrid-arrested cell-free translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(10):4370–4374.

- Peppas, M., Stavroulakis, P., and Raptis, S. A. (2009). Advanced glycoxidation products and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair Regen*, 17(4):461–472.
- Petrova, N. and Edmonds, M. (2006). Emerging drugs for diabetic foot ulcers. *Expert Opin Emerg Drugs*, 11(4):709–724.
- Pfeiffer, A.-C. (2008). *Die Rolle der Connexine in der Wundheilung*. PhD thesis, Klinikum für Dermatologie und Venerologie, Fachbereich Medizin der Universität Hamburg.
- Phan-Thanh, L., Robert, L., Derouette, J. C., and Labat-Robert, J. (1987). Increased biosynthesis and processing of fibronectin in fibroblasts from diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(7):1911–1915.
- Pierce, G. F. and Mustoe, T. A. (1995). Pharmacologic enhancement of wound healing. *Annu Rev Med*, 46:467–481.
- Pilcher, B. K., Dumin, J. A., Sudbeck, B. D., Krane, S. M., Welgus, H. G., and Parks, W. C. (1997). The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol*, 137(6):1445–1457.
- Pitts, J. D., Hamilton, A. E., Kam, E., Burk, R. R., and Murphy, J. P. (1986). Retinoic acid inhibits junctional communication between animal cells. *Carcinogenesis*, 7(6):1003–1010.
- Prochnow, N. and Dermietzel, R. (2008). Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochem Cell Biol*, 130(1):71–77.
- Qin, H., Shao, Q., Igdoura, S. A., Alaoui-Jamali, M. A., and Laird, D. W. (2003). Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells. *J Biol Chem*, 278(32):30005–30014.
- Qiu, C., Coutinho, P., Frank, S., Franke, S., Yong Law, L., Martin, P., Green, C. R., and Becker, D. L. (2003). Targeting connexin43 expression accelerates the rate of wound repair. *Curr Biol*, 13(19):1697–1703.
- Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J., and Werb, Z. (1988). Wound macrophages express tgf- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*, 241(4866):708–712.
- Reaume, A. G., de Sousa, P. A., Kulkarni, S., Langille, B. L., Zhu, D., Davies, T. C., Juneja, S. C., Kidder, G. M., and Rossant, J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*, 267(5205):1831–1834.
- Reiber, G. E., Vileikyte, L., Boyko, E. J., del Aguila, M., Smith, D. G., Lavery, L. A., and Boulton, A. J. (1999). Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings. *Diabetes Care*, 22(1):157–162.

- Reiss, M. J., Han, Y.-P., Garcia, E., Goldberg, M., Yu, H., and Garner, W. L. (2010). Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model. *Surgery*, 147(2):295–302.
- Richard, G. (2000). Connexins: a connection with the skin. *Exp Dermatol*, 9(2):77–96.
- Richards, T. S., Dunn, C. A., Carter, W. G., Usui, M. L., Olerud, J. E., and Lampe, P. D. (2004). Protein kinase c spatially and temporally regulates gap junctional communication during human wound repair via phosphorylation of connexin43 on serine368. *J Cell Biol*, 167(3):555–562.
- Risek, B., Pozzi, A., and Gilula, N. B. (1998). Modulation of gap junction expression during transient hyperplasia of rat epidermis. *J Cell Sci*, 111 (Pt 10):1395–1404.
- Rivas, M. V., Jarvis, E. D., Morisaki, S., Carbonaro, H., Gottlieb, A. B., and Krueger, J. G. (1997). Identification of aberrantly regulated genes in diseased skin using the cDNA differential display technique. *J Invest Dermatol*, 108(2):188–194.
- Robson, M. C., Steed, D. L., and Franz, M. G. (2001). Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg*, 38(2):72–140.
- Rodríguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., López, D., Torre, I., Morente, M., Abellán, A., Miró, E., Ruiz-Meana, M., and García-Dorado, D. (2007). The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Prog Biophys Mol Biol*, 94(1-2):219–232.
- Saarialho-Kere, U. K., Kovacs, S. O., Pentland, A. P., Olerud, J. E., Welgus, H. G., and Parks, W. C. (1993). Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. *J Clin Invest*, 92(6):2858–2866.
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D., and Beyer, E. C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*, 83(4):1359–1400.
- Saitoh, M., Oyamada, M., Oyamada, Y., Kaku, T., and Mori, M. (1997). Changes in the expression of gap junction proteins (connexins) in hamster tongue epithelium during wound healing and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 18(7):1319–1328.
- Salomon, D., Masgrau, E., Vischer, S., Ullrich, S., Dupont, E., Sappino, P., Saurat, J. H., and Meda, P. (1994). Topography of mammalian connexins in human skin. *J Invest Dermatol*, 103(2):240–247.
- Sank, A., Wei, D., Reid, J., Ertl, D., Nimni, M., Weaver, F., Yellin, A., and Tuan, T. L. (1994). Human endothelial cells are defective in diabetic vascular disease. *J Surg Res*, 57(6):647–653.
- Sato, T., Haimovici, R., Kao, R., Li, A.-F., and Roy, S. (2002). Downregulation of connexin 43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells. *Diabetes*, 51(5):1565–1571.

- Schalper, K. A., Palacios-Prado, N., Orellana, J. A., and Sáez, J. C. (2008). Currently used methods for identification and characterization of hemichannels. *Cell Commun Adhes*, 15(1):207–218.
- Segretain, D. and Falk, M. M. (2004). Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta*, 1662(1-2):3–21.
- Sáez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F., and Bennett, M. V. L. (2005). Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1711(2):215–224.
- Söhl, G. and Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*, 62(2):228–232.
- Sibbitt, W. L., Mills, R. G., Bigler, C. F., Eaton, R. P., Griffey, R. H., and Jagt, D. L. V. (1989). Glucose inhibition of human fibroblast proliferation and response to growth factors is prevented by inhibitors of aldose reductase. *Mech Ageing Dev*, 47(3):265–279.
- Simpson, I., Rose, B., and Loewenstein, W. R. (1977). Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science*, 195(4275):294–296.
- Singer, A. J. and Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341(10):738–746.
- Smola, H., Eming, S., Hess, S., and Krieg, S. W. (2001). Wundheilung und wundheilungsstörungen. *Deutsches Ärzteblatt*, 98:A2802–A2809.
- Solan, J. L. and Lampe, P. D. (2009). Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J*, 419(2):261–272.
- Soo, C., Shaw, W. W., Zhang, X., Longaker, M. T., Howard, E. W., and Ting, K. (2000). Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg*, 105(2):638–647.
- Spravchikov, N., Sizyakov, G., Gartsbein, M., Accili, D., Tennenbaum, T., and Wertheimer, E. (2001). Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. *Diabetes*, 50(7):1627–1635.
- Standl, E., Müller, M., and Schnell, O. (2009). The impact of glucose-lowering therapy on cardiovascular outcomes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23(3):401–411.
- Sullivan, T. P., Eaglstein, W. H., Davis, S. C., and Mertz, P. (2001). The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen*, 9(2):66–76.
- Tada, J. and Hashimoto, K. (1997). Ultrastructural localization of gap junction protein connexin 43 in normal human skin, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol*, 24(10):628–635.

- Terashi, H., Izumi, K., Deveci, M., Rhodes, L. M., and Marcelo, C. L. (2005). High glucose inhibits human epidermal keratinocyte proliferation for cellular studies on diabetes mellitus. *Int Wound J*, 2(4):298–304.
- Usui, M. L., Mansbridge, J. N., Carter, W. G., Fujita, M., and Olerud, J. E. (2008). Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *J Histochem Cytochem*, 56(7):687–696.
- Wang, C. M., Lincoln, J., Cook, J. E., and Becker, D. L. (2007). Abnormal connexin expression underlies delayed wound healing in diabetic skin. *Diabetes*.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5):1047–1053.
- Wilgenbus, K. K., Kirkpatrick, C. J., Knuechel, R., Willecke, K., and Traub, O. (1992). Expression of cx26, cx32 and cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int J Cancer*, 51(4):522–529.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., and Söhl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem*, 383(5):725–737.
- Woessner, J. F. (1999). Matrix metalloproteinase inhibition. from the jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci*, 878:388–403.
- Wright, C. S., van Steensel, M. A. M., Hodgins, M. B., and Martin, P. E. M. (2009). Connexin mimetic peptides improve cell migration rates of human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro. *Wound Repair Regen*, 17(2):240–249d.
- Xu, J. and Clark, R. A. (1996). Extracellular matrix alters pdgf regulation of fibroblast integrins. *J Cell Biol*, 132(1-2):239–249.
- Yager, D. R. and Nwomeh, B. C. (1999). The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen*, 7(6):433–441.
- Ye, Z.-C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S., and Ransom, B. R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci*, 23(9):3588–3596.
- Yevdokimova, N. and Podpryatov, S. (2007). The up-regulation of angiotensin ii receptor type 1 and connective tissue growth factor are involved in high-glucose-induced fibronectin production by cultured human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*, 47(2):127–139.
- Zander, G. and Zander, E. (1999). *Der Diabetische Fuß - Ein Leitfaden für die medizinische Praxis (2. Auflage)*. Schlütersche GmbH & Co. KG Verlag und Druckerei Hannover.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Querschnitt der Haut. (A) Die Haut setzt sich aus der Epidermis, Dermis und dem subkutanen Fettgewebe zusammen. Haare und andere Hautanhangsgebilde wie Talg- und Schweißdrüsen sind in der Dermis lokalisiert. (B) Die Epidermis ist ein aus Keratinozyten bestehendes mehrschichtiges Plattenepithelgewebe und setzt sich aus den Schichten <i>Stratum basale</i> , <i>Stratum spinosum</i> , <i>Stratum granulosum</i> und <i>Stratum corneum</i> zusammen. Wichtige Zell-Zell-Verbindungen in der Epidermis sind zum einen die Desmosomen, die die einzelnen Keratinozyten miteinander verbinden und zum anderen die Hemidesmosomen, die die basalen Keratinozyten in der Basalmembran verankern (modifiziert nach Fritsch [1998]).	2
1.2	Ablauf der kutanen Wundheilung. Die kutane Wundheilung läuft in drei Phasen ab, die zeitlich überlappen: (A) Inflammationsphase, (B) Granulationsphase und (C) Remodellierungsphase (modifiziert nach Gurtner et al. [2008]).	5
1.3	Das diabetische Fußsyndrom (DFS). (A) Schematische Darstellung der häufigsten Lokalisationen des DFS (Bildquelle: www.health.com; Abfragedatum 23.02.2010). (B) Beispiel eines chronischen diabetischen Ulkus am Zeh (modifiziert nach Usui et al. [2008]).	7
1.4	Der Aufbau von Gap Junctions aus Connexinen. (A) Schematische Darstellung eines Connexin-Proteins mit cytosolischem N- und C-Terminus, zwei extrazellulären <i>Loops</i> und vier Transmembranhelices (TMH 1 - 4; modifiziert nach Kumar and Gilula [1996]). (B) Schematische Darstellung von möglichen Cx-Zusammensetzungen von Connexonen (aus sechs Connexinen) bzw. Gap Junction Kanälen (aus zwei Connexonen; modifiziert nach Alberts et al. [2001]). (C) Schematische Darstellung von Gap Junction Kanälen zwischen zwei benachbarten Zellen, von denen jeweils ein Halbkanal gestellt wird. GJ Kanäle sind auf Zelloberflächen meist in größeren Ansammlungen von Kanälen, sogenannten <i>Plaques</i> zu finden (modifiziert nach Kandel et al. [1995]).	10

1.5	<p>Biosynthese, Phosphorylierung und Permselectivität von Gap Junctions. (A) Biosynthese von Gap Junctions: Die im Zellkern transkribierte Cx-mRNA (1) wird an den Ribosomen des Endoplasmatischen Reticulums translatiert und cotranslational in der Membran verankert (2). Die Zusammenlagerung von 6 Connexinen zu einem Connexon findet im <i>trans</i>-Golgi-Apparat statt (3). Von dort werden die Connexone zur Plasmamembran transportiert, wo sie entweder als Halbkanäle aktiv sein können (4a) oder in GJs eingebaut werden (4b; modifiziert nach Mese et al. [2007]). (B) SDS-PAGE Migration von Cx43 in homoeostatischen (CON) und PMA-behandelten Zellen mit der jeweiligen Phosphorylierungsstelle. Phosphorylierung an verschiedenen Stellen hat entweder keinen Einfluss auf die GJIC (grün) oder führt zu inhibierten oder geschlossenen GJ-Kanälen (rot; modifiziert nach Solan and Lampe [2009]). (C) Selektivität von Gap Junctions gegenüber <i>second messengern</i>. Cx43 und Cx32 zeigen unterschiedliche Permeabilität für Adenosin, AMP, ADP und ATP (modifiziert nach Mese et al. [2007]).</p>	12
1.6	<p>Expressionsmuster von Connexinen in der humanen Epidermis. (SC = <i>Stratum corneum</i>, SG = <i>Stratum granulosum</i>, SS = <i>Stratum spinosum</i>, SB = <i>Stratum basale</i>; modifiziert nach Mese et al. [2007]).</p>	14
1.7	<p>Regulation der epidermalen Cx26- und Cx43-Lokalisation während der Wundheilung. Schematische Darstellung der Cx26- und Cx43-Lokalisation (rote Punkte) in nativer humaner Haut, an akuten Wundrändern zu verschiedenen Zeitpunkten (7h, 18h, 24h, 2-3d, 5-6d) und an nicht-heilenden chronische Wundrändern (EE = entfernte Epidermis, NE = nahe Epidermis, WR = Wundrand, LE = <i>leading edge</i>, RE = regenerierende Epidermis; modifiziert nach Brandner et al. [2004])</p>	18
4.1	<p>Effekt von Gap27 auf die Wundheilung in <i>ex vivo</i> Wundheilungsmodellen. (A) Vergleich des Wundheilungsfortschritts in porcinen WHM nach Behandlung mit 600 µM Gap27 und Gap18 bezogen auf die PBS-Kontrolle (n = 9; *: p ≤ 0.05; Mittelwerte ± SEM). (B) Vergleich des Wundheilungsfortschritts in humanen WHM nach Behandlung mit 600 µM Gap27 und Gap18 bezogen auf die PBS-Kontrolle (n = 3; Mittelwert ± SEM). (C, D) HE-gefärbte Gefrierschnitte von mit PBS (C) oder Gap27 (D) behandelten WHM zum Zeitpunkt 48 Stunden nach der Verwundung. Schwarze Pfeile kennzeichnen die regenerierende Epidermis (Längenmaßstab = 50 µm).</p>	46
4.2	<p>Effekt von Gap27 auf die Lokalisation und Regulation von Connexinen im porcinen <i>ex vivo</i> WHM. Immunhistologischer Nachweis von Cx43 (rot) und Cx26 (grün) und deren Co-Lokalisation (gelb) in porcinen WHM (Überlagerung mit Phasenkontrast), die mit PBS (A, C, E, G, I, K) bzw. 600 µM Gap27 (B, D, F, H, J, L) inkubiert wurden (Längenmaßstab = 50 µm). Gezeigt sind die Bereiche der Wundränder (weiße Pfeile kennzeichnen den ursprünglichen Wundrand) zu den Zeitpunkten 2 Stunden (A, B), 6 Stunden (C, D), 18 Stunden (E, F) und 24 Stunden (G, H) nach Verwundung, die dem Wundrand nahe Epidermis (NE) zum Zeitpunkt 24 Stunden (I, J) und die regenerierende Epidermis (RE) zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Verwundung (K, L).</p>	48

4.3	<p>Effekt von Gap27 auf die epidermale Farbstoffausbreitung im porcinen <i>ex vivo</i> WHM. (A) Ausbreitung von Lucifer Yellow in WHM direkt nach Verwundung (0h) bzw. nach 1-stündiger Inkubation mit 600 µM Gap27, Gap18 oder PBS (n = 6; *: p ≤ 0.05; Mittelwerte ± SEM). (B, C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Wundrändern (weiße Pfeile) von eine Stunde mit Gap18 (B) bzw. Gap27 (C) inkubierten WHM, die die Farbstoffausbreitung von Lucifer Yellow (grün) und TRITC-Dextran (rot) zeigen (Überlagerung mit Phasenkontrast; Längenmaßstab = 50 µm).</p>	50
4.4	<p>Effekt von Gap27 auf die Keratinozytenproliferation in <i>ex vivo</i> Wundheilungsmodellen. (A) Vergleich der Anteile proliferativer Zellen am Wundrand (WR) bzw. in der regenerierenden Epidermis (RE) in mit 600 µM Gap27, Gap18 oder PBS behandelten porcinen WHM (n = 9; : p ≤ 0.05; Mittelwerte ± SEM). (B) Schematische Darstellung eines WHM mit den Bereichen, in denen die Keratinozytenproliferation ermittelt wurde: entfernte Epidermis (EE), Wundrand (WR), regenerierende Epidermis (RE).</p>	51
4.5	<p>Effekt von Gap27 auf die Cx-Halbkanal-Aktivität in primären Zellkulturen. Anteil farbstoffpositiver Keratinozyten (A) und Fibroblasten (B), die mit 60 µM Gap27, Gap18 oder PBS behandelt wurden, bezogen auf die jeweilige Gesamtzellzahl (n = 9; *: p ≤ 0.05, **: p ≤ 0.01; Mittelwerte ± SEM).</p>	53
4.6	<p>Einfluss von Gap27 auf die Cx43-Proteinlevel und -Phosphorylierung <i>in vitro</i>. (A) Western Blot Analyse der Proteinlevel von Tubulin, PS368-Cx43 und Cx43 in infanten Keratinozyten- und Fibroblastenkulturen, die für 24 Stunden mit 60 µM Gap27 (+) oder PBS (-) behandelt wurden. (B) Darstellung der auf Tubulin normalisierten Cx43-Level in mit Gap27 behandelten Keratinozyten und Fibroblasten verglichen mit Kontrollzellen. (C) Darstellung des PS368-Cx43/Cx43-Verhältnisses in mit Gap27 behandelten Keratinozyten und Fibroblasten verglichen mit Kontrollzellen (n = 5; *: p ≤ 0.05; Mittelwerte ± SEM).</p>	54
4.7	<p>Effekt von Gap27 auf die Proliferation infanter Zellkulturen im <i>Scratch</i>-Assay. Anteil proliferierender (Ki67-positiver) Zellen im Proliferationsassay von humanen infanten Keratinozyten- (A) und Fibroblastenkulturen (B), die mit 60 µM Gap27 oder PBS (Kontrolle) behandelt wurden, bezogen auf die Gesamtzellzahl (n = 14 (Keratinozyten); n = 10 (Fibroblasten); *: p ≤ 0.05, **: p ≤ 0.01; Mittelwerte ± SEM).</p>	55
4.8	<p>Effekt von Gap27 auf die Migration infanter Zellkulturen. (A, B) Migrationsassay mit proliferationsinhibierten primären Keratinozyten (A) und Fibroblasten (B), die mit 60 µM Gap27 oder PBS (Kontrolle) behandelt wurden (Längenmaßstab = 100 µm). (C, D) Breite der <i>Scratch</i>-Wunde in Keratinozyten- (C) und Fibroblastenkulturen (D), die mit 60 µM Gap27 oder PBS (Kontrolle) behandelt wurden, zu den Zeitpunkten 0, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach Verwundung (n = 14; *: p ≤ 0.05, **: p ≤ 0.01; Mittelwerte ± SEM; Hinweis: Ein niedrigerer Wert bedeutet eine schnellere Migration).</p>	57

4.9	<p>Effekt von Gap27 auf die Proliferation in adulten Zellkulturen im <i>Scratch</i>-Assay. Anteil proliferierender (Ki67-positiver) Zellen im <i>Scratch</i>-Assay in humanen adulten nicht-diabetischen (ndiab) Keratinozyten (A) und Fibroblasten (B), adulten diabetischen (diab) Keratinozyten (C) und Fibroblasten (D) in frühen Passagen (P2 – P5) sowie adulten diabetischen Keratinozyten (E) und Fibroblasten (F) in späten Passagen (P12 – P15), die mit 60 µM Gap27 oder PBS (Kontrolle) behandelt wurden, bezogen auf die Gesamtzellzahl am Wundrand (n = 10; *: p ≤ 0.05, **: p ≤ 0.01; Mittelwerte ± SEM).</p>	59
4.10	<p>Effekt von Gap27 auf die Migration primärer Zellkulturen. Breite der <i>Scratch</i>-Wunde in proliferationsinhibierten humanen adulten nicht-diabetischen (ndiab) Keratinozyten (A) und Fibroblasten (B), adulten diabetischen (diab) Keratinozyten (C) und Fibroblasten (D) in frühen Passagen (P2 – P5) sowie adulten diabetischen Keratinozyten (E) und Fibroblasten (F) in späten Passagen (P12 – P15), die mit 60 µM Gap27 oder PBS (Kontrolle) behandelt wurden, zu den Zeitpunkten 0, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach Verwundung (n = 14; *: p ≤ 0.05; Mittelwerte ± SEM).</p>	61
4.11	<p>Vergleich der Cx43-Proteinlevel in adulten nicht-diabetischen und diabetischen Zellen. (A, B) Immunzytologischer Nachweis von Cx43 (grün) in nicht-diabetischen (K ndiab) und diabetischen (K diab) Keratinozytenkulturen (Zellkerne sind mit DAPI blau markiert). (C) Western Blot Analyse der Expression von Tubulin, PS368-Cx43 und Cx43 in nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozytenkulturen, die für 24 Stunden mit 60 µM Gap27 (+) oder PBS (–) behandelt wurden. (D, E) Immunzytologischer Nachweis von Cx43 (grün) in nicht-diabetischen (F ndiab) und diabetischen (F diab) Fibroblastenkulturen (Zellkerne sind mit DAPI blau markiert). (F) Western Blot Analyse der Expression von Tubulin, PS368-Cx43 und Cx43 in nicht-diabetischen und diabetischen Fibroblastenkulturen, die für 24 Stunden mit 60 µM Gap27 (+) oder PBS (–) behandelt wurden. (G, H) Darstellung der Cx43-Expression in nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten (G) und Fibroblasten (H) in An- und Abwesenheit von 60 µM Gap27 normiert auf die Tubulin-Level. (I, J) Statistische Darstellung des PS368-Cx43/Cx43-Verhältnisses in nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten (I) und Fibroblasten (J) in An- und Abwesenheit von 60 µM Gap27 (Längenmaßstab = 20 µm; n = 5; *: p ≤ 0.05; Mittelwerte ± SEM).</p>	63
4.12	<p>Effekt von Gap27 auf die Cx-Halbkanal-Aktivität in primären Zellkulturen. Anteil Propidium Iodid (PI) positiver Keratinozyten (A) und Fibroblasten (B) unterschiedlichen Ursprungs bezogen auf die für infantile Zellen ermittelten Werte (ndiab = nicht-diabetisch, diab = diabetisch). Anteil farbstoff-positiver adulter nicht-diabetischer Keratinozyten (C) und Fibroblasten (D) sowie adulter diabetischer Keratinozyten (E) und Fibroblasten (F), die mit 60 µM Gap27, Gap18 oder PBS behandelt wurden, bezogen auf die jeweilige Gesamtzellzahl (n = 9; *: p ≤ 0.05, **: p ≤ 0.01; Mittelwerte ± SEM).</p>	65
4.13	<p>Einfluss der Herkunft und Gap27-Behandlung auf die MMP-Sekretion primärer Keratinozyten. (A) Relative Proteinlevel von MMP-1, MMP-2, MMP-9 und TIMP-2 in Zellkulturüberständen von Keratinozyten unterschiedlichen Ursprungs bezogen auf infantile Zellen. (B) Relatives MMP/TIMP-Verhältnis in Keratinozyten unterschiedlicher Herkunft und Behandlung bezogen auf die PBS-behandelte Kontrolle (ndiab = nicht-diabetisch, diab = diabetisch).</p>	67

<p>4.14 Effekte von Glucose auf Lokalisation und Expression von Cx43 und Fibronectin in Keratinozyten und Fibroblasten. (A – D) Immunzytologische Lokalisation von Cx43 (grün; A, B) und Fibronectin (grün; C, D) in mit 6 mM (A, C) bzw. 25 mM (B, D) Glucose inkubierten infanten Keratinozyten (Zellkerne sind mit DAPI blau markiert; Längenmaßstab = 20 µm). (E) Western Blot Analyse von fünf infanten Keratinozytenlinien, die in 6 mM bzw. 25 mM Glucose kultiviert wurden. (F) Relative Expression von Cx43 und Fibronectin in infanten Keratinozyten bezogen auf die Tubulin-Expression, die in 6 mM bzw. 25 mM Glucose kultiviert wurden (n = 5; *: p ≤ 0.05; **: p ≤ 0.01 Mittelwerte ± SEM). (G – J) Immunzytologische Lokalisation von Cx43 (G, H) und Fibronectin (I, J) in mit 6 mM (G, I) bzw. 25 mM (H, J) Glucose inkubierten infanten Fibroblasten (Längenmaßstab = 20 µm). (K) Western Blot Analyse von fünf infanten Fibroblastenlinien, die in 6 mM bzw. 25 mM Glucose kultiviert wurden. (L) Relative Expression von Cx43 und Fibronectin in infanten Fibroblasten bezogen auf die Tubulin-Expression, die in 6 mM bzw. 25 mM Glucose kultiviert wurden (n = 5; *: p ≤ 0.05; Mittelwerte ± SEM).</p>	70
<p>4.15 Effekte einer diabetischen Umgebung auf die Migration von Keratinozyten und Fibroblasten. (A, B) Migration nach <i>Scratch</i>-Verwundung in infanten Keratinozyten- (A) und Fibroblastenkulturen (B) in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Kulturmedium (n = 14; *: p ≤ 0.05 (Unterschied zwischen 6mM und 25mM); Mittelwerte ± SEM). (C, D) Migration nach <i>Scratch</i>-Verwundung in adulten diabetischen (diab) und nicht-diabetischen (ndiab) Keratinozyten- (C) und Fibroblastenkulturen (D; n = 6; *: p ≤ 0.05; Mittelwerte ± SEM).</p>	72
<p>4.16 Effekt von Gap27 auf Zellen unter „diabetischen“ Bedingungen. Migration nach <i>Scratch</i>-Verwundung in proliferationsinhibierten humanen infanten Keratinozyten- (A) und Fibroblastenkulturen (B), die in Anwesenheit von 25 mM Glucose mit 60 µM Gap27 behandelt wurden (n = 6; *: p ≤ 0.05; Mittelwerte ± SEM).</p>	73
<p>4.17 Vergleich der Effizienz verschiedener Cx43-Antisense-Sequenzen. (A) Beispielhafte Western Blot Analyse von humanen infanten Keratinozyten, die mit 20 µM Cx43-spezifischen <i>Antisense</i>-Oligonukleotiden bzw. der <i>Sense</i>-Kontrolle behandelt wurden. (B) Cx43-Proteinlevel in mit Cx43as-ODNs behandelten Keratinozyten normalisiert auf das jeweilige Tubulin-Level (n = 4; *: p ≤ 0.05; Mittelwerte ± SEM). Bei der hier dargestellten Kontrolle handelt es sich um die DB1-ms-<i>Sense</i>-Sequenz, die stellvertretend für alle <i>Sense</i>-Sequenzen aufgeführt ist.</p>	74
<p>4.18 Effekt von Cx43-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden auf die Wundheilung in ex vivo Wundheilungsmodellen. Vergleich des Wundheilungsfortschritts in porcinen WHM nach Behandlung mit 20 µM <i>Antisense</i>-Oligonukleotiden gelöst in Pluronic F-127 Gel (A) bzw. in DEPC-Wasser (B) bezogen auf die <i>Sense</i>-Kontrolle (n = 6; **: p ≤ 0.01; Mittelwerte ± SEM).</p>	75

4.19	<p>Effekt von Cx43as-ODNs auf die Expression von Connexinen im porcinen <i>ex vivo</i> WHM. Immunhistologischer Nachweis von Cx43 (rot) und Cx26 (grün) und deren Co-Lokalisation (gelb) in porcinen WHM (Überlagerung mit Phasenkontrast), die mit 20 μM Cx43-<i>Sense</i>-ODNs (A, C, E, G, I, K) bzw. 20 μM Cx43-<i>Antisense</i>ODNs (B, D, F, H, J, L) inkubiert wurden (Längenmaßstab = 50 μm). Gezeigt sind die Bereiche des Wundrandes (weiße Pfeile kennzeichnen den ursprünglichen Wundrand) zu den Zeitpunkten 2 Stunden (A, B), 6 Stunden (C, D), 18 Stunden (E, F) und 24 Stunden (G, H) nach Verwundung sowie die dem Wundrand nahe Epidermis (NE) zum Zeitpunkt 24 Stunden (I, J) und die regenerierende Epidermis (RE) zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Verwundung (K, L).</p>	77
4.20	<p>Effekt von Cx43-spezifischen <i>Antisense</i>-Oligonukleotiden auf die Migration infanter Zellkulturen. Breite der <i>Scratch</i>-Wunde in proliferationsinhibierten humanen infanten Keratinozyten- (A) und Fibroblastenkulturen (B), die mit 20 μM Cx43as-ODNs oder der <i>Sense</i>-Kontrolle behandelt wurden, zu den Zeitpunkten 0, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach Verwundung (n = 6; *: p \leq 0.05, **: p \leq 0.01; Mittelwerte \pm SEM).</p>	78
4.21	<p>Effekt von Cx43as-ODNs unter hyperglycämischen Bedingungen. Migration nach <i>Scratch</i>-Verwundung in proliferationsinhibierten humanen infanten Keratinozyten- (A) und Fibroblastenkulturen (B), die in Anwesenheit von 25 mM Glucose mit 20 μM Cx43as-ODNs behandelt wurden (n = 6; *: p \leq 0.05; Mittelwerte \pm SEM).</p>	79

Tabellenverzeichnis

2.1	Sequenzen der verwendeten DNA-Oligonukleotide	24
2.2	Übersicht über die verwendeten Primärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen für Immunfluoreszenz (IF) und Western Blot (WB).	25
2.3	Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen für Immunfluoreszenz (IF) und Western Blot (WB)	25
3.1	Zusammensetzung des Sammelgels und verschieden-prozentiger Trenngele	42

Danksagung

Diese Arbeit hätte nicht entstehen können ohne die Unterstützung, die ich von vielen Seiten erfahren habe. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

An erster Stelle danke ich Frau PD Dr. Johanna Brandner für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die engagierte Betreuung und die Möglichkeit, in ihrem Labor das selbstständig wissenschaftliche Arbeiten zu erlernen. Sie stand mir in stressigen Zeiten immer mit kompetenten Ratschlägen zur Seite und konnte mich durch ihre Begeisterung für die Forschung immer wieder neu motivieren.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thorsten Burmester für die Zweitbetreuung seitens des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg.

Frau Prof. Dr. Ingrid Moll danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation im Zellbiologischen Labor der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UKE anfertigen zu können.

Ich danke Herrn PD Dr. Ralf Lobmann aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Geriatrie des Klinikums Stuttgart (früher Universitätsklinikum Magdeburg) für die Entnahme und Bereitstellung der adulten Hautbiopsien.

Allen Mitarbeitern des Zellbiologischen Labors der Klinik für Dermatologie und Venerologie danke ich für das freundschaftliche Arbeitsklima, die gute Teamarbeit, die fruchtbaren fachlichen Diskussionen und dafür, dass neben der vielen Arbeit der Spaß nicht zu kurz kam!

Den technischen AssistentInnen des Labors Pia Houdek, Ewa Wladykowski, Sabine Vidal-y-Sy und Frank Fischer danke ich für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und ihre Erfahrung, von der ich oft profitieren durfte.

An meine Mitstreiter Dr. Nina Kirschner, Claudia Bohner, Franca Fuchs, Christian Börnchen und Dr. Matthias Vockel sowie Dr. Susanne Rachow: Ihr habt mir bei so vielen Gelegenheiten sehr geholfen. Vielen Dank für Eure Freundschaft und die schöne Zeit, die wir zusammen hatten!

Zum Schluss gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, meinem Bruder André und Louise, die immer für mich da waren, auch über große Distanzen! Für Eure Liebe und Unterstützung, Euer „Mitleiden“ und die aufmunternden Worte danke ich Euch von Herzen!