

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Ingrid Moll

## **Regulation von Tight Junction Proteinen in der kutanen Wundheilung**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Janina Stephanie Lentfer  
aus Berlin

Hamburg 2012

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: **05.11.2012**

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: **Prof. Dr. J.M. Brandner**

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: **Prof. Dr. U. Schumacher**

Note: **magna cum laude**

---

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	1
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
1.1 Wundheilung .....	2
1.2 Tight Junctions und Tight Junction Proteine .....	5
1.3 Tight Junction-Proteine in der Haut.....	8
1.4 Die Zytokine TNF $\alpha$ und IL-1 $\beta$ .....	9
1.5 Connexine und das Cx-mimetische Peptid Gap27 .....	10
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	11
<b>2 MATERIAL .....</b>	<b>12</b>
2.1 Das <i>ex vivo</i> Wundheilungsmodell .....	12
2.2 Geräte .....	12
2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	13
2.4 Material Immunhistochemie .....	15
2.4.1 Primärantikörper.....	15
2.4.2 Sekundärantikörper .....	15
2.4.3 DNA-Färbung .....	16
2.4.4 Puffer und Lösungen .....	16
2.5 Peptide .....	16
2.6 Zytokine.....	16
2.7 Software .....	17
2.8 Statistische Auswertung.....	17
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>18</b>
3.1 Vorbereiten und Anlegen der porcinen Wundheilungsmodelle .....	18
3.2 Zytokinapplikation in das <i>ex vivo</i> Wundheilungsmodell .....	18
3.3 Applikation von Gap27 in das <i>ex vivo</i> Wundheilungsmodell.....	19

---

3.4	Histologische Techniken .....	19
3.4.1	Herstellung und Fixierung von Gefrierschnitten .....	19
3.4.2	HE-Färbung.....	19
3.4.3	Immunhistochemische Färbung .....	20
3.5	Auswertung der Färbungen.....	21
3.5.1	HE-Färbungen.....	21
3.5.2	Immunfluoreszenzfärbungen.....	21
3.5.2.1	Unbehandelte Modelle .....	21
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>23</b>
4.1	Korrelation zwischen dem Zeitpunkt nach Verwundung und dem Wundheilungsfortschritt.....	23
4.2	Beeinflussung des Wundheilungsscores durch die Behandlung der Modelle....	24
4.2.1	Modelle nach Zytokin- Applikation.....	24
4.2.2	Modelle nach Gap27-Applikation .....	24
4.3	Lokalisation von TJ-Proteinen während der Wundheilung.....	25
4.3.1	Expression von Cldn-1 während der Wundheilung .....	26
4.3.1.1	Korrelation zwischen der Cldn-1 Expression und dem Wundheilungsscore	26
4.3.1.1.1	Cldn-1 Expressionsmuster in der unbeteiligten Epidermis .....	26
4.3.1.1.2	Cldn-1 Expressionsmuster am Wundrand .....	27
4.3.1.1.3	Cldn-1 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis .....	28
4.3.1.2	Korrelation zwischen der Cldn-1 Expression und verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung .....	31
4.3.1.2.1	Cldn-1 Expressionsmuster in der unbeteiligten Epidermis .....	31
4.3.1.2.2	Cldn-1 Expressionsmuster am Wundrand .....	31
4.3.1.2.3	Cldn-1 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis .....	32
4.3.1.3	Cldn-1 Expression 48 h nach Zugabe von Zytokinen und Gap27.....	34
4.3.1.3.1	Unbeteiligte Epidermis .....	34
4.3.1.4	Wundrand.....	35
4.3.1.5	Regenerierende Epidermis .....	37
4.3.2	Expression von Cldn-4 während der Wundheilung .....	40
4.3.2.1	Korrelation zwischen der Cldn-4 Expression und dem Wundheilungsscore	40
4.3.2.1.1	Cldn-4 Expressionsmuster in der unbeteiligten Epidermis .....	40
4.3.2.1.2	Cldn-4 Expressionsmuster am Wundrand .....	41
4.3.2.1.3	Cldn-4 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis .....	43

4.3.2.2	Korrelation zwischen der Cldn-4 Expression und verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung .....	45
4.3.2.2.1	Cldn-4 Expressionsmuster in der unbeteiligte Epidermis .....	45
4.3.2.2.2	Cldn-4 Expressionsmuster am Wundrand .....	46
4.3.2.2.3	Cldn-4 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis .....	46
4.3.2.3	Cldn-4 Expression 48 h nach der Zugabe von Zytokinen und Gap27 .....	49
4.3.2.3.1	Unbeteiligten Epidermis .....	49
4.3.2.3.2	Wundrand .....	50
4.3.2.3.3	Regenerierende Epidermis .....	52
4.3.3	Korrelation zwischen der Ocln Expression und Wundheilungsscore .....	55
4.3.3.1	Ocln Expressionsmuster in der unbeteiligte Epidermis .....	55
4.3.3.2	Ocln Expressionsmuster am Wundrand .....	56
4.3.3.3	Ocln Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis .....	58
4.3.3.2	Korrelation zwischen der Ocln Expression und verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung .....	59
4.3.3.2.1	Ocln Expressionsmuster in der unbeteiligte Epidermis .....	59
4.3.3.2.2	Ocln Expressionsmuster am Wundrand .....	60
4.3.3.2.3	Ocln Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis .....	61
4.3.3.3	Ocln Expression 48 h nach der Zugabe von Zytokinen und Gap27 .....	63
4.3.3.3.1	Unbeteiligten Epidermis .....	63
4.3.3.3.2	Wundrand .....	64
4.3.3.3.3	Regenerierende Epidermis .....	66
4.3.4	Expression von ZO-1 während der Wundheilung .....	69
4.3.4.1	Korrelation zwischen der ZO-1 Expression und dem Wundheilungsscore ..	69
4.3.4.1.1	ZO-1 Expressionsmuster in der unbeteiligten Epidermis .....	69
4.3.4.1.2	ZO-1 Expressionsmuster am Wundrand .....	70
4.3.4.1.3	ZO-1 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis .....	71
4.3.4.2	Korrelation zwischen der ZO-1 Expression und verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung .....	73
4.3.4.2.1	ZO-1 Expressionsmuster in der unbeteiligten Epidermis .....	73
4.3.4.2.2	ZO-1 Expressionsmuster am Wundrand .....	73
4.3.4.2.3	ZO-1 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis .....	74
4.3.4.3	ZO-1 Expression 48 h nach der Zugabe von Zytokinen und Gap27 .....	76
4.3.4.3.1	Unbeteiligte Epidermis .....	76
4.3.4.3.2	Wundrand .....	77
4.3.4.3.3	Regenerierende Epidermis .....	79
5	DISKUSSION .....	83

---

5.1	Dynamik der Veränderung von TJ-Proteinen .....	83
5.2	TJ-Proteine als „Rettungssystem“ der Hautbarriere.....	86
5.3	Beeinflussung der Lokalisation von TJ-Proteinen durch Zytokine .....	87
5.4	Gap27 beeinflusst die Lokalisation von TJ-Proteinen. ....	90
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	92
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	94
8	LEBENS LAUF .....	99
9	DANKSAGUNG .....	100
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	101

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. dest	Aqua destillatum
BT	Block Triton
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
Cldn-1	Claudin 1
Cldn-4	Claudin 4
d	„day“, engl. für Tag
DAPI	(4',6'-Diamidino-2'-phenylindol-dihydrochlorid)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GJ	Gap Junctions
h	„hour“, engl. für Stunde
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
NGS	„Normal Goat Serum“, engl. für normales Ziegen Serum
Ocln	Occludin
o.g.	oben genannt
PBS	“Phosphate buffered saline”, phosphatgepufferte Salzlösung
Reg.	Regenerierende
RT	Raumtemperatur
TER	Transepithelialer Widerstand (transepithelial electrical resistance)
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TJ(s)	Tight Junction(s)
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
WH	Wundheilung
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZO-1	Zonula Occludens Protein 1
Cx43	Connexin 43

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Wundheilung

Bei der kutanen Wundheilung geht es um den vollständigen Verschluss dermalen und epidermalen Hautschichten und eine adäquate Narbenbildung. Zahlreiche Mediatoren, Blutzellen, die extrazelluläre Matrix und diverse Zellen sind an diesem dynamischen und interaktiven Prozess beteiligt. Klassischerweise teilt man die Wundheilung in drei Phasen ein. Sie sind jeweils sehr komplex und überlappen zeitlich. Zur Übersicht siehe (Singer und Clark 1999).

1. Inflammationsphase
2. Granulations- und Regenerierungsphase
3. Remodellierungsphase

In der ersten Phase, der Inflammationsphase (siehe Abbildung 1.1.1.A), ist die Hämostase der erste entscheidende Aspekt. Es entsteht ein Blutgerinnsel aus Thrombozyten; Fibrin und Fibronectin quervernetzen und unterstützen diesen Prozess. Hierdurch wird weiterer Blutverlust vermieden und die Wunde vor pathogenen Keimen geschützt. Vasoaktive Stoffe, die auch von Thrombozyten freigesetzt werden, sorgen für eine Vasodilatation, was das Einwandern von Entzündungszellen ermöglicht (Clark 1996). Neutrophile Granulozyten erfüllen eine reinigende Wirkung, in dem sie Zelltrümmer und Bakterien phagozytieren. Der platelet-derived growth factor, welcher ebenfalls von Thrombozyten ausgeschüttet wird, aktiviert Makrophagen und Fibroblasten und unterstützt somit die Heilung (Heldin und Westermark 1996). Makrophagen und Monozyten produzieren an dieser Stelle viele weitere wichtige Mediatoren wie z. B. TGF- $\beta$ , IL-1  $\alpha$  und  $\beta$ , CSF-1, TNF- $\alpha$  und IGF I (Rappolee et al. 1988).

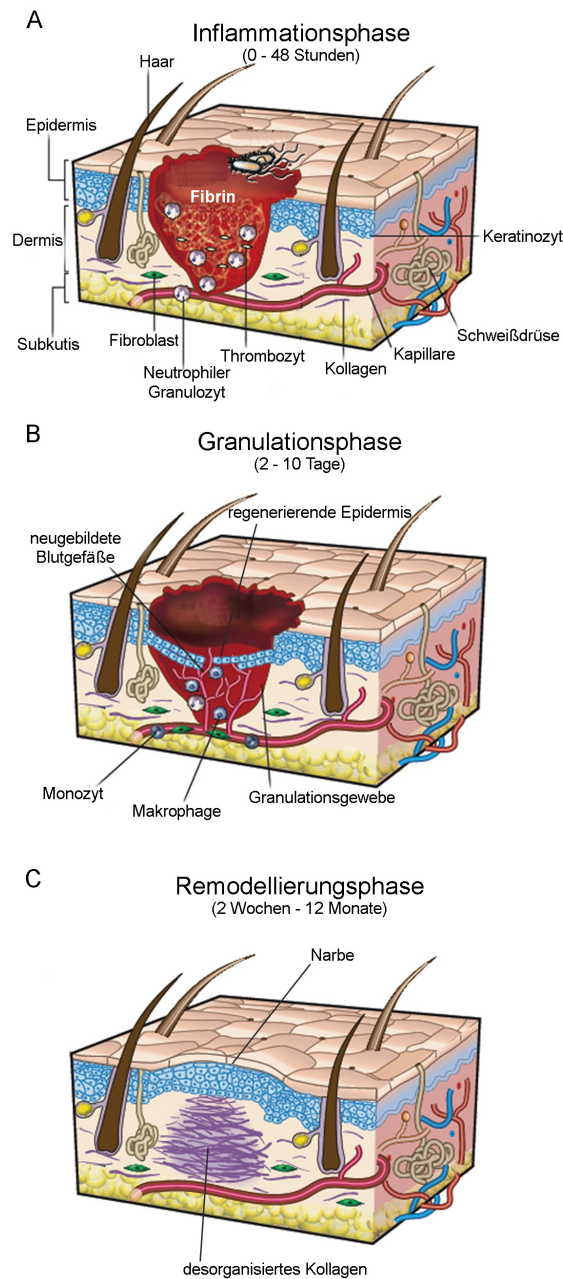
In der Granulations- und Regenerierungsphase (siehe Abbildung 1.1.1.B) migrieren Makrophagen in die Wunde und phagozytieren das soeben gebildete Blutgerinnsel. Aktiviert durch Mediatoren beginnen Fibroblasten eine vorübergehende extrazelluläre Matrix zu schaffen. Des Weiteren sind die Makrophagen, mit Hilfe ihres Integrinrezeptors, in der Lage spezifische Proteine der extrazellulären Matrix zu binden, welches die Phagozytose von Mikroorganismen der extrazellulären Matrix aktiviert (Brown 1995). Das sogenannte Granulationsgewebe mit neuen Blutgefäßen, Fibroblasten, Entzündungszellen und einer extrazellulären Matrix mit Bestandteilen wie Fibrin und Fibronectin, Kollagen, und Hyaluronsäure entsteht. Das neue Kollagen wird von Fibroblasten synthetisiert. Einige von



ihnen differenzieren zu Myofibroblasten und sorgen vor allem in Nagetieren durch Kontraktion zum Aneinanderführen der Wundränder.

Bereits zeitlich überlappend beginnt die Wiederherstellung epidermaler Bestandteile. Basale Keratinozyten der Wundränder und dermalen Hautanhangsgebilde, wie z. B. Haarfollikeln, stellen die Basis für die Reepithelialisation dar. Durch das Lösen von interzellulären Desmosomen und die Umstrukturierung von zytoplasmatischen Aktinfilamenten, wird eine Zellbewegung ermöglicht (Saurat et al. 1984, Goliger und Paul 1995). Die Keratinozyten migrieren zunächst lateral in Richtung Wundmitte. Anschließend differenzieren sie sich und sind somit in der Lage eine neue Barriere aufzubauen.

Die letzte Phase ist die Remodellierungsphase (siehe Abbildung 1.1.1.C): Die Kollagenproduktion und der Kollagenabbau werden ausgeglichen. Das Maß des Abbaus wird durch die Menge an Kollagenasen, welche durch epidermale Zellen gebildet wird, gesteuert (Pilcher et al. 1997). Das stabilere Kollagen Typ I ersetzt Kollagen Typ III und wird quervernetzt. Durch die neue Gewebsorganisation kommt es häufig zur Narbenbildung.

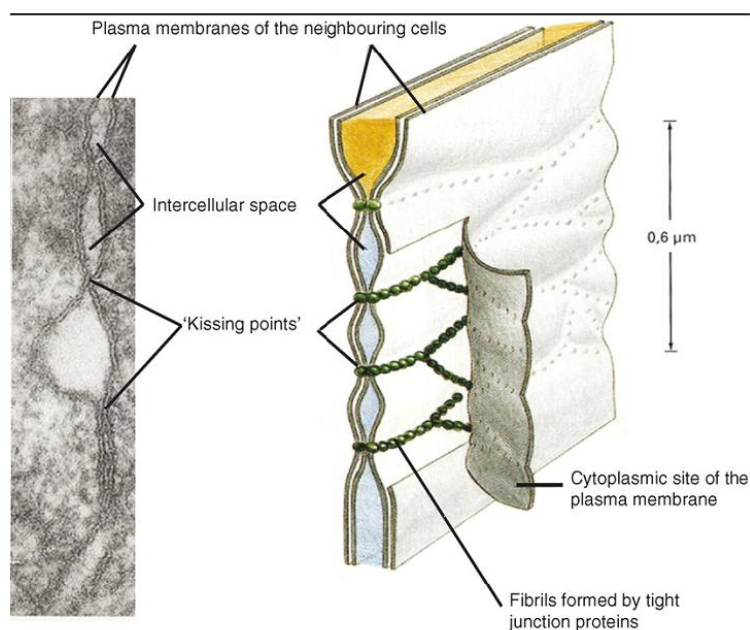


**Abbildung 1.1.1 Ablauf der kutanen Wundheilung** Dargestellt sind die drei klassischen Phasen der Wundheilung, die sich zeitlich überlappen: **A** Inflammationsphase, **B** Granulations- und Regenerationsphase, **C** Remodellierungsphase (modifiziert nach (Gurtner et al. 2008).)

Wenn der Gewebzusammenhang, z. B. in Form einer Verletzung der Haut, getrennt ist, ist der komplexe Prozess der Wundheilung elementar um viele wichtige Funktionen der Haut wiederherzustellen: Wasser- und Elektrolytverluste müssen minimal gering gehalten und das Eindringen von pathogenen Keimen verhindert werden. Diverse Faktoren können zu einer Verzögerung dieses Prozesses führen. Systemische Stoffwechselerkrankungen, wie z. B. Diabetes mellitus oder Mikrozirkulationsstörung, wie z. B. die chronisch venöse Insuffizienz können Ursache für Komplikationen bei der Wundheilung sein.

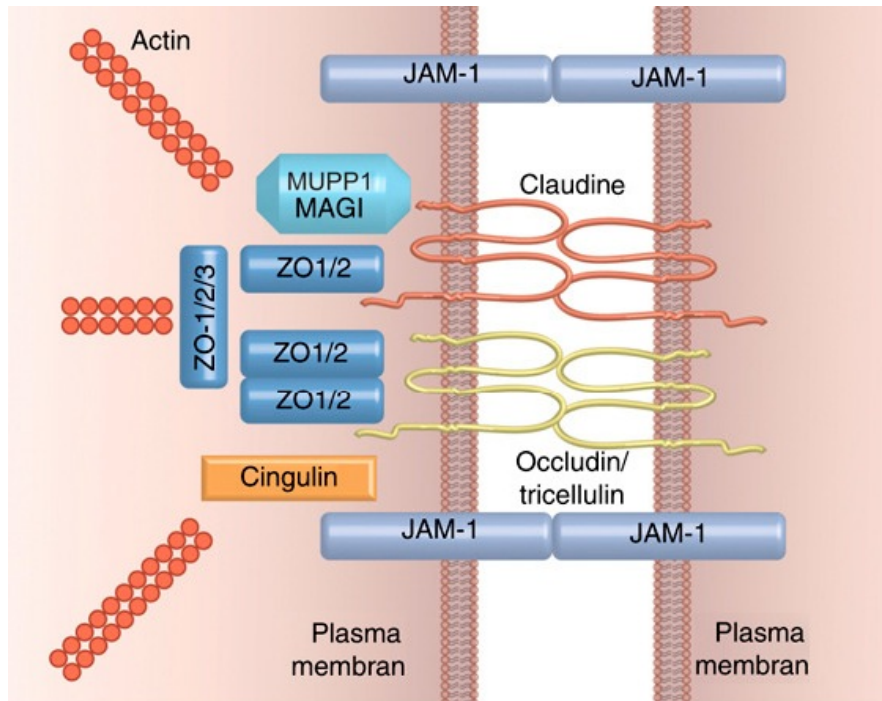
## 1.2 Tight Junctions und Tight Junction Proteine

Tight junctions, sog. Verschlusskontakte oder auch Zonulae Occludentes, sind Zell- Zell-Verbindungen, die eine gürtelförmige Kontaktzone zweier benachbarter Plasmamembranen darstellen. Diese Zell- Zellkontakte liegen so nah bei einander, dass kein intermembranöses Material vorhanden ist; sie werden deshalb auch *kissing points* oder *sites of fusion* genannt. In der Gefrierbruchmethode erscheinen TJs als ein Netzwerk intermembranöser Fibrillen (Staehelein 1974). Sie sind dort der oberste Teil der apikalen Verschlusskontakte und trennen die apikale von der basolateralen Membran. Diese Trennung ermöglicht jeder Zelloberfläche verschiedenen Aufgaben zu erfüllen. Zur Übersicht siehe (Niessen 2007).



**Abbildung 1.2.1** Darstellung der TJ-Struktur in einfachen Zylinderepithelien. Links: Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme der typischen *kissing points*. Rechts: Schematische Zeichnung von TJs mit TJ-Strängen, die aus TJ-Proteinen bestehen. (modifiziert nach (Alberts et al. 1995))

Zur Beschreibung des molekularen Aufbaus von TJs, kann man festhalten, dass sie aus Transmembran- und Plaqueproteinen bestehen (Siehe Abbildung 1.2.2). Insgesamt bestehen TJs aus mindestens 40 verschiedenen Proteinen. Die Transmembranproteine Occludin, Tricellulin, Claudine und JAMs sind in die Plasmamembran beider Zellen eingebettet und sind jeweils über ihre extrazellulären Domänen miteinander verbunden. Occludin und Claudin verfügen jeweils über 2 extrazelluläre Domänen, wohingegen JAM- 1 nur eine hat (Schneeberger und Lynch 2004, Furuse und Tsukita 2006). Das Plaqueprotein ZO-1 ist mit dem Aktinskelett verankert. Siehe hierzu Abbildung 1.2.2.



**Abbildung 1.2.2** Schematische Darstellung der einzelnen TJ-Bestandteile. ZO-1/2 spielen bei der Zusammenlagerung von Claudinen und Occludinen und folglich für die Bildung von TJ-Strängen eine Rolle. Cingulin und die ZO- Proteine können sich direkt mit dem Aktinzytoskelett verbinden (Niessen 2007).

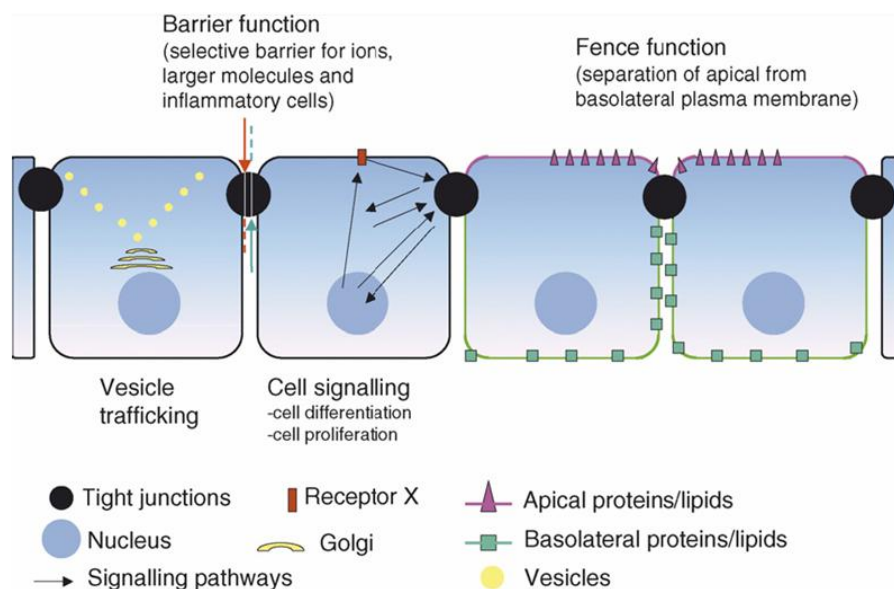
Das erste Transmembranprotein der TJs, das entdeckt wurde, war Occludin (Furuse et al. 1993). Seine genaue Funktion ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Epitheliale Gewebe mit einem Occludin *knockdown* zeigen einen strukturellen TJ-Aufbau und eine Barrierefunktion. Wird Occludin allerdings überexprimiert, steigt der transepitheliale Widerstand (TER), welcher ein Maß für die TJ-Dichtigkeit darstellt (Brandner et al. 2008). Des Weiteren können in einer Occludin defizienten Maus Wachstumsretardierung und viele weitere phänotypische Auswirkungen beobachtet werden (Saitou et al. 2000). Da Occludin in vielen Signalprozessen beteiligt ist, scheint seine Hauptaufgabe die Regulation von TJ-Komponenten zu sein.

Die Claudinfamilie besteht aus mindestens 24 Mitgliedern und spielt eine zentrale Rolle im strukturellen Aufbau von TJs. Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass experimentelle Veränderungen in der Claudinexpression einen direkten Einfluss auf die Selektivität des parazellulären Ionentransportes und die Größenselektivität haben (VanItallie et al. 2001).

Bislang konnte keine direkte Interaktion zwischen Occludinen, Claudinen und JAMs beobachtet werden. Hieraus schließt man, dass es Zusammenlagerungsproteine geben muss. Die sog. *zonula occludens proteins*, also ZO- Proteine, sind ein wichtiger Bestandteil dieser Proteingruppe. Zuerst wurden sie 1986 von Stevenson und Mitarbeitern entdeckt. Sie gehören zu der *membrane-associated guanylate kinase homologues* Familie und sind durch drei N- terminale PDZ, einer SH3 und einer GUK Domäne gekennzeichnet. Mittels ihrer PDZ

Domäne können die ZO Proteine direkt mit Occludinen und Claudinen interagieren. Der C-Terminus ist in der Lage sich mit Aktin zu verbinden und so einen direkten Kontakt zum Zytoskelett aufzubauen (Schneeberger und Lynch 2004). Neuere Untersuchungen zeigen, dass ZO-1 oder ZO-2 ausschlaggebend bei der Zusammenlagerung von Claudinen sind (Umeda et al. 2006).

TJs spielen für die Aktivierung und Aufrechterhaltung der Adhäsion in vielen verschiedenen Geweben und Zellpopulationen eine entscheidende Rolle (Irie et al. 2004, Gumbiner 2005). Sie ermöglichen Epithelien die Eigenschaft der Semipermeabilität indem sie eine größen- und ionenspezifische parazelluläre Barriere aufbauen. Diese Eigenschaft variiert je nach molekularer Zusammensetzung der TJ-Proteine (Anderson et al. 2004). TJs bilden die Grundlage für den gerichteten Transport von Wasser, Ionen und anderen gelösten Stoffen. Des Weiteren wird das Verschieben von apikalen und basolateralen Zellmembranbestandteilen, durch die sog. „fence function“, verhindert. Auch wenn die Ultrastruktur der TJs mikroskopisch eher auf einen starren Aufbau hindeutet, ist heute bekannt, dass sie äußerst dynamische Strukturen sind. Neueren Erkenntnissen nach sind TJs auch an zellulären Signalprozessen beteiligt. Ausserdem fungieren sie als Andockstelle für den Vesikeltransport (Nelson 2003) und sind an der Regulation von Zelldifferenzierung und Zellproliferation beteiligt (Matter und Balda 2003, Schneeberger und Lynch 2004, Aijaz et al. 2006).



**Abbildung 1.2.3** Schematische Darstellung von TJ-Funktionen in Zylinderepithelzellen (Brandner et al. 2008).

TJ Zusammensetzung und Funktion werden auf mehreren Ebenen gesteuert: Transkriptionseinflüsse, Endo- und Exozytose, Zytoskelettbewegung, proteolytische Spaltung oder Phosphorylierung.

### 1.3 Tight Junction-Proteine in der Haut

Die Epidermis dient dem Organismus als wichtige Barriere zum Schutz vor der Außenwelt und verhindert Wasser- und Elektrolytverlust. Dass TJs eine entscheidende Rolle in der (murinen) Hautphysiologie, und -pathologie spielen, konnte in der Vergangenheit an vielen *knockdown* Experimenten an Mäusen gezeigt werden. Zur Übersicht siehe (Brandner et al. 2006, Brandner 2009). Obwohl die epidermalen Zellen nicht die klassische Polarisierung von apikal und basolateral zeigen, sieht man auch in diesem Gewebe eine Trennung von interzellulären Komponenten, Differenzierungsmarkern und Polaritätsproteinen. Da die Epidermis ein sich ständig regenerierendes Gewebe ist, kann man davon ausgehen, dass sich auch Zell-Zell- Verbindungen ständig neu ordnen. In dem Prozess der Neuordnung dürfen aber haftende Eigenschaften und Barrierefunktion nicht verloren gehen.

Die Barrierefunktion der Säugetierhaut ist ein sehr komplexes System, welches sich aus verschiedensten Komponenten, wie interzellulären Lipiden, Keratinozyten, antimikrobiellen Peptiden und interzellulären Verbindungen, zusammensetzt (Brandner 2010). Das Str. corneum, als oberste Hautschicht, galt bislang als die entscheidende Barriere der Epidermis zur Außenwelt. Es schützt vor Schäden und Wasserverlust (Elias 1983). Deshalb wurde angenommen, dass TJs keine Rolle in der epidermalen Barriere spielen, obwohl TJ-Komponenten in epidermalen Schichten exprimiert werden (Morita et al. 1998, Pummi et al. 2001, Brandner et al. 2002). Immunhistochemisch wurde Cldn-1 in der interfollikulären Epidermis in allen lebenden Schichten der Epidermis gefunden, Occludin nur im Str. granulosum, und ZO-1 und Cldn-4 in vielen suprabasalen Schichten (Brandner et al. 2006) Im Str. granulosum kolokalisieren all diese TJ-Proteine und bilden funktionelle TJs.

Ein entscheidender Schritt zur Aufklärung der Bedeutung von TJs für die Hautbarriere gelang, als Furuse und Mitarbeiter 2002 an einer Cldn-1 defizienten Maus einen starken Wasserverlust und den darauffolgenden Tod am ersten Lebenstag zeigten. Ein genaueres Betrachten des Str. granulosum hat anschließend auf eine Barriere durch TJs hingewiesen (Furuse et al. 2002). 2010 konnte dann durch Kirschner und Kollegen endgültig gezeigt werden, dass TJs auch eine Barriere in der humanen Epidermis bilden. Das Str. corneum und TJs scheinen also beide an der epidermalen Barriere beteiligt zu sein. Man könnte annehmen, dass TJs und TJ-Proteine eine Art „Rettungssystem“ der Hautbarriere darstellen: Wenn das Str. corneum geschädigt oder nicht vorhanden ist, dann greifen TJs (Brandner et al. 2006). In den letzten Jahren konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass einzelne TJ-

Proteine eine Rolle bei der Keratinozyten-Differenzierung und Proliferation spielen (Kirschner et al. 2011), (De Benedetto et al. 2011), Kirschner et al., in press).

#### 1.4 Die Zytokine TNF $\alpha$ und IL-1 $\beta$

Zytokine sind kleine Polypeptide, die mit spezifischen Rezeptoren interagieren. Sie werden von Zellen autonom oder als Antwort auf exogene Stimulation ausgeschüttet. Allgemein spielen Zytokine in immunologischen und entzündlichen Prozessen eine wichtige Vermittlungsrolle. Es gibt zahlreiche verschiedene Zytokine, wie z. B. die Interleukine, Interferone oder den Tumornekrosefaktor (Kupper 1990a). Drei Zytokine scheinen eine besondere Rolle bei der Induktion ihrer eigenen Genexpression zu haben: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ . Sie sind ebenfalls in der Lage die Genexpression vieler anderer sekundärer Zytokine zu induzieren, die wiederum chemotaktische und leukozytenaktivierende Funktionen hervorrufen können (Kupper 1990b).

In dieser Arbeit interessieren die Zytokine auf der einen Seite in Hinblick auf die Interaktion mit TJs und auf der anderen Seite aufgrund der Beeinflussung der Wundheilung.

Es gibt viele Erkrankungen, bei denen Zytokine zu einer Beeinflussung von TJ-Proteinen und damit zu einer veränderten parazellulären Permeabilität führen: chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Schulzke et al. 2009), Atemwegsentzündungen bei Asthma (Holgate 2007) oder auch Mukoviszidose (Coyne et al. 2002) sind nur einige Beispiele. Zytokinvermittelte Störungen der TJ-Funktion sorgen für eine erhöhte parazelluläre Permeabilität und erhöhen die Exposition gegenüber Antigenen in Geweben, wie z. B. dem Verdauungs- oder Atemtrakt (Capaldo und Nusrat 2009).

Aber auch in der Keratinocyten haben Zytokine einen Einfluss auf TJs. Die Applikation von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führt in Keratinocyten während der TJ-Bildungsphase erst zu einer Erhöhung des TER, dann zu einer Erniedrigung. In Keratinocyten, die bereits über fertig ausgebildete TJs verfügen, führt TNF $\alpha$  zu einer Steigerung des TERs (Kirschner et al., 2009). Interessanterweise ist dies im Gegensatz zu einfachen Zylinderepithelien wo ein Verlust der TJ-Funktionalität, beobachtet wird. Dieser Einfluss der Cytokine könnte eine Rolle bei den TJ-Veränderungen in Psoriasis vulgaris spielen (Kirschner et al., 2009)

Gewebsverletzungen bedingen unmittelbar den Beginn einer Entzündung (siehe hierzu auch Kapitel 1.1 und zur Übersicht (Hart 2002)). Unter anderem TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind dabei wichtige Zytokine. Unter normalen Wundbedingungen steigt der Spiegel dieser Zytokine an, um eine adäquate Entzündungsreaktion in der Wunde hervorzurufen. Schreitet aber die Heilung fort, fällt auch der Spiegel dieser Zytokine. Eine chronische Wunde ist durch eine verstärkte Anwesenheit von Leukozyten, vornehmlich Neutrophile, gekennzeichnet, die eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen ausschütten. Diese wiederum sorgen für weitere Entzündungsaktivität in der Wunde (Fahey et al. 1990). Die beobachteten erhöhten

Level scheinen also eine Schlüsselrolle bei der verzögerten Heilung chronischer Wunden zu spielen.

Um sich diese Erkenntnis zu Nutze zu machen, werden deshalb in dieser Arbeit die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zur Simulation einer chronischen Wunde und der damit verbundenen verzögerten Wundheilung eingesetzt.

### 1.5 Connexine und das Cx-mimetische Peptid Gap27

Connexine sind die Bestandteile der Gap Junctions (GJs). Sechs Connexine (Cx) bilden ein Connexon (Halbkanal) und zwei Connexone benachbarter Zellen bilden einen vollständigen Kanal. Connexone und GJ-Kanäle können aus einem oder verschiedenen Typen von Connexinen aufgebaut sein. Gap Junction-Kanäle ermöglichen den Austausch von kleinen Molekülen zwischen Zellen. Zur Übersicht siehe (Pollok 2010). Ein Beispiel für die Funktion von GJs im Organismus ist die elektrische Weiterleitung von Potentialen zwischen Kardiomyozyten. Beim Menschen sind derzeit 21 verschiedene Connexine bekannt und das Cx43 ist das am weitesten verbreitete.

1990 konnte durch Larson und Mitarbeiter gezeigt werden, dass die Synchronisation von Zellen in der Wundheilung durch die Kommunikation über Gap Junctions abläuft. Dies geht einher mit Veränderungen der Cx43 Expression in der Epidermis, wobei es in der initialen Phase der Wundheilung an den Wundrändern herunterreguliert wird. Diese Herunterregulation ist entscheidend für den richtigen Ablauf der Wundheilung bei Nagern (Goliger und Paul 1995). Tatsächlich zeigen Cx43-defiziente Mäuse eine beschleunigte Wundheilung. Brandner und Mitarbeiter konnten 2004 an *ex vivo* Modellen zeigen, dass Cx43 ebenso in der humanen Wundheilung eine bedeutende 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.

Es konnte beobachtet werden, dass chronische Wundränder eine starke Expression von Cx43 zeigen. Diese Erkenntnis spricht dafür, dass die Herunterregulation von Cx43 am epidermalen Wundrand und die damit einhergehende reduzierte Kommunikation zwischen den Zellen ein zentraler Schritt in der humanen Wundheilung ist. Im Umkehrschluss kann also durch die Inhibition von Cx43 eine beschleunigte Wundheilung erreicht werden. Eine Möglichkeit der Inhibition von Cx43 ist der Einsatz des Cx-mimetischen Peptids Gap27, welches speziell zur spezifischen Inhibition der Kommunikation durch Gap Junctions entwickelt worden ist. Es handelt sich um ein kurzes synthetisches Peptid, welches *in vitro* spezifisch und reversibel die Cx-vermittelte Kommunikation blockiert (Evans und Boitano 2001). Pollok und Kollegen zeigten 2011, dass Gap27 die Wundheilung im *ex vivo* Modell beschleunigen kann.



Da in dieser Arbeit die Korrelation zwischen TJ-Expression und Wundheilungsgeschwindigkeit Ziel meiner Versuche war, wurde Gap27 gezielt genutzt um die Wundheilung im *ex vivo* Wundheilungsmodell zu beschleunigen.

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

TJs spielen in der Physiologie und Pathologie der Haut eine Rolle. Spätestens als Furuse und Mitarbeiter 2002 den Tod von Cldn-1 defizienten Mäusen durch starken Wasserverlust zeigten, war die Bedeutung der TJ-Proteine in der Haut offensichtlich. Kirschner und Kollegen konnten zeigen, dass es bei der Plaque Psoriasis zu einer Veränderung der Lokalisation und Expression von TJ-Proteinen (Kirschner et al. 2009) und einer veränderten Lokalisation der TJ-Barriere (Kirschner et al., 2010) kommt und dass dabei IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  eine Rolle spielen könnten. Auch bei Verwundung, ähnlich einer Erkrankung der Haut, wird die Physiologie der Haut gestört. Bisher gibt es nur wenig Informationen über das Verhalten von TJ-Proteinen während der Wundheilung. Brandner et al., (Amagai et al.) konnten an humanen *ex-vivo* Wundheilungsmodellen zeigen, dass man eine Expression von Ocln, ZO-1 und Cldn-1 bereits 18 h nach Verwundung in der regenerierenden Epidermis beobachtet und dass die Expression der Expression von Differenzierungsmarkern vorausgeht. Dies wurde im Wesentlichen von Malminen et al 2003 an 4 humanen Saugblasenwunden bestätigt. Eine systematische Untersuchung, vor allem auch des Wundrands und eine Korrelation zum Wundheilungsfortschritt fehlte. Die Dynamik einzelner TJ-Proteine in einer Wunde zu verstehen, war Gegenstand dieser Arbeit. Deshalb wurde das Vorhandensein und die Lokalisation von Cldn-1, Cldn-4, Ocln und ZO-1 zu verschiedenen Wundheilungszeitpunkten und unterschiedlichen Wundheilungsfortschritten in porcinen *ex-vivo* Modellen untersucht. Von besonderem Interesse war dabei, inwieweit man Veränderungen von TJ-Proteinen im Verlauf der Wundheilung beobachtet, und ob diese Veränderungen mit dem Zeitpunkt nach Verwundung und dem Wundheilungsfortschritt korrelieren. Um weiteres detaillierter zu betrachten, wurde die Wundheilung durch die Applikation von hohen Dosen IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  verlangsamt und durch die Applikation von Gap27 beschleunigt.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Das *ex vivo* Wundheilungsmodell

Für die Wundheilungsversuche diente das *ex vivo* Wundheilungsmodell (WHM; Patentnummer DE10317400), welches folgendermaßen gewonnen wurde:

Aus den Plicae von Schweineohren, die von der Schlachtereier Hoose (22941 Hammoor) zur Verfügung gestellt wurden, wurden Hautbiopsien entnommen, in die dann anschließend eine Wunde gesetzt wurde. Die verwendeten Ohren entstammten Hausschweinen der Rasse *Sus scrofa domestica*, eine Kreuzung zwischen Yorkshireschwein und deutschem Edelschwein. Bei Schlachtung sind sie etwa 6 Monate alt. Sie sind weiblich oder im Alter von 6 Wochen kastriert worden. Die Ohren wurden sofort nach der Schlachtung per Kurier ins Labor transportiert und dort weiterverarbeitet. An folgenden Wundmodellen wurden die Versuche durchgeführt: 521- 525, 707- 710, 716- 719, 725- 728, 735- 736, 813- 814, 930, 959- 961, 1052- 1054.

### 2.2 Geräte

- Biopsy Punch: Durchmesser 6 und 3 mm (Stiefel Laboratorium AG; Offenbach)
- Brutschrank: Haereus Thermo BBD 6220 (Haereus Holding GmbH Hanau)
- Digitalkamera: Camedia C-5050 (Olympus Deutschland GmbH, Heidelberg)
- Kryostat: Leica CM 3050 (Leica Camera AG, Solms)
- Mikroskope: Leica DM-LS, Leica Mikroskope & Systeme GmbH Wetzlar, Immunfluoreszenzmikroskop (Zeiss GmbH, Jena) mit CCD-Kamera Hamamatsu C4742-95 (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching), Software: Openlab 2.0.9 (Imkprovision, Coventry, UK)
- Pipetten: Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg)
- pH- Meter: Knick 766 Calimetric (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin)
- Sterilwerkbank: Hera Safe 12, (Hareaus Holding GmbH Hanau)

Tischzentrifuge: Heraeus Biofuge pico (Heraeus Holding GmbH,  
Hanau)

Vortexer: BENDER & HOBEIN AG (Zürich, Schweiz)

Waage: Sartorius (Sartorius AG, Goettingen)

### 2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aceton: Biesterfeld Chemikaliendistribution, (Hamburg) und Th.Geyer  
GmbH & Co KG (Renningen)

Deckgläser: 24 mal 50mm, No.1 Superior (Paul Marienfeld GmbH  
& Co. KG Lauda-Königshofen)

DMEM

Zellkulturmedium: Biochrom AG (Berlin)

DMF

(Dimethylformamid): Merck (Darmstadt)

Einbettungsmedium: Thermo SCIENTIFIC, Shandon Cryomatrix (Anatomical Pathology  
U.S.A.)

Eindeckungsmedium: Fluoromount-G Southern Biotechnology  
Associates, Inc. (Birmingham, AL, USA)

Eosin: Merck KgaA, (Darmstadt) ; 2 g in 1000 ml A. dest. lösen + 20 µl  
Eisessig

Eppendorf-Gefäße: Safe Lock Tubes 2,0, 1,5 ml, Eppendorf AG,  
(Hamburg)

Ethanol: Walter -CMP GmbH & Co. KG, (Mack et al.)

Eukitt: O. Kindler GmbH & Co, (Freiburg)

## Material

---

Fluoromount:	Southern Biotech (Eching)
Fötiales Kälberserum:	Invitrogen (Karlsruhe)
Hämalaunlösung:	Hämalaunlösung nach Mayers; Nr. 1.09249.0500; Merck KgaA (Darmstadt)
HCL- Alkohol:	25 % HCL, Nr. 30723; Riedel-de Haën (Seelze)
Hydrocortison:	Sigma (Taufkirchen)
Isopentan:	Sigma- Aldrich (Laborchemikalien GmbH, Seelze)
KCL:	Merck KgaA, (Darmstadt)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	Merck KgaA, (Darmstadt)
Kompressen:	ES 10 mal 20 (Hartmann AG, Heidenheim)
Multiwell-Platten:	Zellkulturplatte, 12 Vertiefungen, Flachbodenm mit Deckel (Becton Dickinson Labware; Franklin Lakes, NJ, USA)
NaCl:	Sigma- Aldrich (Laborchemikalien GmbH, Seelze)
Na <sub>2</sub> hPO <sub>4</sub> :	Merck KgaA (Darmstadt)
Objektträger:	Super Frost Assistent Glaswarenfels (K. Hecht KG Sondheim)
PBS, steril:	Biochrom AG (Berlin)
Penicillin/Streptomycin:	Biochrom AG (Berlin)
Petrischalen:	BD Falcon Easy Grip, Zellkulturschale (Becton Dickinson Labware; Flanklin Lakes, NJ, USA)
Petroleumbenzin:	Petroleumbenzin Siedebereich 40- 60° C (Merck KgaA, Darmstadt)

Pipettenspitzen:	eppendorf T.I.P.S. Standart 0,1-10µl, 2-200µl, 50-100µl, 5ml (Eppendorf AG, Hamburg)
Skalpel:	Surgical Disposal Scalpel (Braun aesculap AG und Co KG, Tuttlingen)
Sterilium:	Bode Chemie GmbH & Co. KG (Hamburg)
Triton:	X-100 Sigma, Chemical Co., (St. Louis, USA)
Xylol:	Mallinckrodt Baker (Deventer, Niederlande)

## 2.4 Material Immunhistochemie

### 2.4.1 Primärantikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Kaninchen anti-Claudin-1	1:150	Zymed Laboratories, San Francisco, USA (-7800)
Maus anti-Claudin-4	1:30 BT	Zymed Laboratories, San Francisco, USA (-7341)
Maus anti-Occludin	1:100 BT	Zymed Laboratories, San Francisco, USA (-1500)
Kaninchen anti-ZO-1	1:100 BT	Zymed Laboratories, San Francisco, USA (#61-7300)

Als Neaktivkontrollen wurden die entsprechenden Antikörper-Isotypen von der Firma Dako (Hamburg) bezogen.

### 2.4.2 Sekundärantikörper

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ziege anti-Maus Alexa-Flour	1 :600	Invitrogen

488 F(ab')<sub>2</sub>

Ziege anti-Kaninchen Alexa- 1:1250

Invitrogen

Flour 488 F(ab')<sub>2</sub>

### 2.4.3 DNA-Färbung

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

### 2.4.4 Puffer und Lösungen

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

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)- Gebrauchslösung (1x): 200 ml PBS-Stammlösung, 1800 ml A.dest., pH 7,3-7,5 einstellen

PBS Stammlösung (10x): 160 g NaCl+ 4g KCl+ 23.2g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O+ 4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 2 l A.dest., pH 7,3-7,5 einstellen

## 2.5 Peptide

Das verwendete Cx-mimetische Peptid, wurde von der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH (Heidelberg) synthetisiert und im lyophilisierten Zustand bezogen. Es hat die Sequenz SRPTEKTIFII und ist gegen den zweiten extrazellulären *Loop* des Cx43 Proteins gerichtet (Evans und Boitano 2001), (Oviedo-Orta et al. 2002). Zunächst wurde das Peptid in DMF gelöst um anschließend mit Hilfe von PBS in gewünschter Konzentration bei -20°C gelagert zu werden. Im porcinen *ex vivo* Wundmodell betrug die Konzentration 6 mM.

## 2.6 Zytokine

Die Zytokine TNFα und IL-1β wurden von der Firma PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA) bezogen.

## 2.7 Software

Am Fluoreszenzmikroskop wurde zur immunhistochemischen Auswertung das Programm Open Lab 2.0.9 (Fa. Improvision, Coventry, UK) verwendet. Für die digitale Datenverarbeitung diente das Programm Adobe Photoshop 7.0.1 und die Microsoft Office Programme MS Word, MS Excel und MS Powerpoint.

## 2.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm IBM SPSS Statistics 19.0 verwendet. Die statistische Auswertung bzw. Analyse der Daten erfolgte in Kooperation mit Fr. Susanne Sehner des Instituts für Biometrie und Epidemiologie des UKE. In allen Fällen wurde ein p-Wert kleiner als 0,05 als signifikant definiert.

### 3 METHODEN

#### 3.1 Vorbereiten und Anlegen der porcinen Wundheilungsmodelle

Die frisch geschlachteten Schweineohren, die im Labor eintrafen, wurden zunächst mit Hilfe von Leitungswasser grob von Schmutz und mit einer Schere von Haaren befreit. Anschließend wurden sie mit Sterilium reichlich besprüht und für mindestens 10 Minuten mit einer in Sterilium getränkter steriler Kompresse bedeckt bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ohren mit steriler Kochsalzlösung abgespült. Weitere Arbeiten fanden unter der sterilen Sicherheitswerkbank statt. Zellkulturmedium, welches mit FCS 2 %, Penicillin/Streptomycin 100 Units/ml und Hydrocortison 0,2 µl aufgestockt wurde, wurde zusammen mit einem Stück Gaze in die Löcher einer 12-Well-Platte (Falcon) gefüllt. Aus den Plicae der Ohren wurden 6mm Stanzen entnommen und auf einen sterilen Objektträger gelegt. Überflüssiges Fettgewebe und restliche Haare wurden mit einer Schere entfernt, bevor dann möglichst mittig in die 6mm Stanze eine 3mm Stanze entnommen wurde. Mit dem Skalpell wurde nur die Epidermis und ein kleiner Teile der Dermis entfernt. Die fertigen Wundheilungsmodelle wurden in jeweils ein Loch der 12-Well-Platte auf ein zurechtgeschnittenes Stück Mullbinde gesetzt und bis kurz unter den Rand der Epidermis mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Die Dermis hatte so Mediumkontakt, die Epidermis hingegen Luftkontakt. Mit dieser sog. *Air-Liquid-Interface* Kultivierung wurde eine möglichst authentische Umgebung der Haut hergestellt. Die Platte wurde in den Inkubator-Schrank, mit 37° C, 85 % Luftfeuchtigkeit und 10 % CO<sub>2</sub>, gesetzt.

Um den Wundheilungsprozess zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen, wurde nach 0 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h und nach 5 d der Versuch durch Schockgefrieren der Modelle abgestoppt. Dies geschah in zuvor in flüssigem Stickstoff vorgekühltem Isopentan. Zur Lagerung kamen die Modelle in den -80 °C-Gefrierschrank.

#### 3.2 Zytokinapplikation in das *ex vivo* Wundheilungsmodell

Um das Expressionsmuster an einer simuliert chronischen, und damit langsamer heilenden, Wunde beurteilen zu können, wurden die beiden Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  jeweils einzeln und gleichzeitig in das *ex vivo* Wundheilungsmodell appliziert.

Die Modelle wurden mit ihrem Standardmedium vorinkubiert und nach anschließender Verwundung wurden folgende Zytokine appliziert:

- IL1- $\beta$ : 100ng/ml
- TNF $\alpha$ : 100 ng/ml
- IL1- $\beta$  & TNF $\alpha$ : 100ng/ml

Der Versuch wurde nach 48 h abgestoppt.



### 3.3 Applikation von Gap27 in das *ex vivo* Wundheilungsmodell

Es sollte außerdem untersucht werden, wie sich das Expressionsmuster von TJ-Proteinen bei beschleunigter Wundheilung verhält. Analog zu der Zytokinapplikation wurden hier die Modelle mit Gap27 behandelt. Hier wurden direkt nach Verwundung 5 µl 6 mM Gap27 in die Wunde appliziert. Diese Behandlung wurde nach 24 Stunden wiederholt. Als Kontrolle diente das gleiche Volumen PBS und auch dieser Versuch wurde nach 48 h abgestoppt.

### 3.4 Histologische Techniken

#### 3.4.1 Herstellung und Fixierung von Gefrierschnitten

Die tiefgefrorenen Modelle wurden zunächst innerhalb des Kryostaten bei ca. -22 °C Kammertemperatur mit tissue freezing medium auf einer Objektplatte eingebettet. Die 6 µm dicken Schnitte wurden, zur besseren Vergleichbarkeit, möglichst aus der Mitte der Modelle entnommen. Anschließend wurden die Schnitte auf beschichtete Superfrost/Plus-Objekträger übertragen und sind für mindestens 30 Minuten bei RT getrocknet worden. Die Fixierung erfolgte für Schnitte, die für eine immunhistochemische Färbung mit einem Primärantikörper gegen OcIn gedacht waren, mit 100 % Ethanol für 30 Minuten bei 4 °C und anschließend für eine Minute mit Aceton bei RT. Schnitte, bei denen Färbungen mit einem Primärantikörper gegen Cldn-1, Cldn-4 oder ZO-1 gedacht war, wurden 10 Minuten mit Aceton bei -20 °C fixiert. Nach ca. 10 Minuten Trocknen wurden die Objekträger mit einer Wechselschichtung mit Zellstoffstreifen und Aluminium eingewickelt, beschriftet und bei -80°C aufbewahrt.

#### 3.4.2 HE-Färbung

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE- Färbung) werden durch das Hämatoxylin die Zellkerne und das Eosin das Plasma und die extrazelluläre Matrix angefärbt. Dafür wurden zunächst die Schnitte in einer Färbewiege sechs Minuten in filtrierte Hämalaunlösung nach Mayer gebracht. Hinterher wurden sie zweimal kurz, um überschüssige Farbe zu entfernen, in Leitungswasser getaucht und anschließend kurz in 3 %-igem HCL-Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die Färbewiege für 15 Minuten in einer Glasküvette unter fließendes Leitungswasser gestellt. Die Schnitte wurden dann abwechselnd kurz in Aqua dest., für 1 Minute in 0,2 % Eosin und wieder in Leitungswasser und Aqua dest. getaucht.

Daraufhin folgte zum Entwässern eine aufsteigende Ethanolreihe (50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 %). Hinterher inkubierten die Schnitte für zwei Minuten in Xylol als Vorbereitung für das anschließende Einbetten mit Eukitt. Dies erfolgte möglichst luftblasenfrei mit Deckgläschen. Die Schnitte wurden anschließend bis zum vollständigen Durchhärten des Eukitts über Nacht getrocknet. Die Auswertung erfolgte mit dem Lichtmikroskop.

### 3.4.3 Immunhistochemische Färbung

Durch die Immunhistochemie ist man in der Lage die Lokalisation von Proteinen in Gewebeschnitten mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper nachzuweisen.

Um der Austrocknung der Schnitte während des Färbevorgangs vorzubeugen, wurde zunächst die dunkle Färbeschale mit etwas A. dest. angefeuchtet. Die zu färbenden Kryoschnitte wurden dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und bei RT aufgetaut. Sobald die Schnitte getrocknet waren, wurden sie mit einem PAP-Pen umrandet. Dieser sollte verhindern, dass sich die aufgetragene Antikörperlösung auf dem gesamten Objektträger verteilt. Je nach Antikörper (siehe Antikörperliste in 2.4.1) wurde eine Blockierungslösung (Standardblock mit Triton X100, NGS und PBS) für 10 Minuten bei geschlossener Färbeschale bei RT auf den Schnitt aufgetragen. Der Block diente dazu, unspezifische Bindungsstellen im Schnitt abzusättigen und die Oberflächenspannung zu verändern. Dadurch werden Epitope z. T. freigelegt und unerwünschte Kreuzreaktionen vermieden. Anschließend wurde die Blockierungslösung abgeschlagen und zügig der Primärantikörper aufgetragen. Die zu verwendenden Primärantikörper wurden in PBS nach einer bestimmten Verdünnung, siehe hierzu die Tabelle aus 2.4.1, angesetzt, mit dem Vortexer vermischt und eine Minute bei 13.000 x g zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde weiterverwendet und, je nach Schnittgröße, 30- 80 µl dieser Primärantikörperlösung auf den jeweiligen Schnitt aufgetragen. Mit der entsprechenden Negativkontrolle wurde analog verfahren. Es folgte eine 30-minütige Inkubationszeit bei geschlossener Färbeschale und RT. Daraufhin wurde die Primärantikörperlösung abgeschlagen und es folgte eine Waschphase mit PBS für einmal 5 Minuten und zweimal 10 Minuten. Mit diesem Schritt wurden alle nicht gebundenen Antikörper abgewaschen um eine spezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu gewährleisten. Während dieser Waschphase wurde der Sekundärantikörper (z. B. anti-mouse oder anti-rabbit, je nach Spezies des Primärantikörpers) verdünnt und analog zum Primärantikörper mit dem Vortexer vermischt und zentrifugiert. Auch hier folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger fünf Minuten mit PBS gewaschen und dann eine Minute in das abgedunkelte DAPI- Färbebad (1:5000 in Aqua dest.) für eine Kerngegenfärbung gebracht. Danach folgte eine weitere Waschung mit zweimal fünf Minuten, anschließend zweimal drei Minuten mit A. dest. In der Zwischenzeit konnten die Deckgläschen zum Eindeckeln mit Petroleumbenzin und fusselfreien Präzisionswischtüchern geputzt werden. Zum Abschluss der Färbung wurde wieder die überschüssige Feuchtigkeit abgeschlagen und auf jeden Schnitt ein Tropfen Fluoromount gegeben um anschließend möglichst luftblasenfrei und feucht die Deckgläschen auf die Objektträger herunterklappen zu lassen.

In einer Mappe trockneten die Objektträger über Nacht bei RT um dann kurzfristig bei 4°C oder dauerhaft bei -20° bzw. -80°C gelagert zu werden.

### 3.5 Auswertung der Färbungen

#### 3.5.1 HE-Färbungen

Aus den HE gefärbten Modellen wurde der Wundheilungsscore nach dem folgenden Scoresystem unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Es wurde auf jedem Schnitt der linke und der rechte Wundrand bezüglich der Länge der regenerierten Epidermis bewertet und anschließend das arithmetische Mittel bestimmt. Auch nicht ganzzahlige Werte konnten verwendet werden.

0 = keine regenerierte Epidermis

1 = beginnende regenerierte Epidermis

2 = längere regenerierende Epidermis

3 = geschlossene einschichtige regenerierende Epidermis

4 = geschlossene mehrschichtige regenerierende Epidermis

Es wurden jeweils zwei, stellvertretend für das gesamte Wundheilungsmodell, Schnitte pro Wundheilungsmodell und Zeitpunkt (0 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h und 5 d) mit Hilfe der HE-Färbung ausgewertet. Dabei wurde darauf geachtet, dass an den jeweiligen Wundheilungszeitpunkten ein gewisser Wundheilungsfortschritt erreicht worden ist. In der HE-Färbung wurde zudem darauf geachtet, dass nur Wundmodelle ohne Haarfollikel am oder nahe des Wundrandes oder apikal der verwundeten Dermis, verwendet wurden. Des Weiteren durfte der Wundrand nicht umgeschlagen oder abgelöst sein.

Die Beurteilung des Wundheilungsscores erfolgte entsprechend der SOP mit der Bestimmung an mehreren unterschiedlichen Tagen. Zur besseren Darstellbarkeit wurden die Wundmodelle in verschiedene Kategorien eingeteilt: Score 0,1-1; 1,1-2; 2,1-2,9 und eine Kategorie, die ausschließlich geschlossene Wunden beinhaltet: 3-4.

#### 3.5.2 Immunfluoreszenzfärbungen

##### 3.5.2.1 Unbehandelte Modelle

Zur Auswertung der immunfluoreszenzgefärbten Schnitte wurde das Fluoreszenzmikroskop von Zeiss GmbH (Jena) und die Software openlab 2.0.9 eingesetzt.

Es wurden immer zwei bis drei komplette Zeitreihen in einem Experiment immunhistochemisch gefärbt, um einen möglichst guten Vergleich aufstellen zu können.

Auch hier wurde einerseits nach dem Wundheilungsscore (s.o.) und andererseits nach den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h und 5 d ausgewertet.

Pro Zeitpunkt wurden mindestens sieben ( $n = 7$ ) verschiedene Wundmodelle ausgewertet. Die einzelnen Modellabschnitte, also unbeteiligte Epidermis (2 Reteleisten entfernt), Wundrand und regenerierende Epidermis wurden getrennt voneinander ausgewertet. Es ergaben sich demnach 4 Parameter, nach denen die Wundmodelle ausgewertet wurden:

- Ob eine Expression vorhanden ist, oder nicht: Immunreaktion positiv oder negativ
- Lokalisation horizontal: Expression in der unbeteiligten Epidermis, am Wundrand oder in der regenerierenden Epidermis
- Lokalisation vertikal: Expression in welcher epidermalen Schicht
- Status der Wundheilung: Score oder Zeitpunkt

Modelle, die eine besonders schlechte Heilung zeigten, d. h. wesentlich unter ihrem durchschnittlichen Wundheilungsscore lagen, wurden von der immunhistochemischen Auswertung ausgeschlossen.

### 3.6. Statistische Auswertung

In der statistischen Auswertung dieser Arbeit wurde ein lineares gemischtes Modell (linear mixed Modell) gerechnet. Um die Mehrfachmessungen an den Schweinen zu modellieren, wurden die Schweine als „random-intercept“ in das Modell aufgenommen. Alle weiteren, je nach Fragestellung variierenden, Confounder wurden als feste Effekte modelliert, gegebenenfalls wurden auch Interaktionen zwischen einzelnen Confoundern in das Modell mit aufgenommen.

Für die Untersuchung der Einflüsse von Wundheilungsfortschritt und Zeit auf die einzelnen Schichten wurde hypothesengeneriert ein quadratischer Zusammenhang zwischen diesen Variablen und der Proteinlokalisierung unterstellt und getestet. Der lineare Term ist ein Teil des quadratischen Terms und wurde bei jedem Test automatisch mitgetestet.

Eine Signifikanz im quadratischen Modell bedeutet, dass der Verlauf der Proteinverteilung in der Wundheilung eher einer Hyperbel entspricht. Man geht bei dieser Berechnung davon aus, dass die Proteinlokalisierung bei einer geschlossenen bzw. zugeheilten Wunde wieder der unverwundeten Haut entspricht.

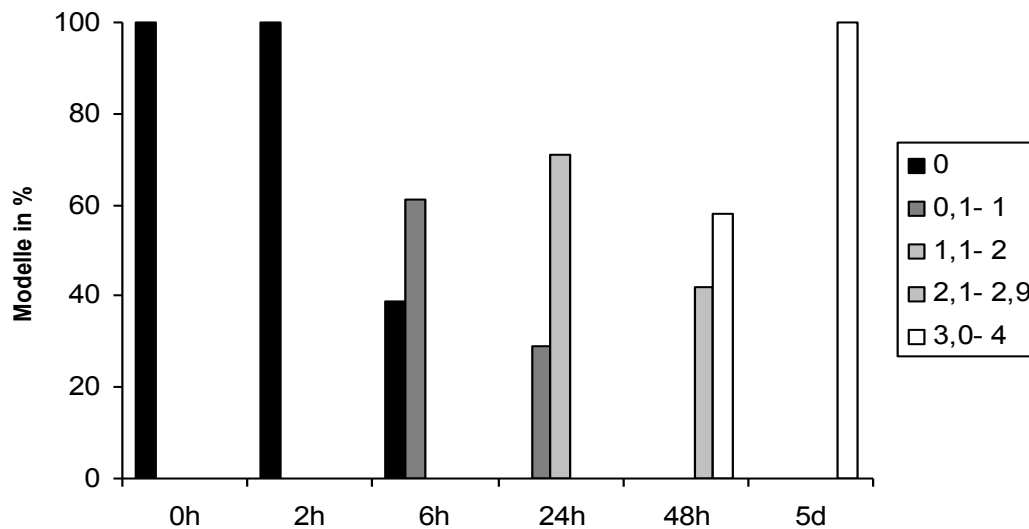
Der Vorteil des linearen Terms besteht in der Annahme, dass die Beobachtungszeit bzw. der Wundheilungsfortschritt unter Umständen nicht ausreicht um abschließend zu sagen, ob die Proteinlokalisierung bei einer vollständig zugeheilten Wunde dem Ausgangsmuster einer unverwundeten Epidermis letztendlich entsprechen wird oder nicht.

## 4 ERGEBNISSE

Zur besseren Übersichtlichkeit der Darstellung werden in den Ergebnissen die Scores in folgenden Kategorien zusammengefasst: 0; 0,1-1; 1,1-2; 2,1-2,9; 3,0-4, was dem Wundheilungsfortschritt: keine Wundheilung (0), wenig Wundheilung (bis 1) mittlere Wundheilung (1,1-2), fortgeschrittene Wundheilung (2,1-2,9) und geschlossene Wunde ein oder mehrschichtig (3-4) entspricht; siehe auch Methoden unter 3.5.1). Für die statistischen Berechnungen wurden aber die Einzelscores mit den jeweiligen Untersuchungsparametern korreliert. Generell wurde die Lokalisation der TJ-Proteine an den Zell-Zell-Grenzen beschrieben. Zusätzliche zytoplasmatische Lokalisationen, die man nicht immer eindeutig von unspezifischen Färbungen abgrenzen kann, bleiben unberücksichtigt.

### 4.1 Korrelation zwischen dem Zeitpunkt nach Verwundung und dem Wundheilungsfortschritt

In diesem Kapitel wird die Beobachtungszeit der Wundheilungsmodelle nach Verwundung dem Wundheilungsfortschritt, der als Wundheilungsscore festgestellt wurde (siehe Methoden unter 3.5.1) gegenübergestellt. In Abbildung 4.1.1 ist der durchschnittliche Scorebereich nach unterschiedlich langen Heilungszeiten in % dargestellt. Dort ist zu sehen, dass alle Modelle, die 0, also gar keine, oder 2 h Heilungszeit hatten, einen Wundheilungsscore von 0 hatten. Nach 6 h Heilung trifft dies auf 39 % der Modelle zu, 61 % hingegen liegen durchschnittlich in einem Scorebereich von 0,1-1. Auch in dem Bereich 0,1-1 lagen 29 % der Modelle, die 24 h in Kultur waren während 71 % bereits einen Scorebereich von 1,1-2 zeigen. Nach 48 h Heilung wiesen 42 % einen Score zwischen 2,1-2,9 auf und 58 % zeigen eine zugeheilte Wunde, also einen Score zwischen 3 und 4. Nach 5 d gab es schließlich nur noch Modelle mit einer vollständig zugeheilten Wunde, d. h. innerhalb eines Scorebereichs zwischen 3 und 4.



**Abbildung 4.1.1 Korrelation der Zeitpunkte nach Verwundung zum Wundheilungsfortschritt** Zu jedem Zeitpunkt wurde für alle Modelle der durchschnittliche Score ermittelt, wobei pro Zeitpunkt  $n = 7$  war. 0; 0,1-1; 1,1-2; 2,1-2,9 und 3-4 sind die jeweiligen Kategorien der Wundheilungsscores

Die Korrelation zwischen Zeit und Wundheilungsfortschritt ist statistisch signifikant und ist am Besten anhand einer quadratischen Gleichung zu beschreiben, die anschließend in eine Sättigung geht.

## 4.2 Beeinflussung des Wundheilungsscores durch die Behandlung der Modelle

### 4.2.1 Modelle nach Zytokin- Applikation

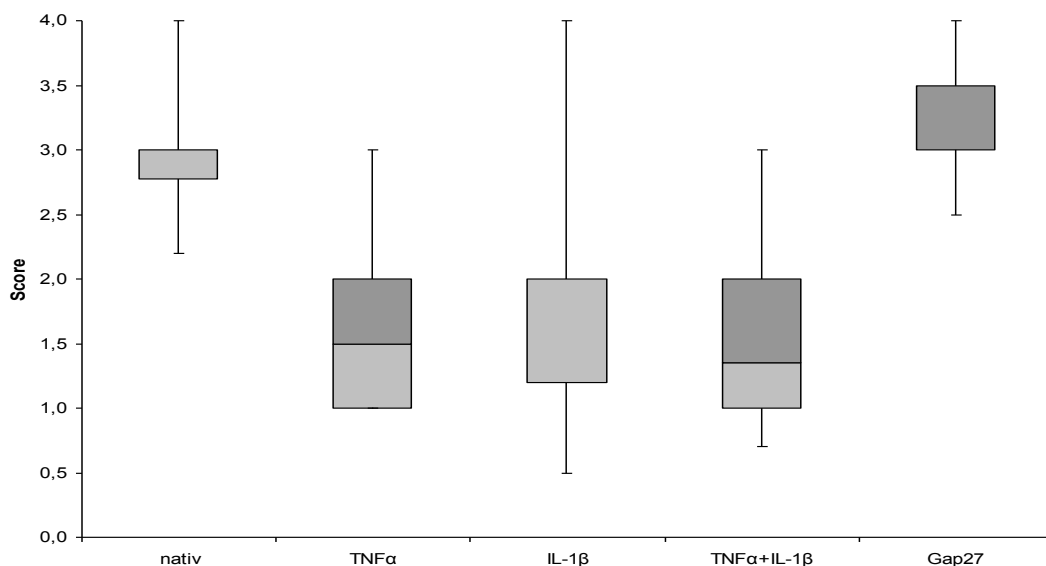
In zytokinbehandelten Modellen konnte, im Vergleich zur Kontrolle, eine deutliche Verzögerung der Wundheilung festgestellt werden: Bei dem Durchschnitt der internen Kontrollmodelle sah man nach 48 h einen Score von 2,95. Die Modelle, die nur mit IL-1 $\beta$  behandelt worden sind, zeigen einen durchschnittlichen Score von 1,66; nach der Behandlung mit TNF $\alpha$  hatten die Modelle im Schnitt einen Score von 1,6 und nach Applikation von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  dann schließlich im Durchschnitt einen Score von 1,46 (Siehe Abbildung 4.2.1). Der Unterschied zwischen der Behandlung der Modelle und der jeweiligen Kontrolle ist bei TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und bei der Kombination aus TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mit jeweils  $p = <0,001$  statistisch signifikant (Siehe hierzu auch Kapitel 4.2.2).

### 4.2.2 Modelle nach Gap27-Applikation

Bei den mit Gap27 behandelten Modellen im Vergleich zur Kontrolle wurde nach 48h eine beschleunigte Wundheilung festgestellt und somit die Ergebnisse von (Pollok et al. 2011) bestätigt. Der Wundheilungsscore lag nach der Behandlung mit Gap27 im Durchschnitt bei

3,2 (Siehe Abbildung 4.2.1). Der Unterschied zwischen den Kontrollmodellen, die einen durchschnittlichen Score von 2,95 hatten, und denen, die mit Gap27 behandelt worden sind, zeigen ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p = 0,012$ ).

Bei der weiteren statistischen Auswertung ergab sich, dass TNF $\alpha$  auch im Vergleich zu Gap27 und zur Kontrolle mit jeweils  $p < 0,001$  den Score signifikant nach unten verändert. D. h., dass die Wundheilung nach der Applikation von TNF $\alpha$  verzögert verläuft. IL-1 $\beta$  tat dies im Vergleich zu TNF $\alpha$ /IL-1 $\beta$  ( $p = 0,015$ ), zu Gap27 ( $p = < 0,001$ ) und zur Kontrolle ( $p = < 0,001$ ) statistisch signifikant. Die Kombination aus TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  beeinflusste den Score statistisch signifikant verglichen mit Gap27 und zur Kontrolle (jeweils  $p = < 0,001$ ).



**Abbildung 4.2.1 Der Wundheilungsscore nach 48 h bei Kontroll und behandelten Modellen**

Dargestellt ist der jeweilige durchschnittliche Wundheilungsscore. Zu sehen ist der Median, der Bereich, in dem 50% der Werte liegen (innerhalb der jeweiligen Box) und der Bereich, in dem die restlichen Werte liegen (innerhalb der Striche) nativ  $n = 31$ , TNF $\alpha$   $n = 28$ , IL-1 $\beta$   $n = 30$ , TNF $\alpha$  & IL-1 $\beta$   $n = 27$ , Gap27  $n = 30$

#### 4.3 Lokalisation von TJ-Proteinen während der Wundheilung

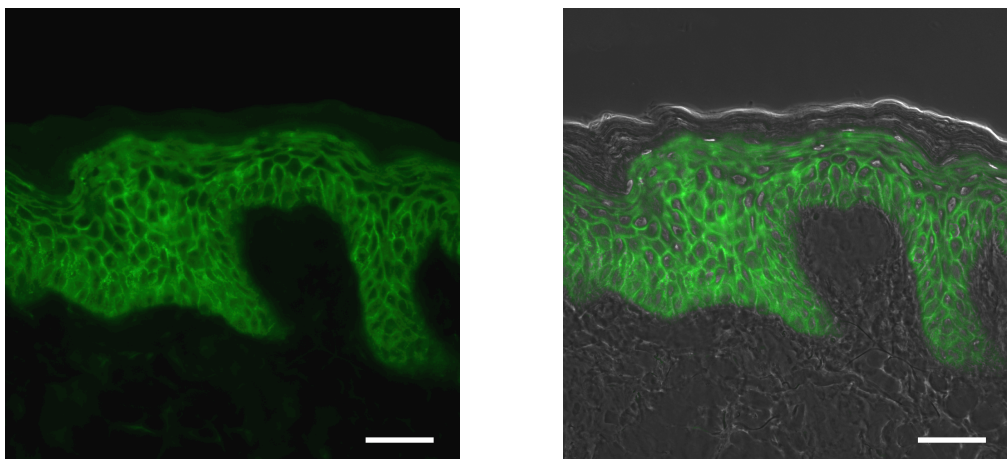
In diesem Kapitel wird die Dynamik von TJ-Proteinen in der kutanen Wundheilung beschrieben. Dies geschieht für die TJ-Proteine Cldn-1, Cldn-4, Occludin und ZO-1. Die Beschreibung orientiert sich jeweils an den verschiedenen Wundabschnitten (regenerierende Epidermis, Wundrand) sowie an der unbeteiligten Epidermis, die als Kontrolle dient. Zunächst wird jeweils die Expression im Kontroll-ex vivo Wundheilungsmodell zu verschiedenen Zeitpunkten beschrieben. Anschließend folgt die Darstellung der Ergebnisse von Wundmodellen, die 48 h mit Zytokinen oder Gap27 behandelt worden sind.

#### 4.3.1 Expression von Cldn-1 während der Wundheilung

##### 4.3.1.1 Korrelation zwischen der Cldn-1 Expression und dem Wundheilungsscore

###### 4.3.1.1.1 Cldn-1 Expressionsmuster in der unbeteiligten Epidermis

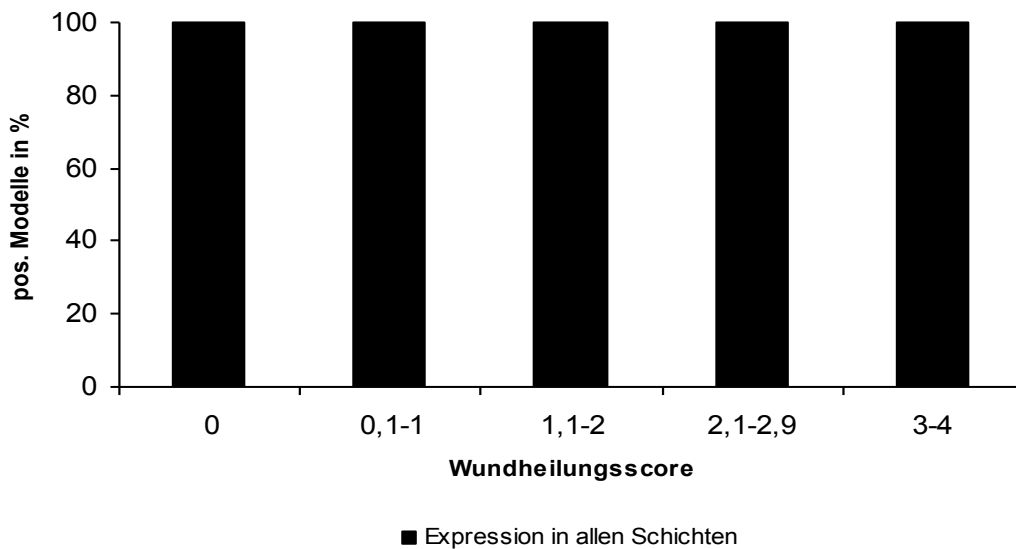
Es ist bekannt, dass Cldn-1 in der Epidermis von Mensch und Schwein in allen lebenden Schichten an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert ist. Zuerst konnte dies von Brandner und Mitarbeitern 2002 an humaner Haut und von Ohnemus und Mitarbeitern 2008 an porciner Haut gezeigt werden. Dies konnte auch ich in meinen Untersuchungen am *ex vivo* Wundmodell in der vom Wundrand weit entfernten, sogenannten „unbeteiligten Epidermis“, bestätigen (Abbildung 4.3.1.1).



**Abbildung 4.3.1.1 Immunlokalisation von Cldn-1 in der unbeteiligten Epidermis.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der Cldn-1 Expression in allen lebenden epidermalen Schichten. Maßstab: 50 µm

Die Cldn-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis wurde als Kontrolle untersucht. Sie sollte sich nicht aufgrund der Verwundung verändern, stattdessen aber Einflüsse durch die Kultur- oder Färbebedingungen widerspiegeln. Meine Untersuchungen an insgesamt 43 Wundmodellen zeigen, dass, unabhängig vom Wundheilungsfortschritt, der als Wundheilungsscore in Abbildung 4.3.1.2 wiedergegeben wird, die Cldn-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis der von unverwundeter Haut entsprach, d. h. ein Immunfluoreszenzsignal an den Zell-Zell-Grenzen in allen Schichten nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.3.1.1).





**Abbildung 4.3.1.2 Cldn-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis bei verschiedenen Scorebereichen.** Score 0 n = 17; Score 0,1-1 n = 6; Score 1,1-2 n = 7; Score 2,1-2,9 n = 3; Score 3-4 n = 12

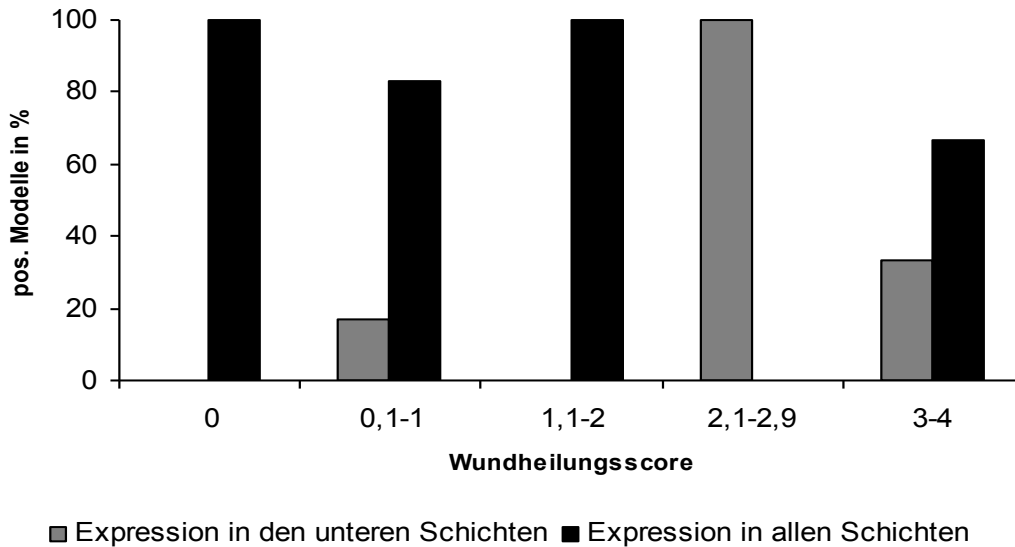
#### 4.3.1.1.2 Cldn-1 Expressionsmuster am Wundrand

Am Wundrand ist, im Vergleich zur unbeteiligten Epidermis, bei einem Teil der Modelle bereits ab einem kleinen Wundheilungsfortschritt ein verändertes Expressionsmuster festzustellen. Bei einem Score von 0, d. h. in Modellen, in denen kein Wundheilungsfortschritt beobachtet wird, zeigen alle Modelle in sämtlichen Schichten des Wundrands eine Cldn-1 Expression, wie sie auch in der unbeteiligten Epidermis vorgefunden wird (Vgl. Abbildung 4.3.1.1).

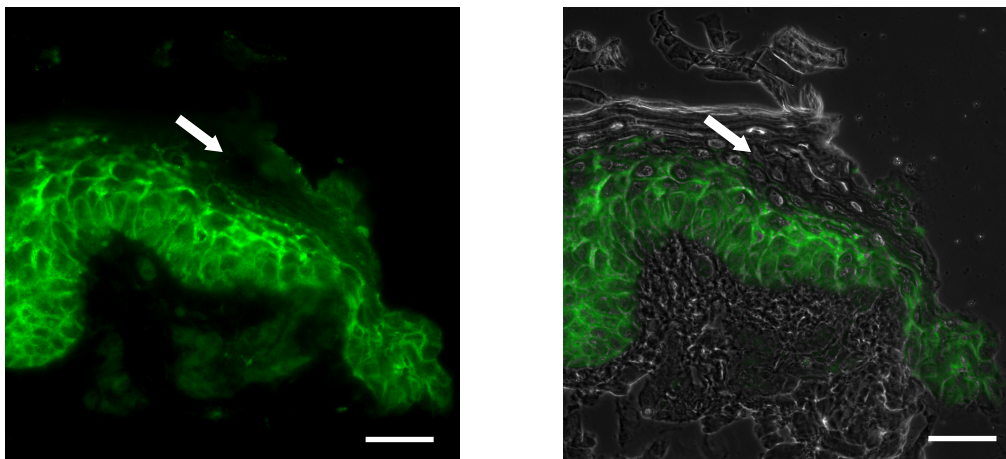
Bei einem Score von 0,1-1 konnte in 17 % der Modelle, bei dem Score von 1,1-2, bei keinem der Fälle bei einem Score von 2,1-2,9 100% der Fälle (aber nur n = 3!) und bei einem Score von 3– 4 in 33 % der Fälle eine Herunterregulation von Cldn-1 in den oberen Schichten des Wundrands nachgewiesen werden. Ein Beispiel für die Expression ausschließlich in den unteren Schichten, hier bei einer kurzen Wundzunge, zeigt Abb. 4.3.1.4. Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse für Cldn-1 am Wundrand in Abb. 4.3.1.3 (Darstellung der Korrelation von Cldn-1 mit den Kategorien des Scores) und in Abb. 4.3.1.11 (Darstellung der Korrelation von Cldn-1 mit den einzelnen Scorewerten).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Veränderung der Cldn-1 Expression am Wundrand erst dann beobachtet wird, wenn man generell einen Wundheilungsfortschritt beobachtet. Allerdings ist dann kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Wundheilungsfortschritt und Cldn-1 Expression am Wundrand zu sehen. Mit  $p = 0,873$  im quadratischen Modell und mit  $p = 0,153$  im linearen Term (Abb. 4.3.1.11) zeigen sich für Cldn-1 am Wundrand in der Korrelation zum Wundheilungsfortschritt keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Eine

Signifikanz im quadratischen Modell würde zeigen, dass der Verlauf der Wundheilung eher einer Hyperbel entspricht, während eine Signifikanz im linearen Term für einen linearen Zusammenhang spräche.



**Abbildung 4.3.1.3 Cldn-1 Expression am Wundrand bei verschiedenen Scorebereichen.** Score 0 n = 17; Score 0,1-1 n = 6; Score 1,1-2 n = 7; 2,1-2,9 n = 3; Score 3-4 n = 12

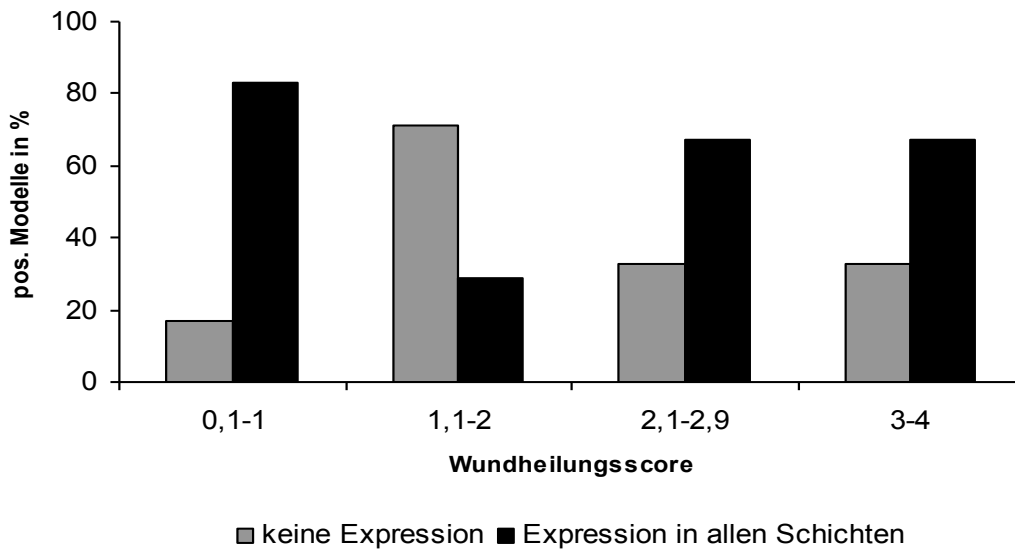


**Abbildung 4.3.1.4 Immunlokalisation von Cldn-1 am Wundrand.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung einer Herunterregulation von Cldn-1 in den oberen Schichten des Wundrands. Der Pfeil deutet auf die Cldn-1 negativen oberen Schichten am Wundrand hin. Maßstab: 50 µm

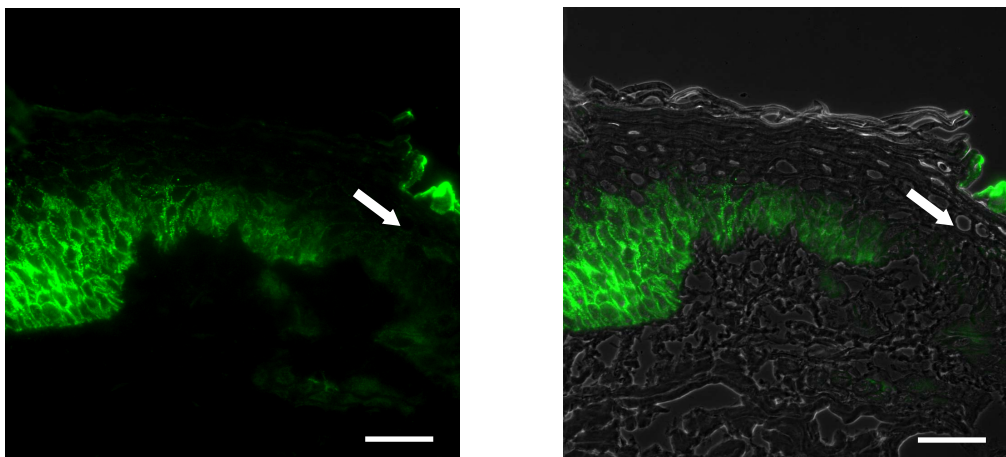
#### 4.3.1.1.3 Cldn-1 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis

Bei einem Score von 0,1-1 wird Cldn-1 in 83 % der Fälle in der regenerierenden Epidermis in allen Schichten exprimiert und 17 % zeigen keine Expression. Bei einem Score von 1,1-2 ist

Cldn-1 in 29 % der Fälle in allen Schichten exprimiert und in 71 % der Fälle abwesend. Modelle, die einen Score von 2,1-4 hatten, zeigen ein umgekehrtes Bild: Der Großteil der Modelle zeigt Cldn-1 in der regenerierenden Epidermis in allen Schichten lokalisiert (67 %) und es sind weniger Modelle, die gar kein Cldn-1 exprimieren (33%). Siehe hierzu Abbildung 4.3.1.5. In den Abbildungen 4.3.1.7 und 4.3.1.8 ist exemplarisch die Expression in allen Schichten bei einer geschlossenen Wunde illustriert.

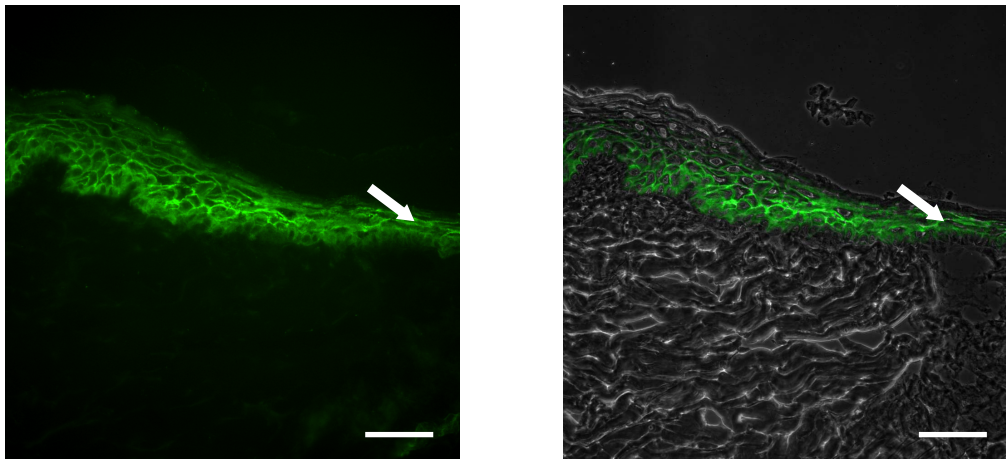


**Abbildung 4.3.1.5 Cldn-1 Expression in der regenerierenden Epidermis bei verschiedenen Scorebereichen.** Score 0,1-1 n = 6; Score 1,1-2 n = 7; 2,1-2,9 n = 3; Score 3-4 n = 12

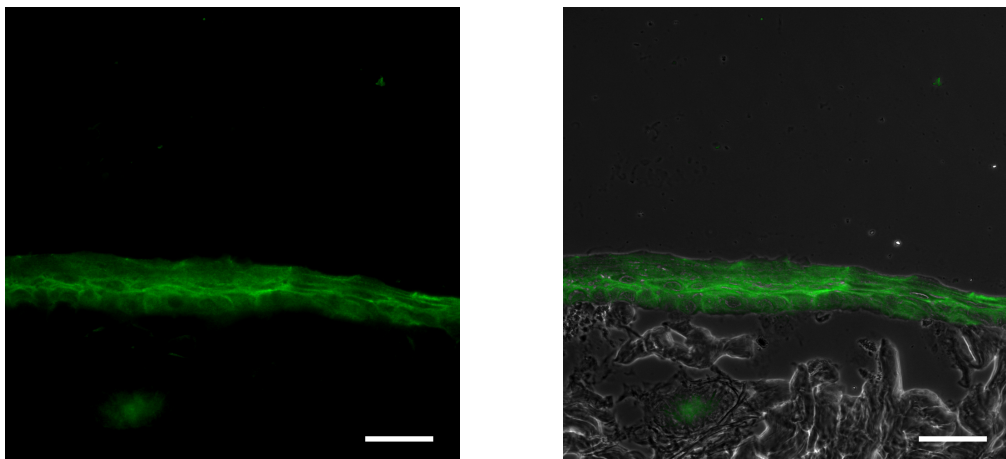


**Abbildung 4.3.1.6 Immunlokalisation von Cldn-1 in der regenerierenden Epidermis.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung einer regenerierenden Epidermis, die negativ für Cldn-1 ist, in einem Modell mit einem Score von 1,5. Der Pfeil deutet auf die Cldn-1 negative regenerierende Epidermis hin.

Maßstab: 50 µm



**Abbildung 4.3.1.7 Immunlokalisation von Cldn-1 in der regenerierenden Epidermis.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der Cldn- 1 Expression in allen regenerierten Schichten bei einem Score von 3. Der Pfeil deutet auf die Cldn-1 positive regenerierende Epidermis hin. Maßstab: 50 µm



**Abbildung 4.3.1.8 Immunlokalisation von Cldn-1 in der geschlossenen Wunde.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der Cldn- 1 Expression in allen regenerierten Schichten bei einem Wundmodell mit einem Score von 4. Maßstab: 50 µm

Zusammenfassend kann man zur Cldn-1 Expression in der regenerierenden Epidermis sagen, dass sich bis zu einem Score von 2 ein steigender, von 15 % auf 62,5 %, prozentualer Anteil an Modellen zeigt, der keine Cldn-1 Expression aufweist, der dann aber im weiteren Verlauf auch wieder auf 36 % abfällt: Siehe hierzu Abbildung 4.3.1.5.

Die Expression in allen Schichten, hingegen, fällt bis zu einem Score von 2 zunächst ab. Sobald aber eine ein- oder mehrschichtige regenerierende Epidermis vorhanden ist (Score 3-4), geht mit einem Anteil von 64 % auch die Cldn-1 Expression in allen Schichten in der regenerierenden Epidermis wieder hoch. Die Korrelation zwischen der Cldn-1 Expression und dem Wundheilungsfortschritt zeigt in der regenerierenden Epidermis im quadratischen Modell mit  $p = <0,001$  und im linearen Term mit  $p = 0,001$  ein statistisch signifikantes Ergebnis (siehe Abb. 4.3.11). Diese Korrelation ist unabhängig vom Wundheilungszeitpunkt.

#### 4.3.1.2 Korrelation zwischen der Cldn-1 Expression und verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung

Im vorherigen Abschnitt wurde die Cldn-1 Expression zum Wundheilungsfortschritt korreliert. Nachfolgend geschieht dies nun in Korrelation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung.

##### 4.3.1.2.1 Cldn-1 Expressionsmuster in der unbeteiligten Epidermis

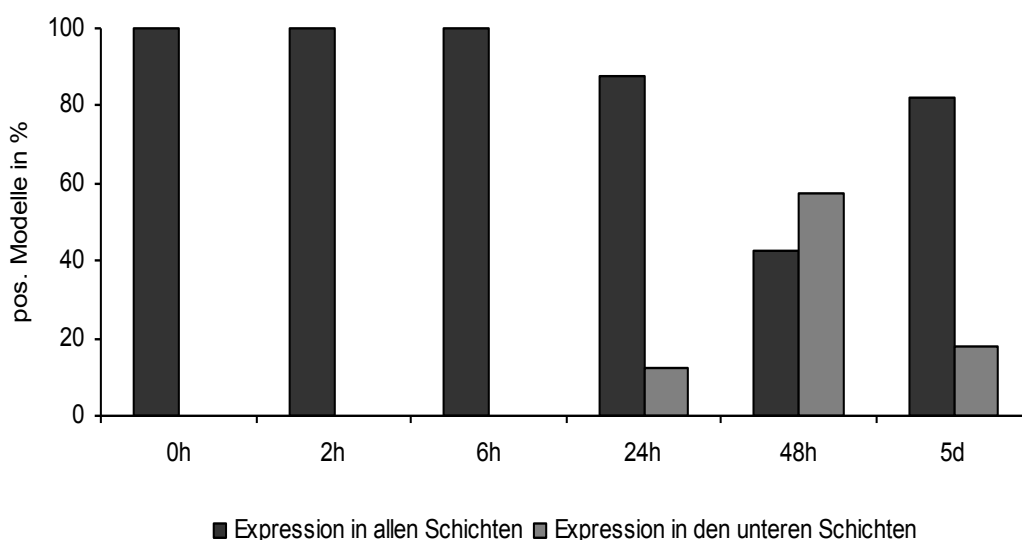
In der unbeteiligten Epidermis wird Cldn-1 zu allen Zeitpunkten, auch in Korrelation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung, in allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert. Vgl. Abbildung 4.3.1.2.

##### 4.3.1.2.2 Cldn-1 Expressionsmuster am Wundrand

Am Wundrand zeigt sich nach 0 h, 2 h und 6 h zu 100 % eine Cldn-1 Expression in allen Schichten. Nach 24 h wurde in 12,5 % der Fälle eine Cldn-1 Expression nur noch in den unteren Schichten gefunden, nach 48 h in 57 % und nach 5 d in 37,5 %.

Am Wundrand kann man demnach eine zunächst vermehrte Herunterregulation in den oberen Schichten von Cldn-1 von 6 bis 48 h beobachten, Nach 5 d ist dieser Trend aber nicht mehr zu beobachten (Abbildung 4.3.1.9).

Statistisch gesehen, zeigt sich für Cldn-1 bei Korrelation zwischen der Beobachtungszeit und der Veränderung der Schichten am Wundrand mit  $p = 0,015$  im linearen Term und mit  $p = 0,025$  im quadratischen Modell statistisch signifikante Ergebnisse (Siehe auch 4.3.1.12). Diese Korrelation ist unabhängig vom Wundheilungsfortschritt.

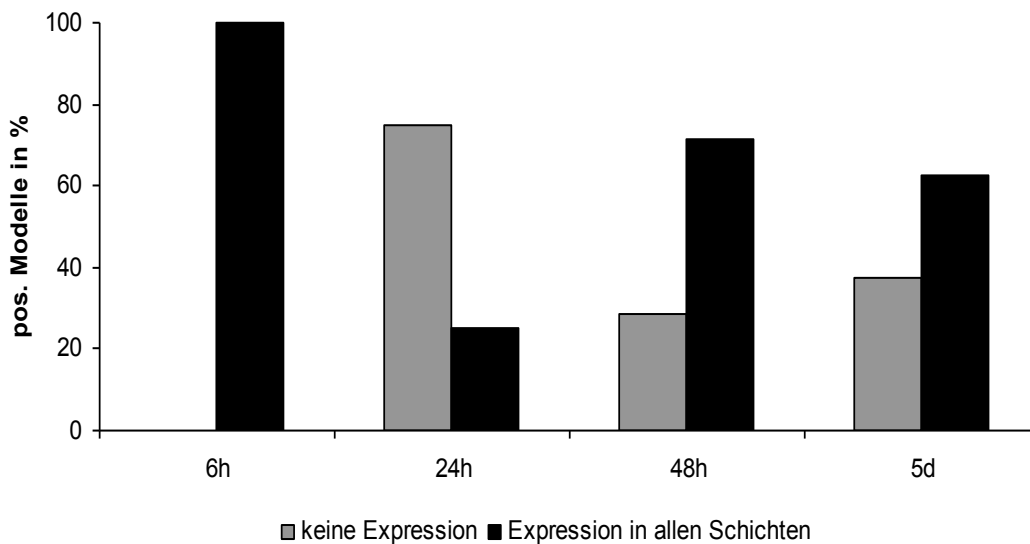


**Abbildung 4.3.1.9 Cldn-1 Expression am Wundrand zu verschiedenen Zeitpunkten.** 0 h n = 7, 2 h n = 8, 6 h n = 7, 24 h n = 8, 48 h n = 7, 5 d n = 8

#### 4.3.1.2.3 Cldn-1 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis

In der regenerierenden Epidermis kann nach 6 h bei 100 % der Modelle eine Cldn-1 Expression in allen Schichten nachgewiesen werden. Dahingegen zeigen nach 24 h 75 %, nach 48 h 28,6 % und nach 5 d dann 37,5 % der Modelle keine Cldn-1 Expression in der regenerierenden Epidermis.

Es zeigt sich für Cldn-1 bei Korrelation zwischen der Beobachtungszeit und der Veränderung der Schichten in der regenerierenden Epidermis mit  $p = 0,627$  im linearen Term und mit  $p = 0,409$  im quadratischen Modell (siehe auch 4.3.1.11) kein statistisch signifikantes Ergebnis.

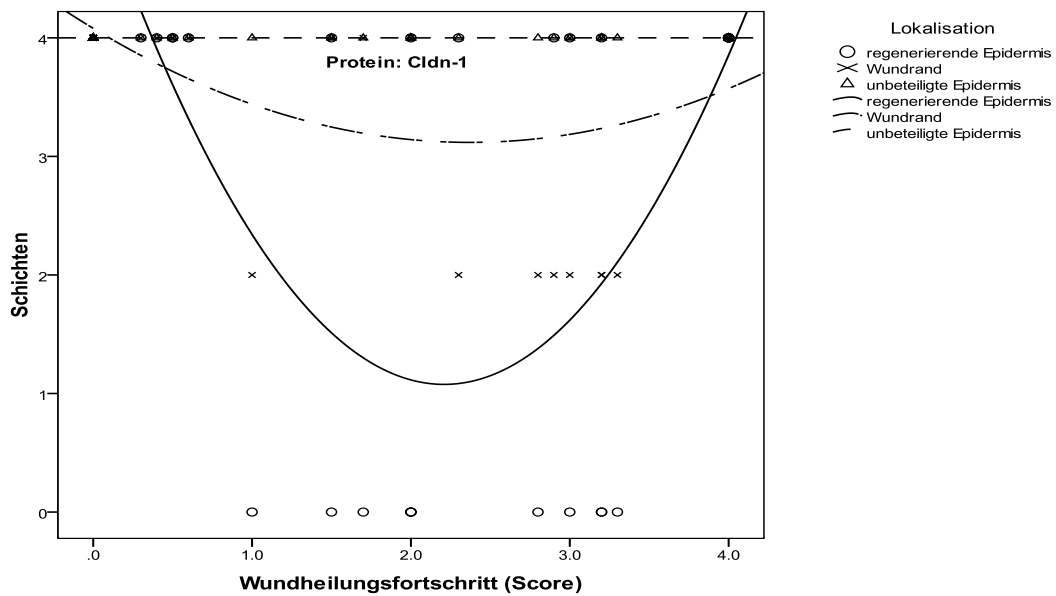


**Abbildung 4.3.1.10 Cldn-1 Expression in der regenerierenden Epidermis zu verschiedenen Zeitpunkten.**

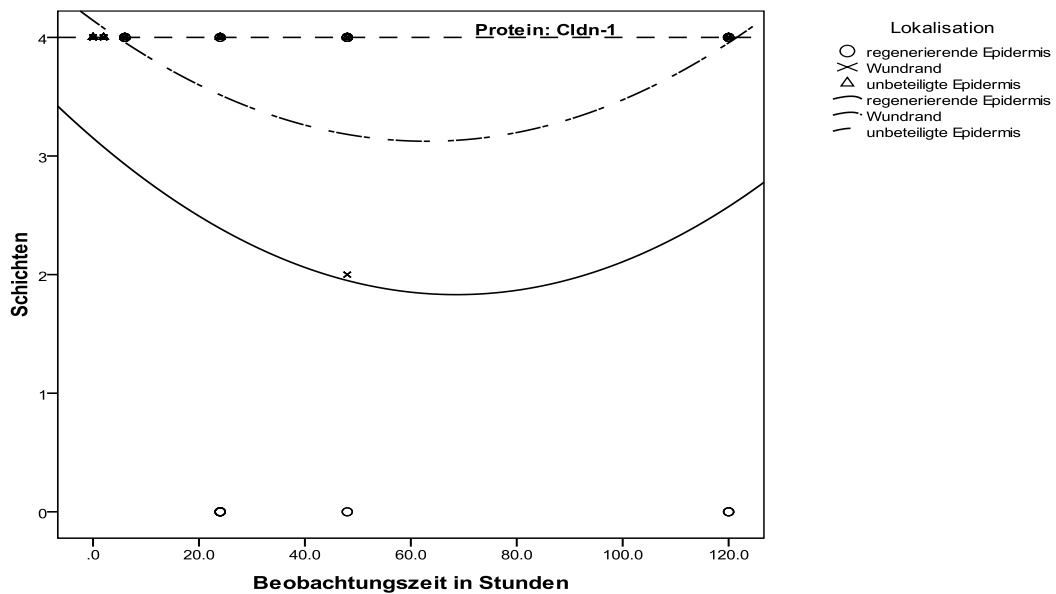
6 h n = 5, 24 h n = 8, 48 h n = 7 und 5 d n = 8

#### Fazit Cldn-1-Lokalisation:

Zusammenfassend sieht man also eine statistische Korrelation der Veränderung der Cldn-1 Lokalisation mit dem Wundheilungsfortschritt unabhängig von der Zeit in der regenerierenden Epidermis (Abb. 3.4.1.11). Dabei beobachtet man erst eine Abnahme und dann wieder eine Zunahme der Expression. Darüber hinaus ist die Veränderung der Cldn-1 Lokalisation am Wundrand mit der Zeit aber unabhängig vom Wundheilungsfortschritt statistisch signifikant (Abb. 4.3.1.12). Man beobachtet eine Verminderung der Cldn-1 Expression am Wundrand zu späteren Zeitpunkten der Wundheilung.



**Abbildung 4.3.1.11** Veränderung der Cldn-1 Expression in verschiedenen Schichten in Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes, d. h. dem Wundheilungsscore in einer quadratischen Funktion, in der man davon ausgeht, dass sich bei einer geschlossenen Wunde wieder das Ausgangsmuster (wie in unverwundeter Haut) der Proteinverteilung findet. Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum bzw. untere Schichten, 3= Expression im Str. granulosum und im gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten. Die dargestellten Kurven sind nach dem quadratischen Modell errechnet

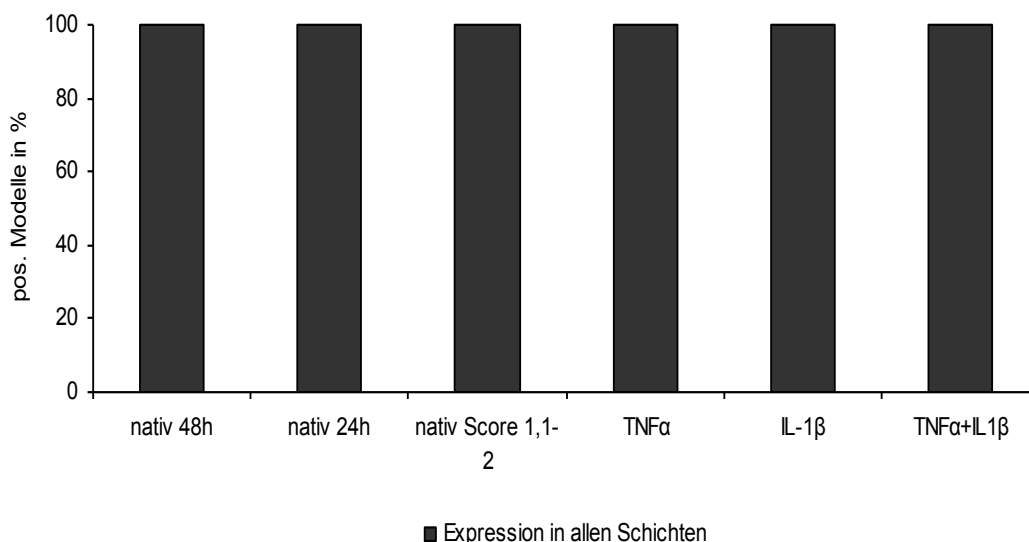


**Abbildung 4.3.1.12** Veränderung der Cldn-1 Expression in verschiedenen Schichten in Abhängigkeit der Beobachtungszeit in Stunden in einer quadratischen Funktion Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum bzw. untere Schichten, 3= Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten

## 4.3.1.3 Cldn-1 Expression 48 h nach Zugabe von Zytokinen und Gap27

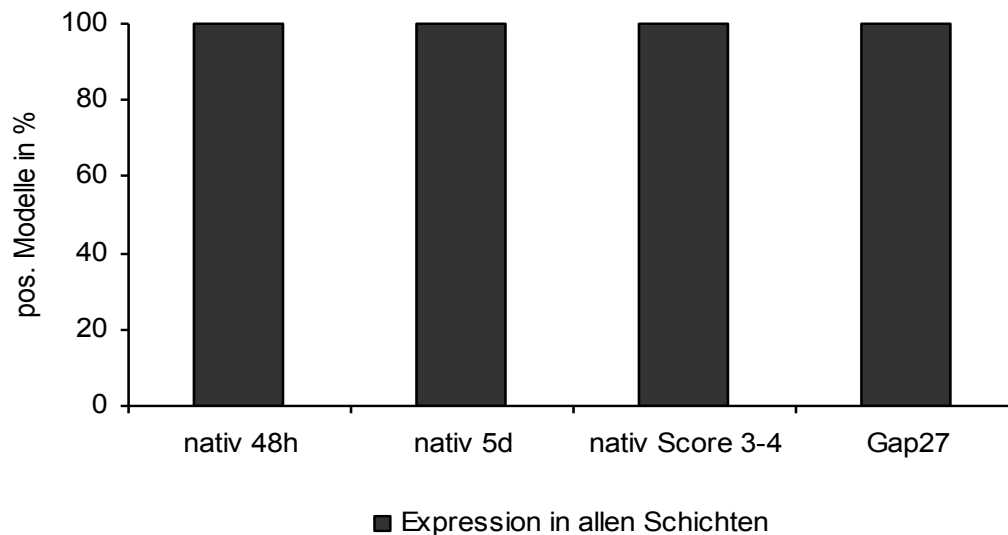
## 4.3.1.3.1 Unbeteiligte Epidermis

Wie in Abbildung 4.3.1.13 und 4.3.1.14 zu sehen ist, zeigen alle Modelle, auch unter dem Einfluss von Zytokinen und Gap27, im Vergleich zu Kontroll-Modellen, in allen Kombinationen eine Cldn-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis in allen lebenden Schichten. Alle behandelten Modelle wurden nach 48 h abgestoppt. Hierbei spielt es keine Rolle, ob ein Zytokin einzeln, beide Zytokine in Kombination oder auch Gap27 appliziert worden sind. In der statistischen Analyse ergaben sich keine statistischen signifikanten Veränderungen im Vergleich zur 48 h Kontrolle. Zusätzlich zu dem auch statistisch ausgewerteten Vergleich zu 48 h wurden auch mit dem Scorebereich 1,1-2 von unbehandelten Modellen verglichen, da dies dem Scorebereich entspricht, den Modelle, die mit  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und der Kombination behandelt wurden, zeigen. Außerdem wurde mit 24 h Werten verglichen, da dies der Wundheilungszeitpunkt in Kontroll-Modellen ist, bei dem ein durchschnittlicher Score von 1,1-2 gefunden wird. Darüber hinaus wurde mit einem Scorebereich von 3-4 und dem Wundheilungszeitpunkt 5d verglichen, da dies dem Wundheilungsfortschritt der Gap27-behandelten Modelle entspricht.



**Abbildung 4.3.1.13 Vergleich der Cldn-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis zwischen Kontroll-Modellen zu verschiedenen Zeitpunkten und Modellen, die mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  behandelt wurden.** nativ 48 h n = 7; nativ 24 h n = 8, nativ Score 1,1-2 n = 8,  $\text{TNF}\alpha$  n = 8,  $\text{IL-1}\beta$  n = 8,  $\text{TNF}\alpha+\text{IL-1}\beta$  n = 8





**Abbildung 4.3.1.14 Vergleich der Cldn-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis zwischen Kontroll-Modellen und Modellen nach Zugabe von Gap27.** nativ 48 h n = 7; nativ 5 d n = 8; nativ Score 3-4 n = 3; Gap27 n = 8.

#### 4.3.1.4 Wundrand

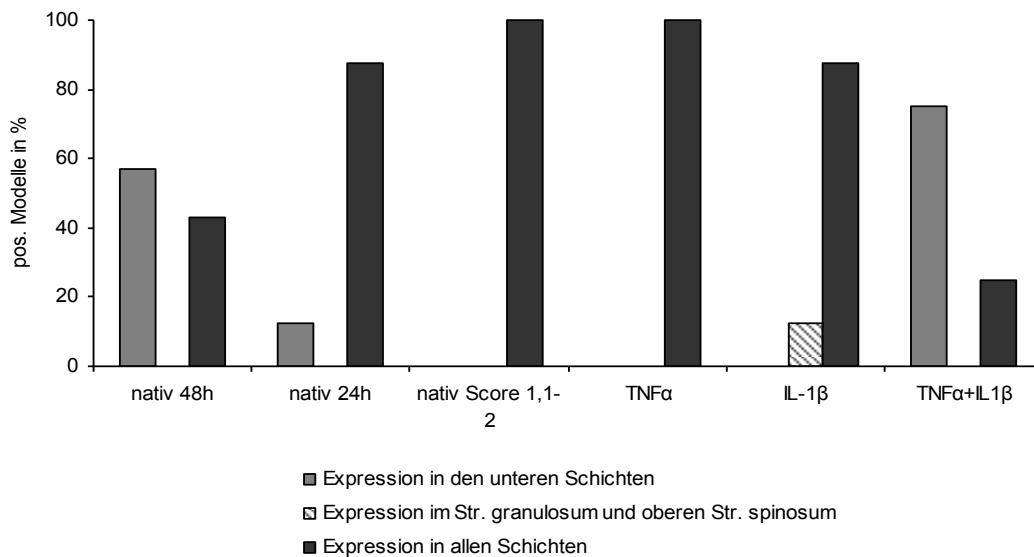
##### Zytokine

Vergleicht man die Ergebnisse, die man nach Zugabe von IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  nach 48 h erhält, mit den Kontroll-Modellen mit 48 h Heilungszeit, so beobachtet man nach Zugabe von IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  einen deutlichen Unterschied in der Lokalisation von Cldn-1. Während Cldn-1 in Kontroll-Modellen in über 50 % der Fälle nur noch in den unteren Schichten lokalisiert ist, ist dies mit TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  nicht der Fall. Interessanterweise führt aber eine Kombination von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wiederum zu einem großen Anteil (75 %) von Modellen mit einer Beschränkung der Expression auf die unteren Schichten.

Beim Vergleich der behandelten Modelle mit den 24 h Kontroll-Modellen bzw. Modellen mit einem Score von 1,1-2, fällt auf, dass bei Zugabe der jeweiligen Zytokine Cldn-1 ebenfalls alle (TNF $\alpha$ ), oder die meisten (IL-1 $\beta$ ), Modelle eine Expression in allen Schichten aufweisen. Ein großer Unterschied im Expressionsmuster ist bei Modellen, in die beide Zytokine appliziert wurden, im Vergleich zu 24 h Modellen zu sehen: Es dominieren mit 75 % deutlich die Modelle mit einer Expression in den unteren Schichten.

Die statistische Analyse erfolgte im Vergleich zwischen den Modellen mit der jeweiligen Applikation zu den Modellen mit der gleichen Heilungszeit, also 48 h. Statistische Analysen zu dem Vergleich „24 h“ und „Score 1,1-2“ waren leider mathematisch nicht möglich. Hierbei zeigt sich mit  $p = 0,012$  und  $p = 0,046$  eine statistische Signifikanz zwischen Kontroll-Modellen und Modellen die mit TNF $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  behandelt wurden. Der Unterschied zur Kombination der Zytokine war nicht statistisch signifikant. Weitere signifikante Unterschiede

zeigen sich aber zwischen IL1 $\beta$ +TNF $\alpha$  und TNF $\alpha$  alleine ( $p = 0,026$ ). Siehe hierzu Abbildung 4.3.1.15.



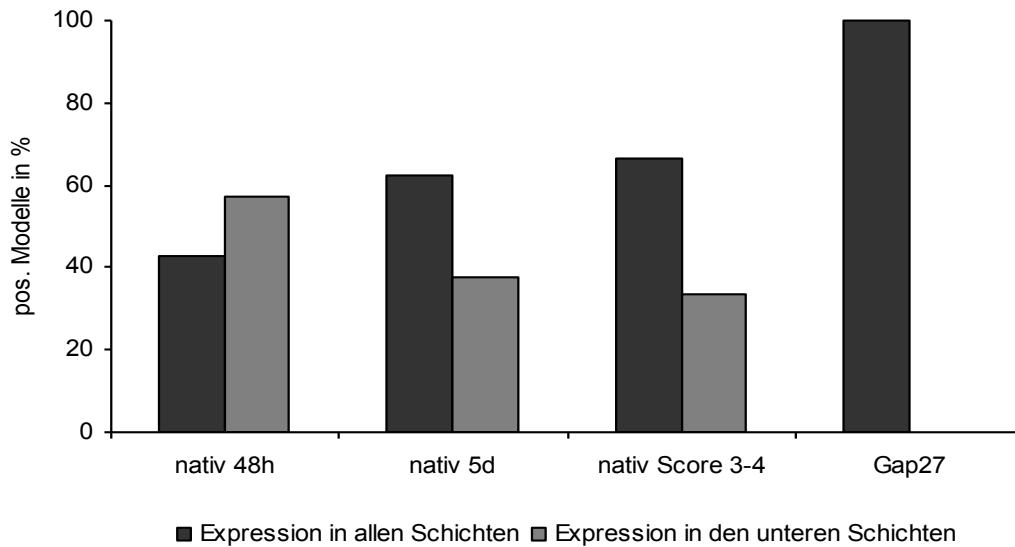
**Abbildung 4.3.1.15 Cldn-1 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Zytokinen.**  
nativ 48 h n = 7; nativ 24 h n = 8, für nativ Score 1,1-2 n = 8, TNF $\alpha$  n = 8, IL-1 $\beta$  n = 8,  
TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  n = 8

**Tabelle 4.3.1.1** Cldn-1 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Zytokinen in Prozent

	nativ 48 h	nativ 24 h	nativ Score 1,1-2	TNF $\alpha$	IL-1 $\beta$	TNF $\alpha$ +IL1 $\beta$
<b>Expression in den unteren Schichten</b>	57,1	12,5	0	0	0	75
<b>Expression im Str. granulosum &amp; oberen Str. spinosum</b>	0	0	0	0	12,5	0
<b>Expression in allen Schichten</b>	42,9	87,5	100	100	87,5	25

### Gap27

Bei den 48 h Kontroll-Modellen sieht man, dass der Anteil, der eine Lokalisation in den unteren Schichten zeigt, dominiert. Bei 5 d und Kontroll-Modellen, mit einem Score von 3-4, gibt es jeweils ebenfalls einen Anteil, der Cldn-1 in den unteren Schichten zeigt. Modelle, die mit Gap27 behandelt wurden, zeigen allerdings zu 100 % eine Expression in allen Schichten. Siehe hierzu Abbildung 4.3.1.16 und die Tabelle 4.3.1.2. In der statistischen Auswertung ergaben sich zwischen den mit Gap27 behandelten Modellen und den 48 h Kontrollen statistische Signifikanzen ( $p = 0,011$ ), d.h. dass bei Modellen, die mit Gap27 behandelt worden sind, statistisch signifikant mehr Modelle eine Cldn-1 Lokalisation in allen Schichten zeigen im Vergleich zu Modellen mit gleicher Wundheilungszeit..



**Abbildung 4.3.1.16 Cldn-1 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Gap27.**  
nativ 48 h n = 7; 5 d n = 8, nativ Score 3-4 n = 3; Gap27 n = 8

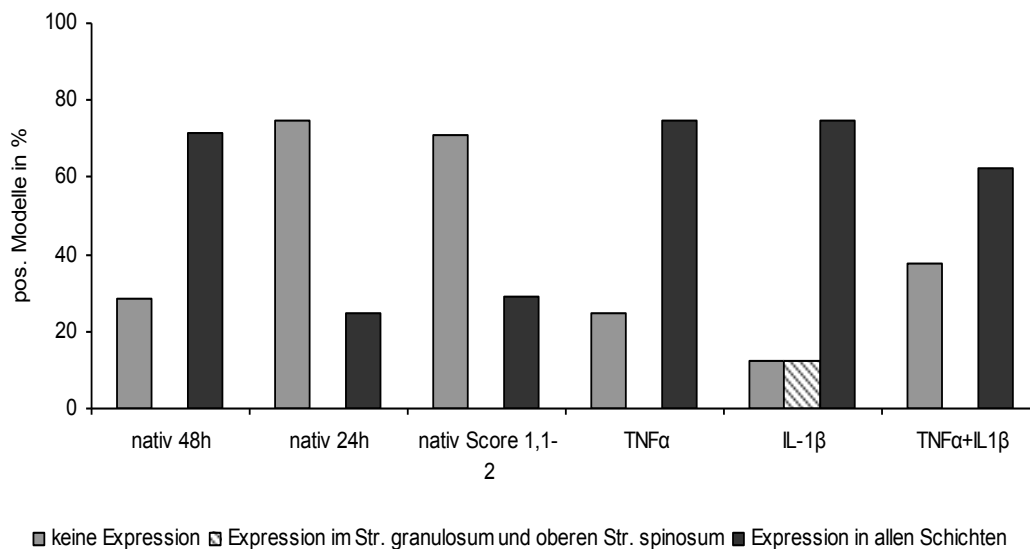
**Tabelle 4.3.1.2 Cldn-1 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Gap27 in Prozent.**

	nativ 48h	nativ 5d	nativ Score 3-4	Gap27
Expression in allen Schichten	42,9	82	66,3	100
Expression in den unteren Schichten	57,1	18	33,3	0

#### 4.3.1.5 Regenerierende Epidermis

##### Zytokine

In der regenerierenden Epidermis weisen die Modelle, die nur mit  $TNF\alpha$  oder  $IL-1\beta$  behandelt worden sind, jeweils zu 75 % eine Expression in allen Schichten auf. In der Kombinationsapplikation beider Zytokine sind es 62,5 %. In der statistischen Auswertung, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur 48 h Kontrolle.



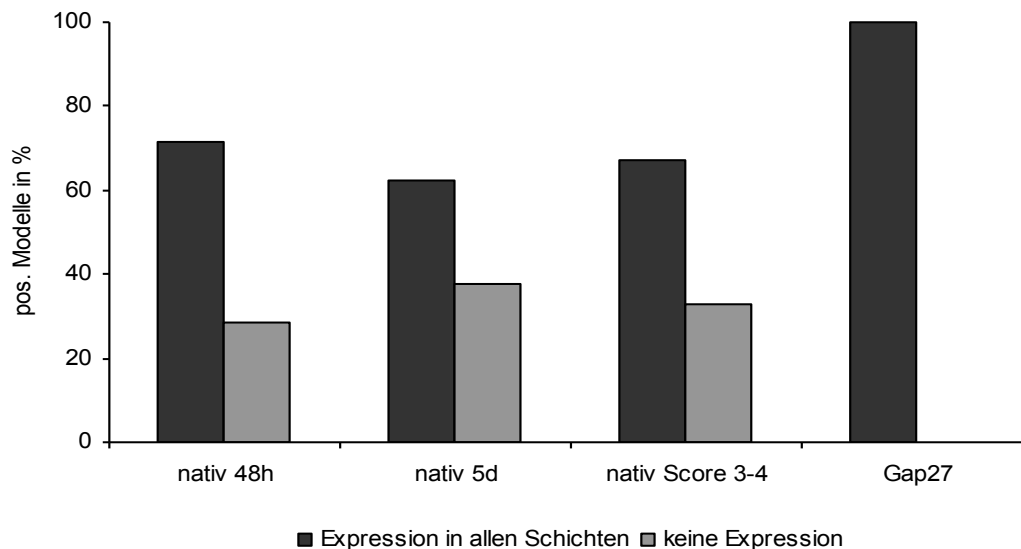
**Abbildung 4.3.1.17 Cldn- 1 Expression in der regenerierenden Epidermis. nach der Zugabe von Zytokinen** nativ 48 h n = 7; nativ 24 h n = 8, nativ Score 1,1-2 n = 8, TNFα n = 8, IL-1β n = 8, TNFα+IL-1β n = 8

Tabelle 4.3.1.3 Cldn-1 Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Zytokinen in Prozent.

	nativ 48 h	nativ 24 h	nativ Score 1,1-2	TNFα	IL-1β	TNFα+ IL1β
<b>keine Expression</b>	28,6	75	71	25	12,5	37,5
<b>Expression im Str. granulosum&amp; oberem Str. spinosum</b>	0	0	0	0	12,5	0
<b>Expression in allen Schichten</b>	71,4	25	29	75	75	62,5

### Gap27

Wenn Gap27 in die Wunde appliziert wurde, konnten in der regenerierenden Epidermis ähnliche Veränderungen im Expressionsmuster von Cldn-1 gefunden werden wie am Wundrand: Am Wundrand sah man, dass unter dem Einfluss von Gap27 alle Modelle eine Expression von Cldn-1 in allen Schichten zeigen. Wie in Abbildung 4.3.1.18 zu sehen ist, kann man in der regenerierenden Epidermis die gleiche Beobachtung wie am Wundrand festhalten. In der statistischen Analyse zeigt sich mit p = 0,048 ein statistisch signifikantes Ergebnis zwischen den mit Gap27 behandelten Modellen und den 48 h Kontrollmodellen.



**Abbildung 4.3.1.18 Cldn- 1 Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Gap27.** nativ 48 h n = 7; nativ 5 d n = 8; nativ Score 2-3 n = 3; Gap27 n = 8

**Tabelle 4.3.1.4 Cldn-1 Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Gap27 in Prozent.**

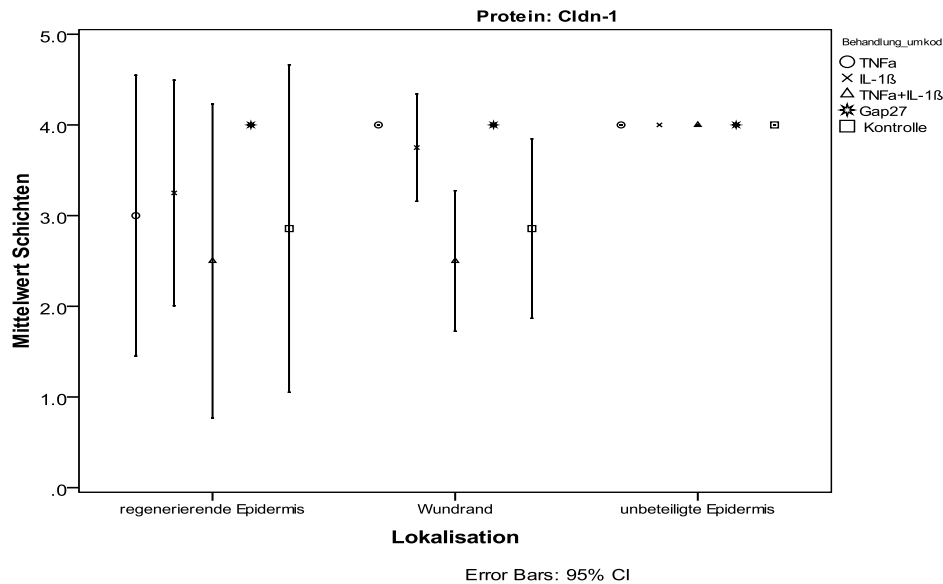
	nativ 48h	nativ 5d	nativ Score 3-4	Gap27
Expression in allen Schichten	71,4	62,5	67	100
keine Expression	28,6	37,5	33	0

Auch hier, in der regenerierenden Epidermis, entspricht das Cldn-1 Expressionsmuster weder den Kontroll-Modellen zu 48 h noch den Kontroll-Modellen mit einem vergleichbaren Wundheilungsscore, sondern zeigt mehr Modelle mit Cldn-1 Expression in allen Schichten.

### Fazit der Wirkung der verschiedenen Behandlungen auf die Cldn-1 Lokalisation

In nachstehender Abbildung ist der jeweilige Mittelwert der Schichten für die einzelnen Behandlungen an verschiedenen Wundlokalisationen für Cldn-1 aufgezeigt. In der regenerierenden Epidermis sieht man, dass durchschnittlich in den Kontroll-Modellen und in den behandelten Modelle, mit Ausnahme von Gap27, Cldn-1 im Str. spinosum und im Str. granulosum vorhanden ist. Die Lokalisation in den mit Gap27 behandelten Modellen ist hingegen in allen Modellen in allen Schichten, ein Unterschied, der am Wundrand auch als in der regenerierenden statistisch signifikant zur Kontrolle ist.

Am Wundrand findet sich sowohl bei den mit Gap27 behandelten als auch bei den mit TNF $\alpha$  behandelten Modellen Cldn-1 in allen Modellen in allen Schichten, während die Kontroll-Modelle und die anderen behandelten Modelle weiterhin im Durchschnitt eine Herabregulation zeigen. Dies ist für Modelle, die mit TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$  oder Gap27 behandelt worden sind im Vergleich zu Kontrollmodellen statistisch signifikant. In der unbeteiligten Epidermis zeigen sich keine Veränderungen in der Lokalisation von Cldn-1.



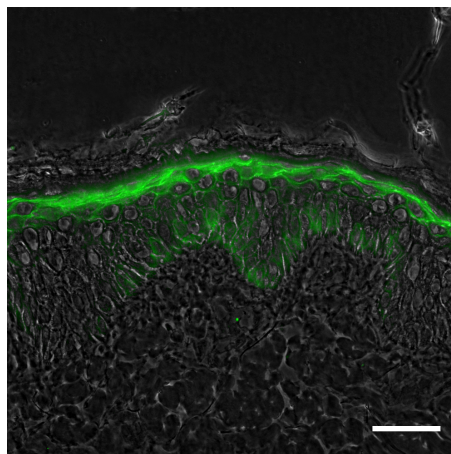
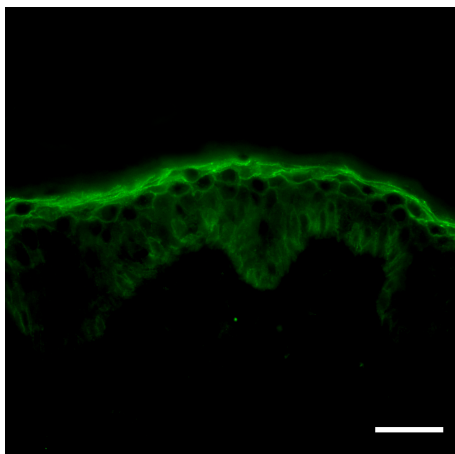
**Abbildung 4.3.19 Mittelwert der Cldn-1 Expression in verschiedenen Schichten mit unterschiedlichen Behandlungen an verschiedenen Wundlokalisationen** Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberen Str. spinosum bzw. untere Schichten, 3= Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten

#### 4.3.2 Expression von Cldn-4 während der Wundheilung

##### 4.3.2.1 Korrelation zwischen der Cldn-4 Expression und dem Wundheilungsscore

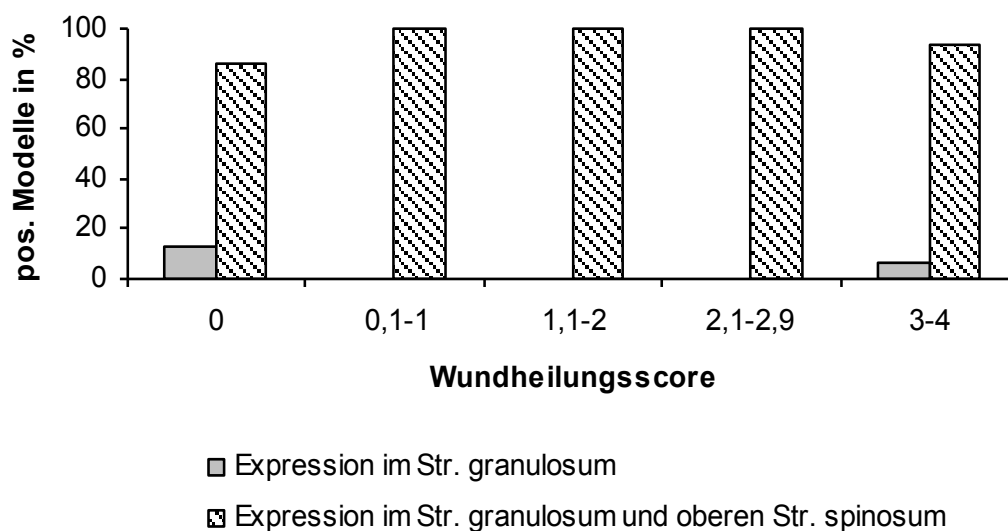
###### 4.3.2.1.1 Cldn-4 Expressionsmuster in der unbeteiligten Epidermis

Cldn-4 konnte 2006 von Brandner und Mitarbeitern in menschlicher Haut nachgewiesen werden. Lokalisiert ist Cldn-4 in den oberen epidermalen Schichten (Brandner et al. 2002, Brandner et al. 2006). Dies konnte auch ich in meinen Untersuchungen am *ex vivo* Wundmodell bestätigen (Abbildung 4.3.2.1).



**Abbildung 4.3.2.1 Immunlokalisierung von Cldn-4 in der unbeteiligten Epidermis.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der Cldn-4 Expression in den oberen epidermalen Schichten. Maßstab: 50 µm

Die Cldn-4 Expression in der unbeteiligten Epidermis wurde als Kontrolle untersucht. Sie sollte sich nicht aufgrund der Verwundung verändern, stattdessen aber Einflüsse durch die Kultur- oder Färbebedingungen widerspiegeln. Meine Untersuchungen an insgesamt 47 Wundmodellen zeigen, dass, unabhängig vom Wundheilungsfortschritt, der als Wundheilungsscore in Abbildung 4.3.2.2 wiedergegeben wird, die Cldn-4 Expression in der unbeteiligten Epidermis der von unverwundeter Haut entsprach, d. h. ein Immunfluoreszenzsignal an den Zell-Zell-Grenzen in den oberen Schichten nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.3.2.1).



**Abbildung 4.3.2.2 Cldn-4 Expression in der unbeteiligten Epidermis bei verschiedenen Scorebereichen.** Score 0 n = 15; Score 0,1-1 n = 6; Score 1,1-2 n = 6; 2,1-2,9 n = 2; 3-4 n = 17

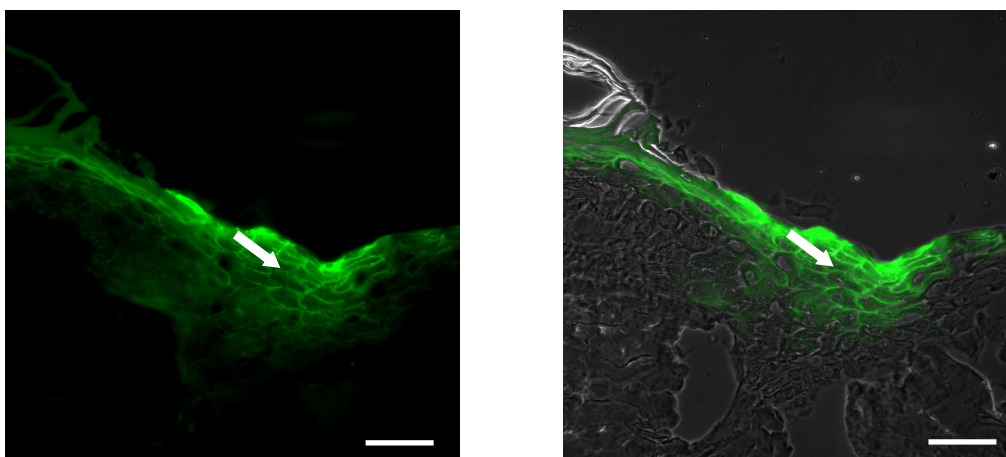
#### 4.3.2.1.2 Cldn-4 Expressionsmuster am Wundrand

Bei einem Score von 0, d. h. in Modellen, in denen kein Wundheilungsfortschritt beobachtet wird, zeigen die meisten (86 %) der Modelle, genau wie in der unbeteiligten Epidermis, eine Cldn-4 Expression in den oberen Schichten. Am Wundrand gibt es aber bereits bei kleinen Wundheilungsfortschritten, im Vergleich zur unbeteiligten Epidermis, bei einem Teil der Modelle Veränderungen bzgl. der Lokalisation von Cldn-4: Bei einem Score von 0,1-1, konnte bei 50 %, bei einem Score von 1,1-2 in 33 % und bei einem Score von 2,1-2,9 in 50 % der Modelle eine verbreiterte Expression bis in das untere Str. spinosum nachgewiesen werden. Bei einer geschlossenen Wunde, Score 3– 4, sind es 41 % der Fälle, in denen die

Cldn-4 Expression verbreitert ist. Bei geschlossenen Wunden kann zusätzlich ein kleiner Anteil beobachtet werden, der eine Lokalisation in allen regenerierten Schichten zeigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Veränderung der Cldn-4 Expression am Wundrand erst dann beobachtet wird, wenn man generell einen Wundheilungsfortschritt beobachtet. Während der Wundheilung ist der Anteil der Modelle mit verbreiteter Expression relativ konstant. Bei der geschlossenen Wunde findet man dann noch einen weiteren Trend zur Verbreiterung (Abb. 4.3.2.3, 4.3.2.15). Mit dem p-Wert  $p = 0,098$  im linearen Term und mit  $p = 0,204$  in der quadratischen Analyse (Abb. 4.4.13) am Wundrand zeigen sich für Cldn-4 am Wundrand in der Korrelation zum Wundheilungsfortschritt aber keine statistisch signifikanten Ergebnisse.



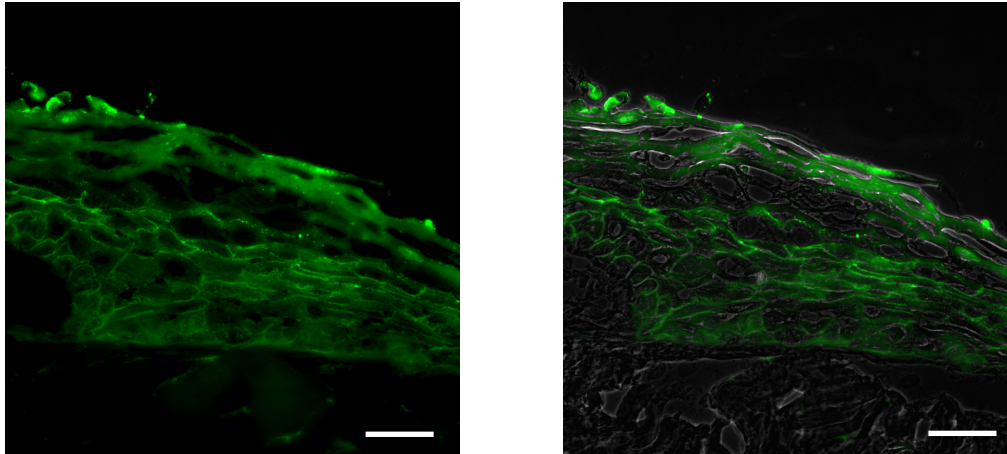
**Abbildung 4.3.2.3 Cldn-4 Expression am Wundrand bei verschiedenen Scorebereichen.** Score 0 n = 15; Score 0,1-1 n = 6; Score 1,1-2 n = 6; 2,1-2,9 n = 2; 3-4 n = 17



**Abbildung 4.3.2.4 Immunlokalisation von Cldn-4 am Wundrand.** Links



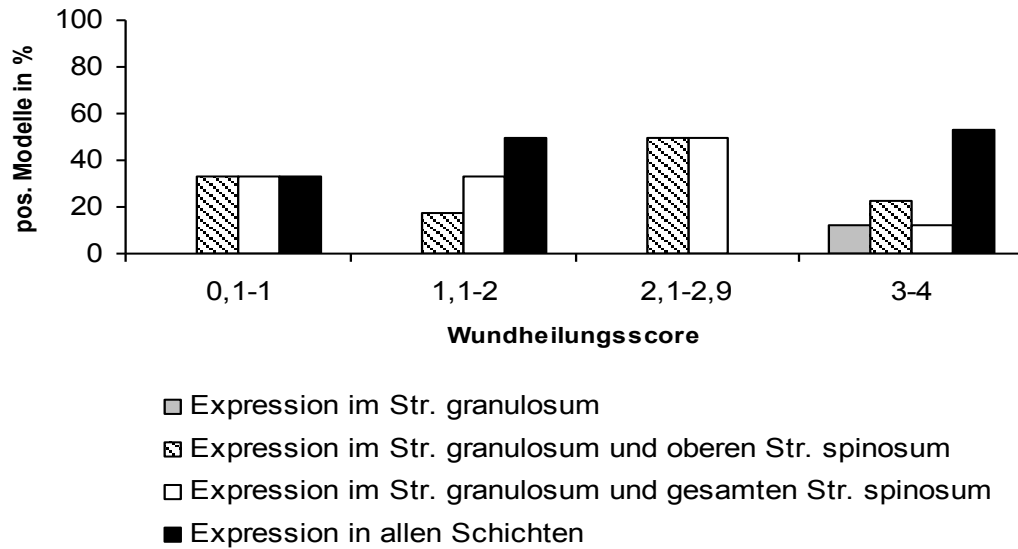
Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der verbreiterten Cldn-4 Expression am Wundrand in einem Modell mit kleinem Wundheilungsfortschritt mit einem Score von 1. Der Pfeil zeigt auf die Verbreiterung von Cldn-4 am Wundrand.  
Maßstab: 50 µm



**Abbildung 4.3.2.5 Immunlokalisierung von Cldn-4 am Wundrand.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der Cldn-4 Lokalisation in allen Schichten am Wundrand bei einer geschlossenen Wunde mit einem Score von 4  
Maßstab: 50 µm

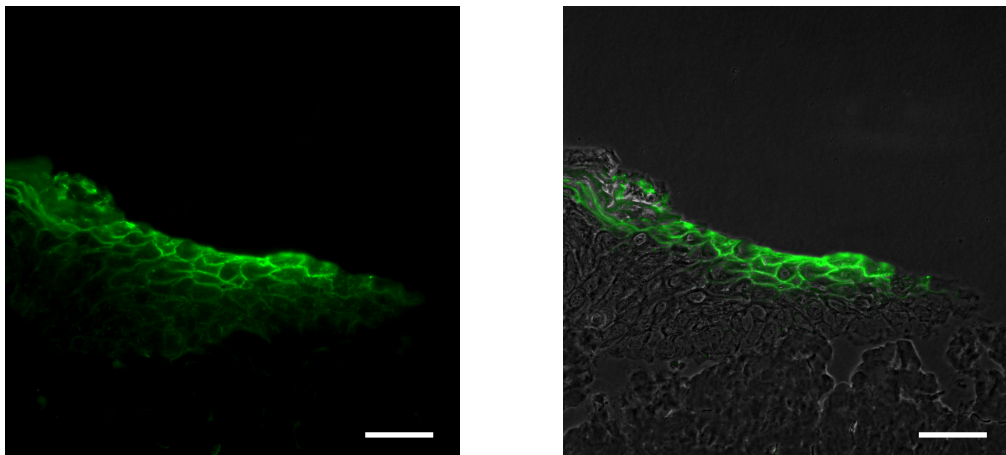
#### 4.3.2.1.3 Cldn-4 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis

Die regenerierende Epidermis zeigt größtenteils die Lokalisation von Cldn-4 in mehreren neu gebildeten Schichten. Wenn man davon ausgeht, dass eine Expression im Str. granulosum oder bis in das obere Str. spinosum die „normale“ Expression ist, dann zeigt Abbildung 4.3.2.6, dass während der Wundheilung ein großer prozentualer Anteil eine verbreiterte Expression, d.h. entweder bis ins untere Spinosum oder in allen Schichten aufweist: So zeigen beispielsweise 66,6 % bei einem Score von 0,1-1, 83,3% bei einem Score von 1,1-2, 50% bei einem Score von 2,1-2,9 und 65 % bei einem Score von 3-4 eine verbreiterte Expression. Da bei einem Score von 2,1-3 nur 2 Modelle berücksichtigt werden konnten, ist diese Kategorie großen Schwankungen ausgesetzt. Die statistische Überprüfung des beobachteten Verlaufs, die die Einzel-Score-Werte und nicht die Kategorisierungen berücksichtigt (siehe Abb. 4.3.2.12) zeigt mit  $p = 0,039$  im quadratischen Modell dass die Korrelation von Cldn-4 zum Wundheilungsfortschritt statistisch signifikant ist und einen hyperbel-artigen Verlauf zeigt. Der lineare Term zeigt keine Signifikanz ( $p = 0,16$ ).



**Abbildung 4.3.2.6 Cldn-4 Expression in der regenerierenden Epidermis bei verschiedenen Scorebereichen.**

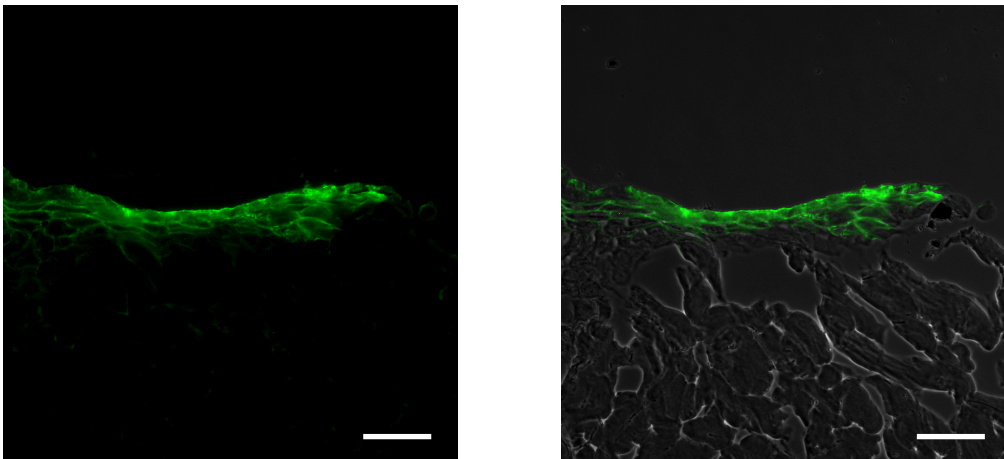
Score 0,1-1 n = 6; Score 1,1-2 n = 6; 2,1-2,9 n = 2; 3-4 n = 17



**Abbildung 4.3.2.7 Immunlokalisierung von Cldn-4 in der regenerierenden Epidermis.**

Links Epifluoreszenzbild und rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der Cldn-4 Lokalisation in den oberen regenerierten Schichten.

Maßstab: 50 µm



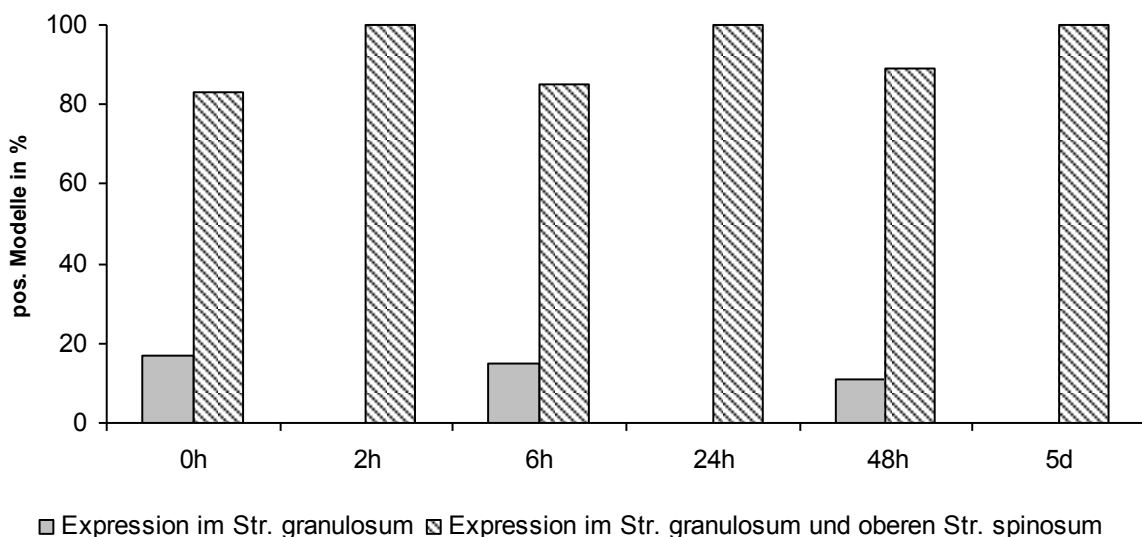
**Abbildung 4.3.2.8 Immunlokalisierung von Cldn-4 in der regenerierenden Epidermis.**  
 Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild.  
 Darstellung einer regenerierenden Epidermis bei einem kleinen Wundheilungsfortschritt mit  
 der Lokalisation von Cldn-4 in allen Schichten.  
 Maßstab: 50 µm

#### 4.3.2.2 Korrelation zwischen der Cldn-4 Expression und verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung

Im vorherigen Abschnitt wurde die Cldn-4 Expression zum Wundheilungsfortschritt korreliert. Folgend geschieht dies nun in Korrelation zu verschiedenen Zeitpunkten.

##### 4.3.2.2.1 Cldn-4 Expressionsmuster in der unbeteiligte Epidermis

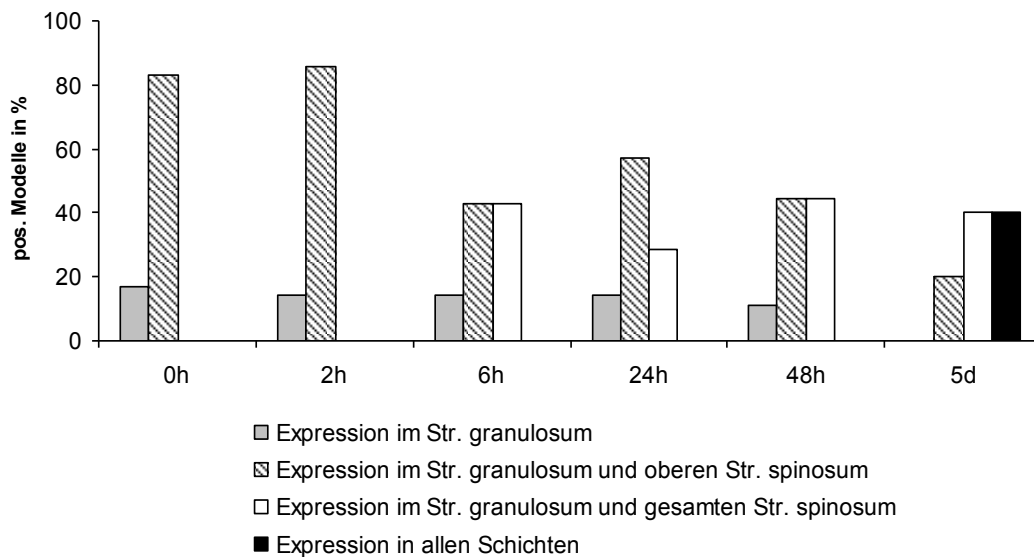
In der unbeteiligten Epidermis ist Cldn-4 auch in Korrelation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung größtenteils im Str. granulosum und teilweise im Str. granulosum und im oberen Str. spinosum lokalisiert. Vergleiche hierzu Kapitel 4.3.2.1.1.



**Abbildung 4.3.2.9 Cldn-4 Expression in der unbeteiligten Epidermis zu verschiedenen Zeitpunkten.**  
 0 h n = 7, 2 h n = 7, 6 h n = 7, 24 h n = 7, 48 h n = 9, 5 d n = 10

#### 4.3.2.2.2 Cldn-4 Expressionsmuster am Wundrand

Am Wundrand zeigt sich Cldn-4 nach 0 h und nach 2 h alle Modelle auf das Str. granulosum oder das Str. granulosum und obere Str. spinosum beschränkt und somit eine Verteilung wie in der gesunden Haut. Ab 6 h beobachtet man zusätzlich einen Anteil, der eine Expression bis in das untere Str. spinosum zeigt. Nach 5 d exprimieren 40 % der Modelle Cldn-4 in allen Schichten. Am Wundrand kann man demnach mit zunehmender Wundheilungszeit einen Trend zur verbreiterten Expression von Cldn-4 am Wundrand beobachten (Abbildung 4.3.2.10). Die statistische Überprüfung ergibt aber weder im linearen Term ( $p = 0,16$ ) noch im quadratischen ( $p = 0,1$ ) Modell ein statistisch signifikantes Ergebnis.



**Abbildung 4.3.2.10 Cldn-4 Expression am Wundrand zu verschiedenen Zeitpunkten.**

0 h n = 6, 2 h n = 7, 6 h n = 7, 24 h n = 7, 48 h n = 9, 5 d n = 10

#### 4.3.2.2.3 Cldn-4 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis

In der regenerierenden Epidermis kann nach 6 h bei 20 %, nach 24 h bei 57 %, nach 48 h bei 56 % und nach 5 d bei 40 % eine Lokalisation von Cldn-4 in allen Schichten beobachtet werden. Nach statistischer Korrelation zwischen der Beobachtungszeit und der Veränderung der Lokalisation in den verschiedenen Schichten zeigt sich aber in der regenerierenden Epidermis mit  $p = 0,76$  linear und mit  $p = 0,642$  quadratisch für Cldn-4 kein statistisch signifikantes Ergebnis.

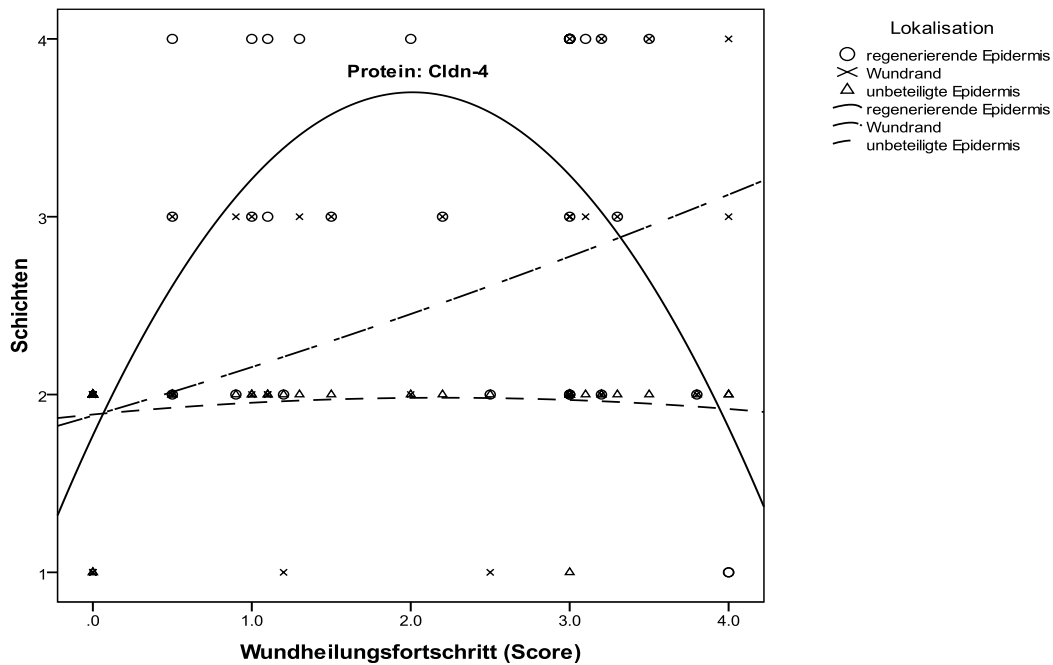


**Abbildung 4.3.2.11 Cldn-4 Expression in der regenerierenden Epidermis zu verschiedenen Zeitpunkten.**

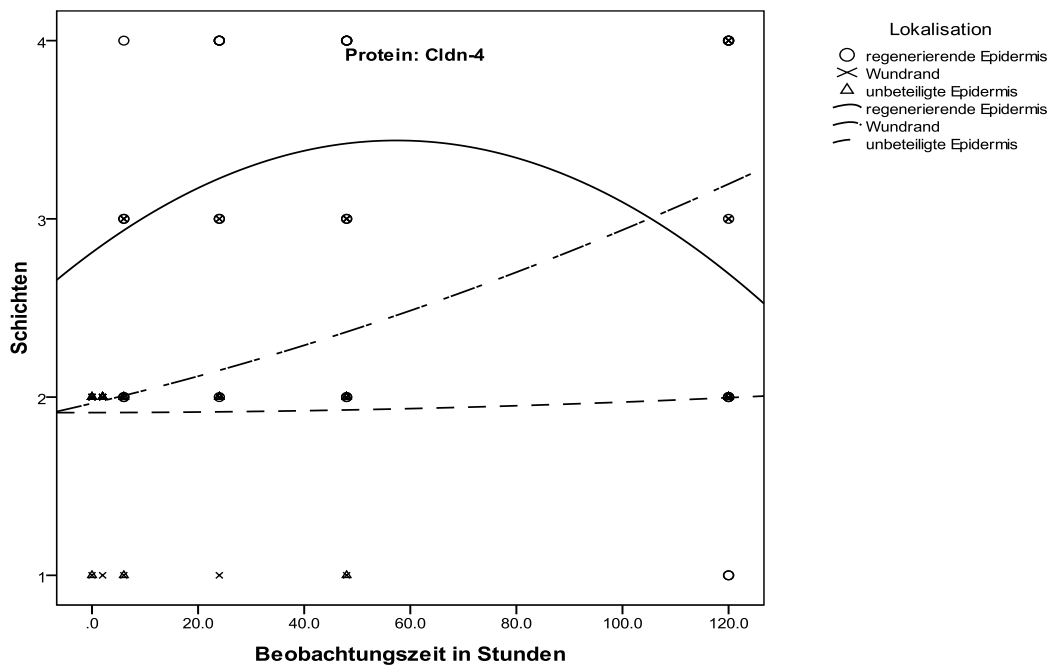
6 h n = 5, 24 h n = 7, 48 h n = 9, 5 d n = 10

#### Fazit Cldn-4 Lokalisation:

Zusammenfassend sieht man also eine statistische Korrelation der Veränderung der Cldn-4 Lokalisation mit dem Wundheilungsfortschritt unabhängig von der Zeit in der regenerierenden Epidermis im quadratischen Modell, d.h. man beobachtet erst eine Zu- und dann wieder eine Abnahme der Expression (Abb. 4.3.2.12). Alle anderen Veränderungen sind nicht statistisch signifikant (Abb. 4.3.2.12 und 4.3.2.13).



**Abbildung 4.3.2.12** Veränderung der Cldn-4 Expression in verschiedenen Schichten in Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes, d. h. dem Wundheilungsscore in einer quadratischen Funktion Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberen Str. spinosum bzw. untere Schichten, 3= Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten

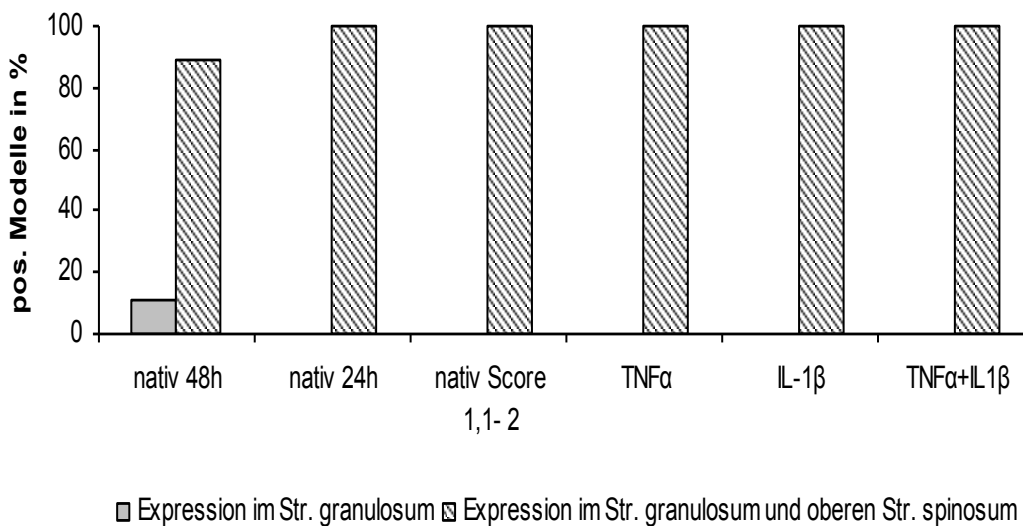


**Abbildung 4.3.2.13** Veränderung der Cldn-4 Expression in verschiedenen Schichten in Abhängigkeit der Beobachtungszeit in Stunden in einer quadratischen Funktion Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberen Str. spinosum bzw. untere Schichten, 3= Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten

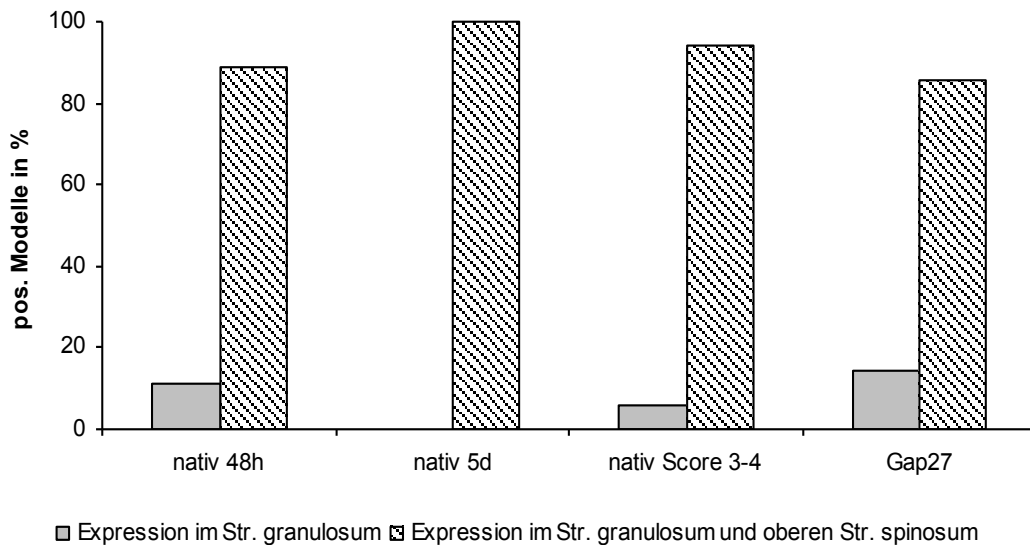
## 4.3.2.3 Cldn-4 Expression 48 h nach der Zugabe von Zytokinen und Gap27

## 4.3.2.3.1 Unbeteiligten Epidermis

Wie in Abbildung 4.3.2.14 und 4.3.2.15 zu sehen ist, zeigen alle Modelle, auch unter dem Einfluss von Zytokinen und Gap27 im Vergleich zur Kontrolle, in allen Kombinationen eine Cldn-4 Expression in der unbeteiligten Epidermis meist im Str. granulosum und oberen Str. spinosum. Hierbei spielt es keine Rolle, ob ein Zytokin einzeln oder beide Zytokine in Kombination appliziert worden sind.



**Abbildung 4.3.2.14 Vergleich der Cldn-4 Expression in der unbeteiligten Epidermis zwischen Kontroll-Modellen zu verschiedenen Zeitpunkten und Modellen, die mit TNFα und IL-1β behandelt wurden.** nativ 48 h n = 10; nativ 24 h n = 9; nativ Score 1,1-2 n = 4, TNFα n = 7; IL-1β n = 8; TNFα+IL-1β n = 8



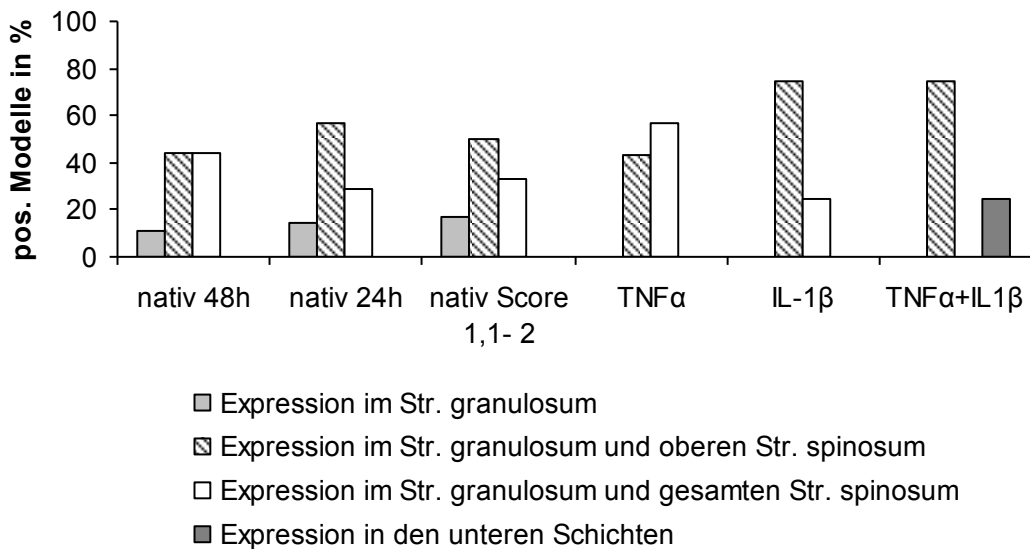
**Abbildung 4.3.2.15 Vergleich der Cldn-4 Expression in der unbeteiligten Epidermis zwischen Kontroll-Modellen und Modellen nach Zugabe von Gap27** nativ 48 h n = 9; nativ 5 d n = 10; nativ Score 3-4 n = 12; Gap27 n = 7.

#### 4.3.2.3.2 Wundrand

##### Zytokine

Vergleicht man die Ergebnisse, die man nach Zugabe von Zytokinen nach 48 h erhält, mit den Kontroll-Modellen nach 48 h, so beobachtet man, dass nach Zugabe von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  und  $\text{TNF}\alpha$ +IL-1 $\beta$  in keinem Modell eine Beschränkung ausschließlich auf das Str. granulosum zu finden ist, das bei den Kontrollmodellen in 11,2% vorhanden ist. Darüber hinaus findet man bei der Kombination der Zytokine in 25% der Modelle eine Lokalisation in den unteren Schichten, die in keiner anderen Kategorie zu finden ist. Nach der statistischen Analyse zeigt sich allerdings keine statistische Relevanz für diese Veränderungen im Vergleich zur 48 h Kontrolle. Auch im Vergleich zur 24 h und Score 1,1-2 Kontrolle beobachtet man keine deutlichen Veränderungen.





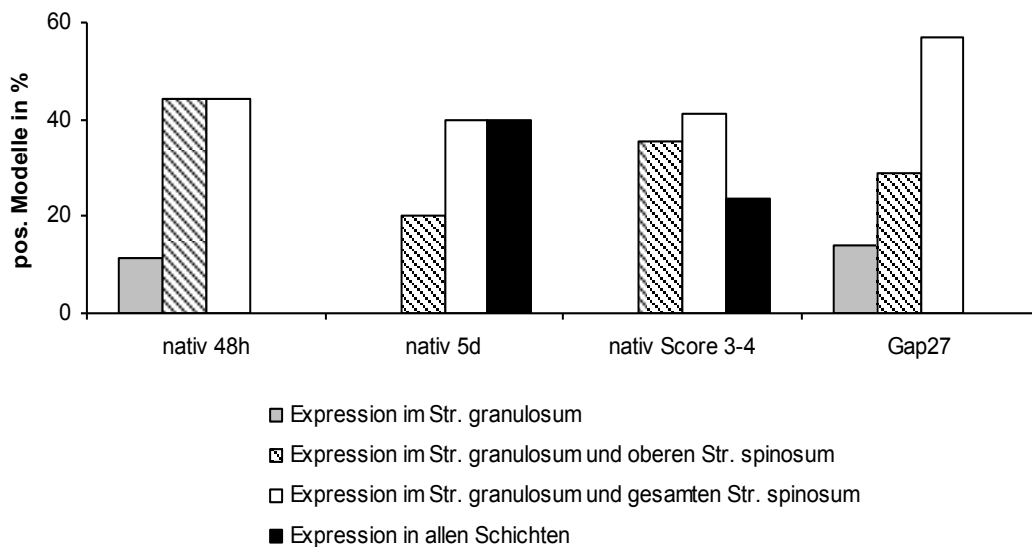
**Abbildung 4.3.2.16 Cldn-4 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Zytokinen**  
 nativ 48 h n = 10; nativ 24 h n = 9; nativ Score 1,1-2 n = 6, TNFα n = 7; IL-1β n = 8;  
 TNFα+IL-1β n = 8

**Tabelle 4.3.2.1 Cldn-4 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Zytokinen in Prozent.**

	nativ 48 h	nativ 24 h	nativ Score 1,1-2	TNFα	IL-1β	TNFα+IL 1β
<b>Expression im Str. granulosum</b>	11,2	14,2	17	0	0	0
<b>Expression im Str. granulosum und oberen Str. spinosum</b>	44,4	57,2	50	42,9	75	75
<b>Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum</b>	44,4	28,6	33	57,1	25	0
<b>Expression in den unteren Schichten</b>	0	0	0	0	0	25

### Gap27

48 h Kontroll-Modelle unterscheiden sich nicht sehr von solchen, die mit Gap27 behandelt worden sind. Bei den Kontroll-Modellen mit einem Score von 3-4 sieht man einen Anteil, der eine Expression in allen Schichten zeigt. Mit Gap27 behandelte Modelle weisen diese Beobachtung nicht auf. Nach der Behandlung mit Gap27 ist der Anteil der Modelle, die eine Lokalisation bis in das gesamte Str. spinosum zeigt, mit 57 % am Höchsten. Siehe hierzu Abbildung 4.3.2.17 und die Tabelle 4.3.2.2. In der statistischen Auswertung zeigen sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse.



**Abbildung 4.3.2.17 Cldn-4 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Gap27.** nativ 48 h n = 9; nativ 5 d n = 10, nativ Score 3-4 n = 12; Gap27 n = 7.

**Tabelle 4.3.2.2 Cldn-4 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Gap27 in Prozent.**

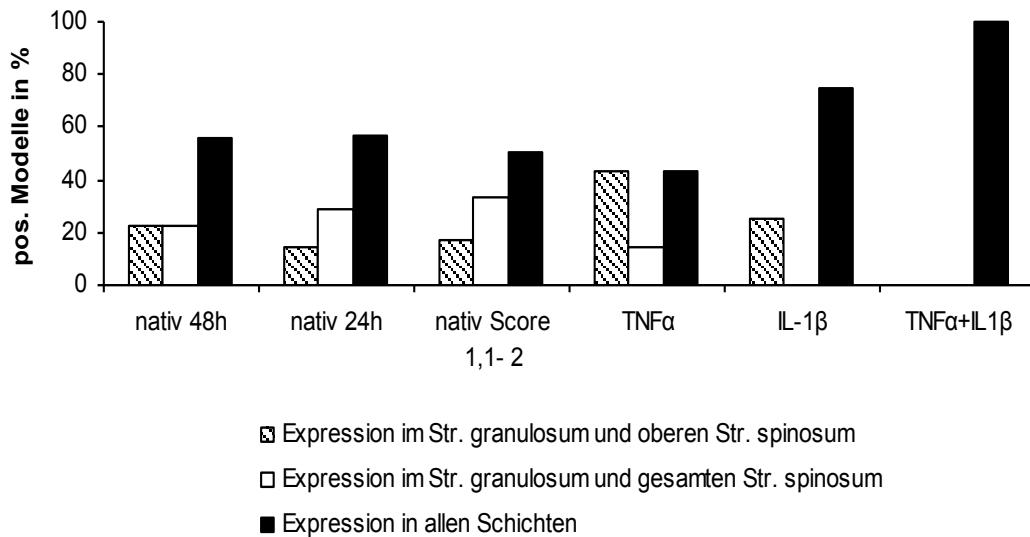
	nativ 48h	nativ 5d	Nativ Score 3-4	Gap27
Expression im Str. granulosum	11,2	0	0	14,2
Expression im Str. granulosum und oberen Str. spinosum	44,4	20	35,3	28,7
Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum	44,4	40	41,2	57,1
Expression in allen Schichten	0	40	23,5	0

#### 4.3.2.3.3 Regenerierende Epidermis

##### Zytokine

In der regenerierenden Epidermis weisen die Modelle, die nur mit  $TNF\alpha$  behandelt worden sind kaum Unterschiede zu Kontroll-Modellen auf: Es gibt Modelle, die Cldn-4 nur im Str. granulosum zeigen, welche die es bis in das obere und welche, die es im gesamten Str. spinosum exprimieren. Wird aber IL-1 $\beta$  appliziert zeigen 75 % und in der Kombination aus IL-1 $\beta$  und  $TNF\alpha$  100 % eine Expression von Cldn-4 in allen Schichten. Diese deutliche Veränderung wird auch nicht in Kontrollmodellen nach 24 h bzw. in Modellen mit einem Score von 1,1-2 beobachtet.

Die statistische Analyse zeigt mit  $p = 0,026$  ein statistisch signifikantes Ergebnis zwischen den 48 h Kontroll-Modellen und den Modellen, die mit IL-1 $\beta$  und  $TNF\alpha$  behandelt worden sind. Darüber hinaus findet man auch einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit  $TNF\alpha$  und IL-1 $\beta$  im Vergleich zu  $TNF\alpha$  alleine ( $p = 0,007$ ) und IL-1 $\beta$  alleine ( $p = 0,028$ ).



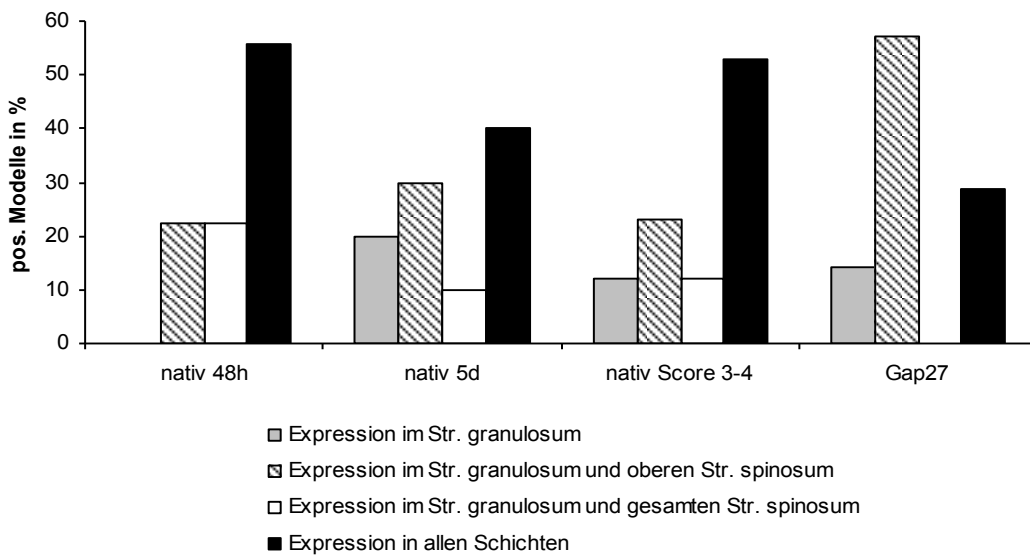
**Abbildung 4.3.2.18 Cldn-4 Expression in der regenerierenden Epidermis nach Zugabe von Zytokinen.** nativ 48 h n = 10; nativ 24 h n = 9; nativ Score 1,1-2 n = 6, TNFα n = 7; IL-1β n = 8; TNFα+IL-1β n = 8

Tabelle 4.3.2.3 Cldn-4 Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Zytokinen in Prozent.

	nativ 48 h	nativ 24 h	nativ Score 1,1-2	TNFα	IL-1β	TNFα +IL1β
<b>Expression im Str. granulosum</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Expression im Str. granulosum und oberen Str. spinosum</b>	22,2	14,2	17	42,9	25	0
<b>Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum</b>	22,2	28,7	33	14,2	0	0
<b>Expression in allen Schichten</b>	55,6	57,1	50	42,9	75	100

### Gap27

Wie in Abbildung 4.3.2.19 zu sehen ist, kann man in der regenerierenden Epidermis beobachten, dass unter dem Einfluss von Gap27 die meisten Modelle ausschließlich eine Cldn-4 Lokalisation in den oberen Schichten zeigen während man in den Kontroll-Modellen häufig eine Verbreiterung der Expression beobachtet. Der Unterschied der Cldn-4 Lokalisation in der regenerierenden Epidermis im Vergleich zur 48 h Kontrolle ist statistisch signifikant ( $p = 0,006$ ).



**Abbildung 4.3.2.19 Cldn-4 Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Gap27.** nativ 48 h n = 9; nativ 5 d n = 10; nativ Score 3-4 n = 12; Gap27 n = 7.

**Tabelle 4.3.2.4 Cldn-4 Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Gap27 in Prozent.**

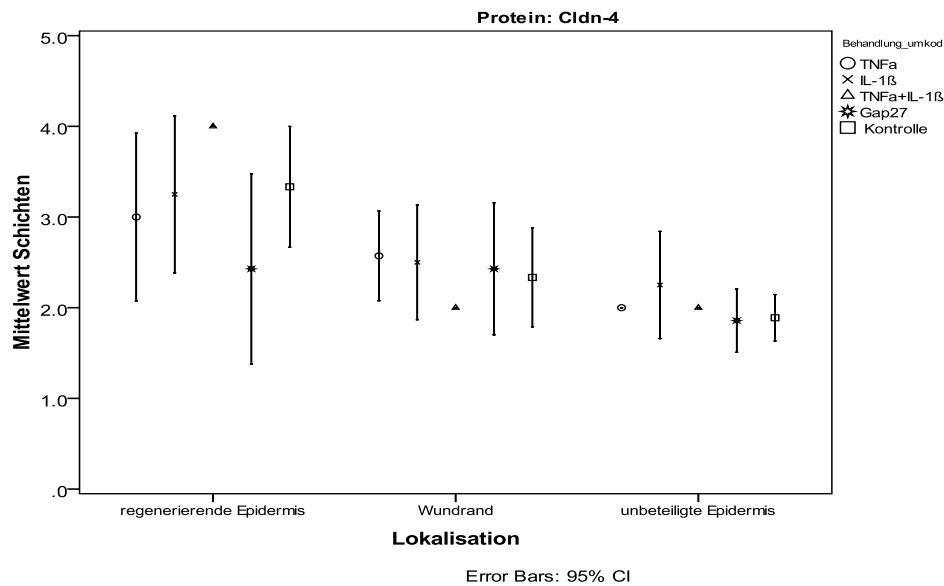
	nativ 48h	nativ 5d	nativ Score 3-4	Gap27
Expression im Str. granulosum	0	20	12	14,3
Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum	22,2	30	23	57,1
Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum	22,2	10	12	0
Expression in allen Schichten	55,6	40	53	28,6

Auch hier, in der regenerierenden Epidermis, entspricht das Expressionsmuster weder den nativen Kontroll-Modellen zu 48 h noch den nativen Kontroll-Modellen mit einem vergleichbaren Wundheilungsscore. Somit kann man von einem direkten Einfluss von Gap27 auf die Cldn-4 Expression ausgehen.

#### **Fazit der Wirkung der verschiedenen Behandlungen auf die Cldn-4 Lokalisation:**

In nachstehender Abbildung ist der jeweilige Mittelwert der Schichten für die einzelnen Behandlungen an verschiedenen Wundlokalisationen für Cldn-4 aufgezeigt. In der regenerierenden Epidermis sieht man, dass durchschnittlich in den Kontroll-Modellen und in den IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  behandelten Modellen Cldn-4 im Str. spinosum und im Str. granulosum vorhanden ist. Die Lokalisation in den mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  behandelten Modellen ist hingegen in allen Modellen in allen Schichten, ein Unterschied, der statistisch signifikant zur Kontrolle ( $p=0,026$ ) aber auch zu den Modellen, die nur mit einem der beiden Cytokine behandelt wurden ( $p=0,007$  und  $p=0,028$ ), ist. Die mit Gap27 behandelten Modelle sind hingegen im Durchschnitt eher auf das Str. granulosum und das obere Str. spinosum beschränkt. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant zur Kontrolle ( $p=0,006$ ) zu TNF $\alpha$ +IL-

1 $\beta$  ( $p < 0,001$ ) und zu IL-1 $\beta$  ( $p = 0,017$ ). Am Wundrand findet sich Cldn-4 im Durchschnitt bei allen Behandlungen und in der Kontrolle im Str. granulosum und im gesamten bzw. im oberen Str. spinosum. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede.



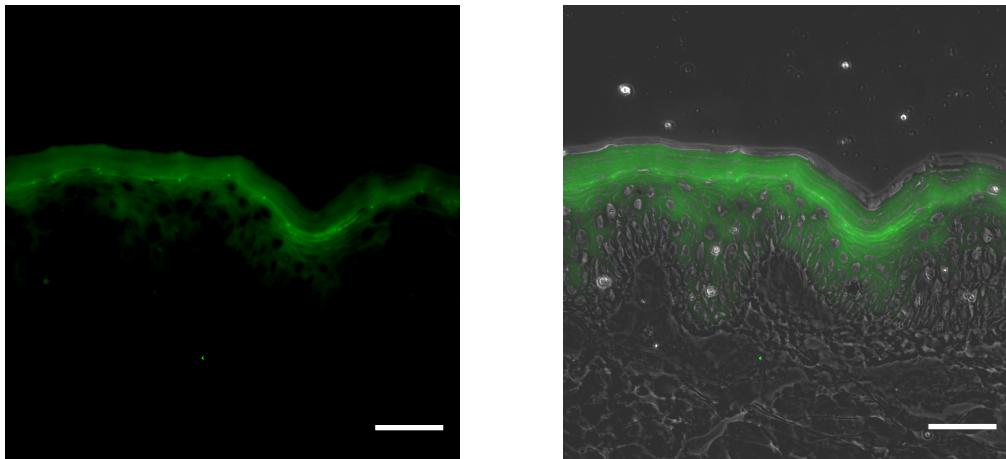
**Abbildung 4.3.2.20 Mittelwert der Cldn-4 Expression in verschiedenen Schichten mit unterschiedlichen Behandlungen an verschiedenen Wundlokalisationen** Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum bzw. untere Schichten, 3= Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten

#### 4.3.3 Korrelation zwischen der Ocln Expression und Wundheilungsscore

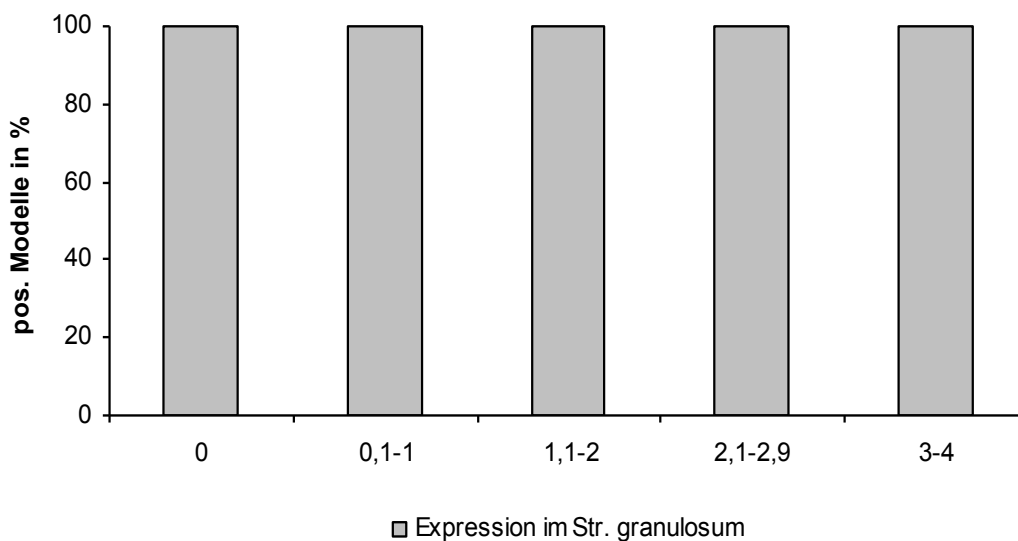
##### 4.3.3.1 Ocln Expressionsmuster in der unbeteiligten Epidermis

Ocln wurde im Str. granulosum der menschlichen Haut beschrieben (Pummi et al. 2001, Brandner et al. 2002, Langbein et al. 2002). Dies konnte auch ich in meinen Untersuchungen in der unbeteiligten Epidermis im *ex vivo* Wundmodell bestätigen (siehe Abbildungen 4.3.3.1 und 4.3.3.2).

Die Ocln Expression in der unbeteiligten Epidermis wurde als Kontrolle untersucht. Meine Untersuchungen an insgesamt 52 Wundmodellen zeigen, dass, unabhängig vom Wundheilungsfortschritt, der als Wundheilungsscore in Abbildung 4.3.3.2 wiedergegeben wird, die Ocln Expression in der unbeteiligten Epidermis der von unverwundeter Haut entsprach, d. h. ein Immunfluoreszenzsignal an den Zell-Zell-Grenzen im Str. granulosum nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.3.31).



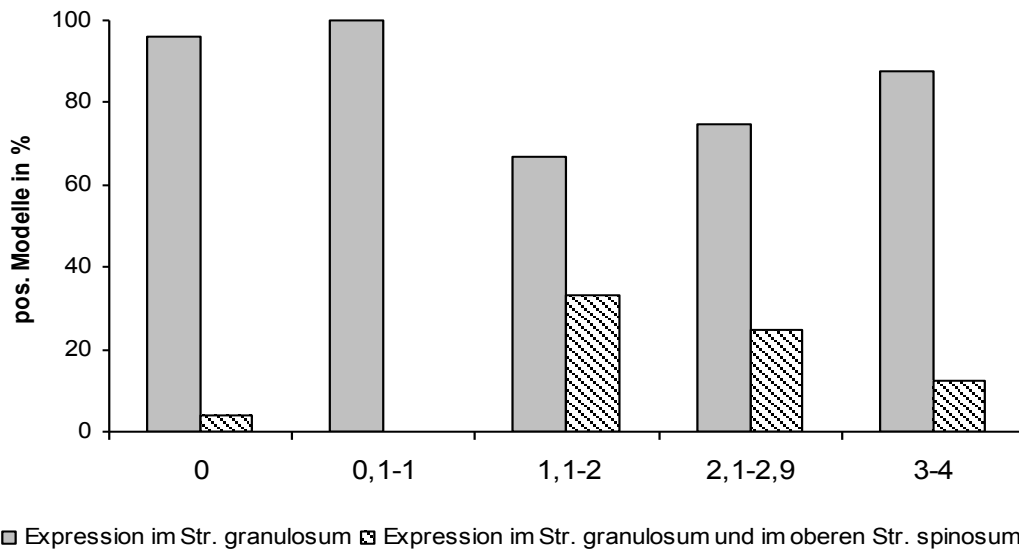
**Abbildung 4.3.3.1 Immunlokalisation von Ocln in der unbeteiligten Epidermis.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der Ocln Expression an den Zell-Zell-Grenzen des Str. granulosums. Maßstab: 50  $\mu$ m



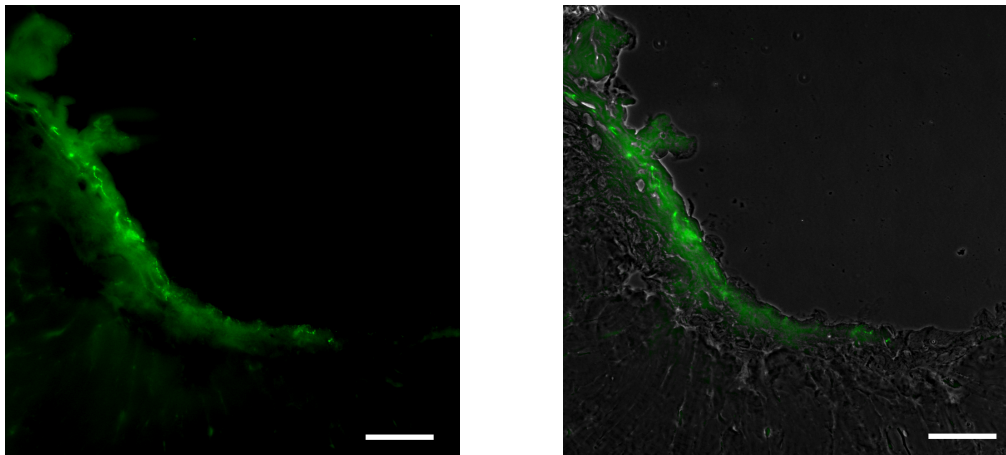
**Abbildung 4.3.3.2 Ocln Expression in der unbeteiligten Epidermis bei verschiedenen Scorebereichen.** Score 0 n = 22 ; Score 0,1-1 n = 7; Score 1,1-2 n = 3; 2,1-2,9 n = 4; 3-4 n = 16

#### 4.3.3.2 Ocln Expressionsmuster am Wundrand

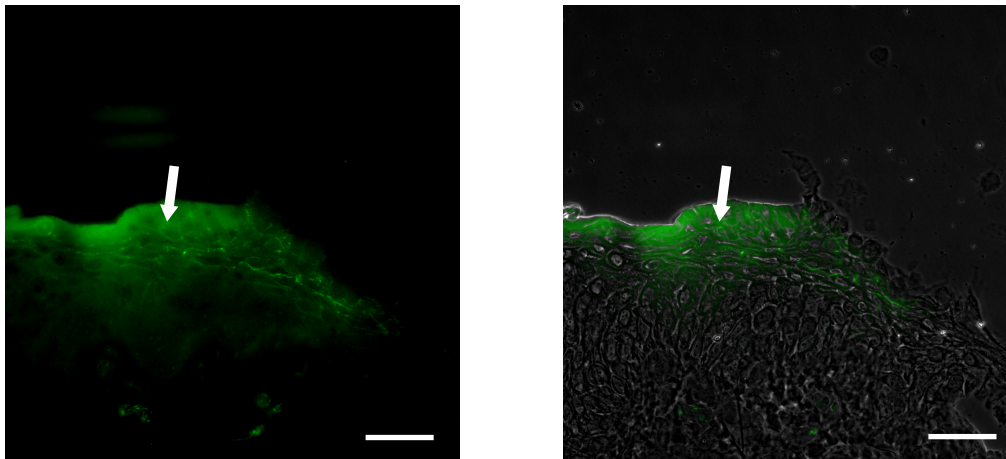
Bei einem Score von 0 zeigen 95% der Modelle am Wundrand eine Ocln Expression im Str. granulosum, 5% im Str. granulosum und oberem spinosum. Bei einem Score von 0,1-1 zeigen alle Modelle eine Beschränkung auf das Str. granulosum. Dahingegen zeigen bei einem Score von 1,1-2 33 %, bei dem Scorebereich 2,1-2,9 25 % und bei einem Score von 3-4 13 % der Modelle eine verbreiterte Expression bis in das obere Str. spinosum. Mit einem p-Wert von  $p = 0,513$  im quadratischen Modell und  $p = 0,694$  im linearen Term zeigt sich für Ocln am Wundrand in der Korrelation zum Wundheilungsfortschritt aber kein statistisch signifikantes Ergebnis (Siehe auch 4.3.3.12)



**Abbildung 4.3.3.3 Ocln Expression am Wundrand bei verschiedenen Scorebereichen.**  
 Score 0 n = 22 ; Score 0,1-1 n = 7; Score 1,1-2 n = 3; 2,1-2,9 n = 4; 3-4 n = 16



**Abbildung 4.3.3.4 Immunlokalisierung von Ocln am Wundrand.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der Ocln Lokalisation am Wundrand im Str. granulosum bei einem kleinen Wundheilungsfortschritt. Maßstab: 50 µm

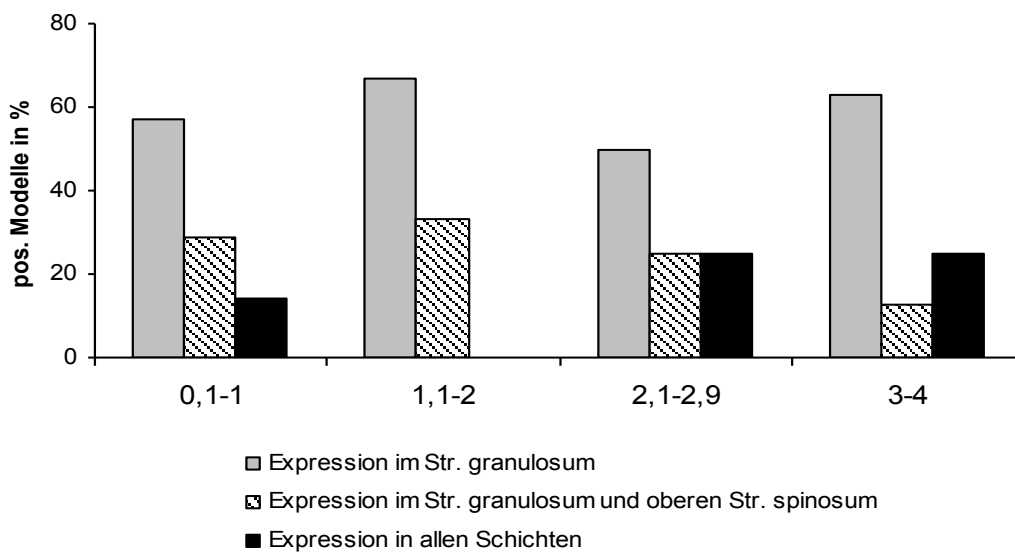


**Abbildung 4.3.3.5 Immunlokalisierung von Ocln am Wundrand.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Der Pfeil zeigt auf die verbreiterte Ocln Lokalisation am Wundrand im Str. granulosum und im oberen Str. spinosum.  
Maßstab: 50 µm

#### 4.3.3.3 Ocln Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis

Die regenerierende Epidermis zeigt eine Lokalisation von Ocln über das Str. granulosum hinaus bereits ab einem geringen Wundheilungsfortschritt, z. T. wird es sogar in allen Schichten gefunden.

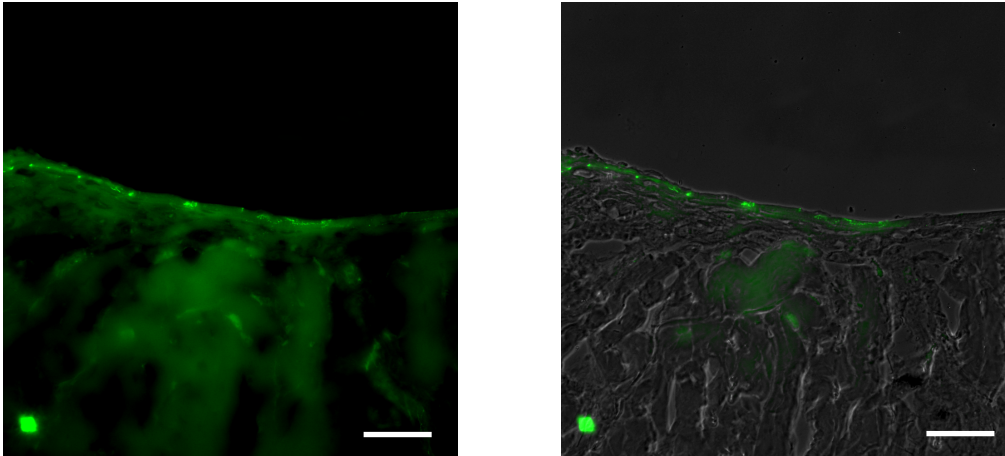
Im linearen Ansatz konnte mit  $p = 0,259$  und im quadratischen Ansatz mit  $p = 0,093$  für Ocln in der regenerierenden Epidermis in der Korrelation zum Wundheilungsfortschritt kein statistisch signifikantes Ergebnis gefunden werden.



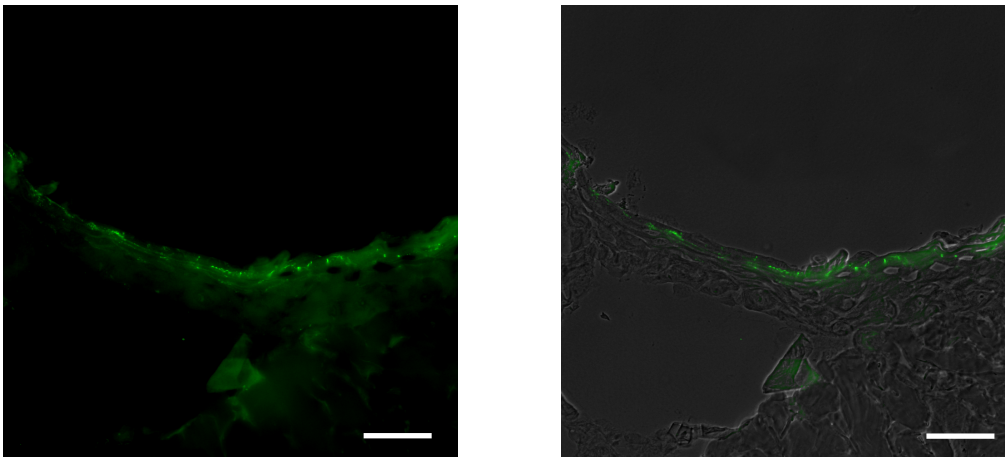
**Abbildung 4.3.3.6 Ocln Expression in der regenerierenden Epidermis bei verschiedenen Scorebereichen.**

Score 0,1-1 n = 7; Score 1,1-2 n = 3; 2,1-2,9 n = 4; 3-4 n = 16





**Abbildung 4.3.3.7 Immunlokalisierung von Ocln in der regenerierenden Epidermis.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der Ocln Lokalisation im Str. granulosum einer regenerierten Epidermis bei einer einschichtig zugeheilten Wunde. Maßstab: 50  $\mu$ m

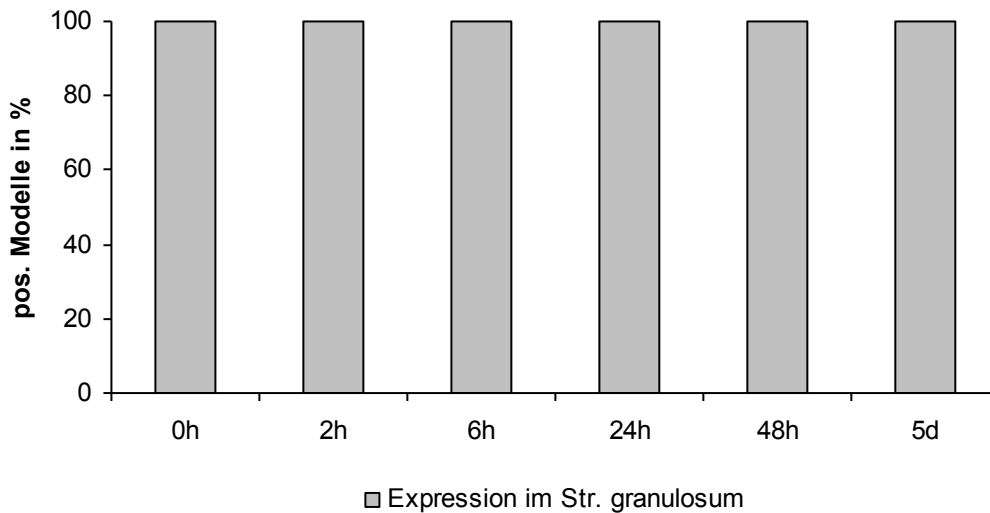


**Abbildung 4.3.3.8 Immunlokalisierung von Ocln in der regenerierenden Epidermis.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der Ocln Lokalisation im Str. granulosum einer regenerierten Epidermis bei einer mehrschichtig zugeheilten Wunde. Maßstab: 50  $\mu$ m

#### 4.3.3.2 Korrelation zwischen der Ocln Expression und verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung

##### 4.3.3.2.1 Ocln Expressionsmuster in der unbeteiligte Epidermis

In der unbeteiligten Epidermis ist Ocln auch in Korrelation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung ausschließlich im Str. granulosum lokalisiert.

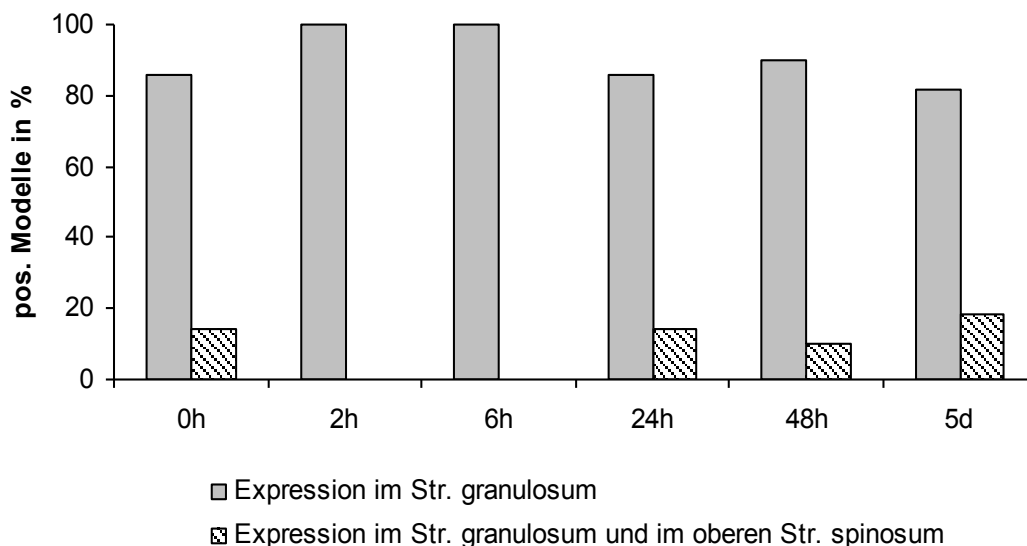


**Abbildung 4.3.3.9 Ocln Expression in der unbeteiligten Epidermis zu verschiedenen Zeitpunkten**

0 h n = 7, 2 h = 11, 6 h n = 7, 24 h n = 7, 48 h n = 9, 5 d n = 11

#### 4.3.3.2.2 Ocln Expressionsmuster am Wundrand

Am Wundrand zeigt sich nach 0 h, 24 h, 48 h und 5 d in 14,3, 14,3, 10 und 18,2% der Modelle eine Lokalisation von Ocln bis in das obere Str. spinosum während es in den anderen Modellen auf das Str. granulosum beschränkt ist. Modelle nach 2 und nach 6 h zeigen Ocln ausschließlich im Str. granulosum. Zwischen der Beobachtungszeit und der Veränderung der Schichten am Wundrand zeigt sich mit  $p = 0,916$  im quadratischen Ansatz und mit  $p = 0,856$  kein statistisch signifikantes Ergebnis (Siehe auch 4.5.2.4).



**Abbildung 4.3.3.10 Ocln Expression am Wundrand zu verschiedenen Zeitpunkten.**

0 h n = 7, 2 h = 11, 6 h n = 7, 24 h n = 7, 48 h n = 9, 5 d n = 11

#### 4.3.3.2.3 Ocln Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis

In der regenerierenden Epidermis konnten ab 6 h zu allen Zeitpunkten Modelle gesehen werden, die Ocln im Str. granulosum und im oberen Str. spinosum exprimierten. Ab 24 h gibt es dann Modelle, die eine Ocln Expression in allen neu gebildeten Schichten zeigen.

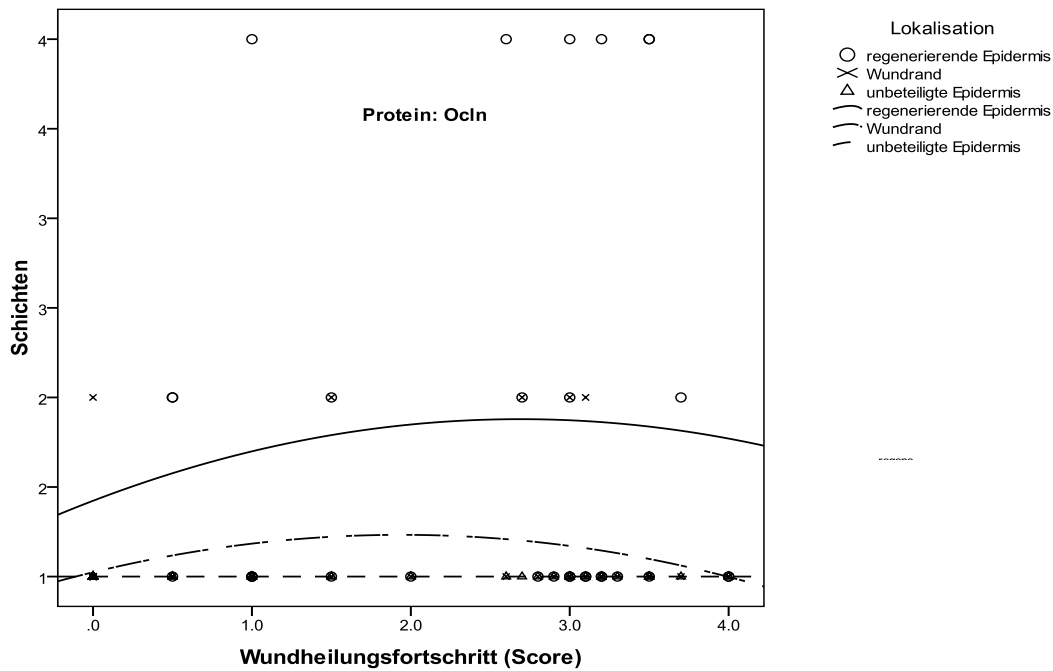
Statistisch gesehen, zeigt sich aber für Ocln bei Korrelation zwischen der Beobachtungszeit und der Veränderung der Schichten in der regenerierenden Epidermis in der linearen Analyse mit  $p = 0,284$  und in der quadratischen mit  $p = 0,145$  unter Berücksichtigung des Wundheilungsfortschritts kein statistisch signifikantes Ergebnis. Die Veränderung der Lokalisation von Ocln scheint also nicht von der Wundheilungszeit abzuhängen.



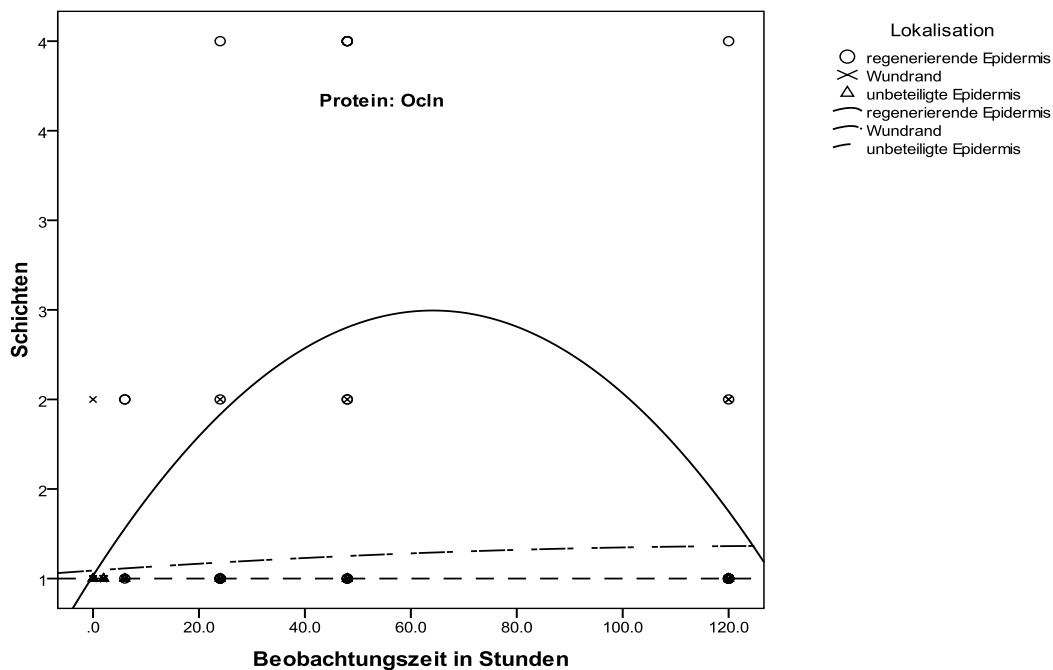
**Abbildung 4.3.3.11 Ocln Expression in der regenerierenden Epidermis zu verschiedenen Zeitpunkten.** 6 h n = 3, 24 h n = 7, 48 h n = 9, 5 d n = 11

#### Fazit Ocln Lokalisation:

Zusammenfassend kann man also an keinem Wundabschnitt, d.h. in der unbeteiligten Epidermis, am Wundrand oder in der regenerierenden Epidermis, eine statistische Korrelation der Veränderung der Ocln Lokalisation mit dem Wundheilungsfortschritt unabhängig von der Zeit oder mit der Zeit unabhängig vom Wundheilungsfortschritt feststellen. Siehe hierzu auch Abbildungen 4.3.3.12 und 4.3.3.13.



**Abbildung 4.3.3.12** Veränderung der Ocln Expression in verschiedenen Schichten in Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes, d. h. dem Wundheilungsscore in einer quadratischen Funktion Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberen Str. spinosum bzw. untere Schichten, 3= Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten

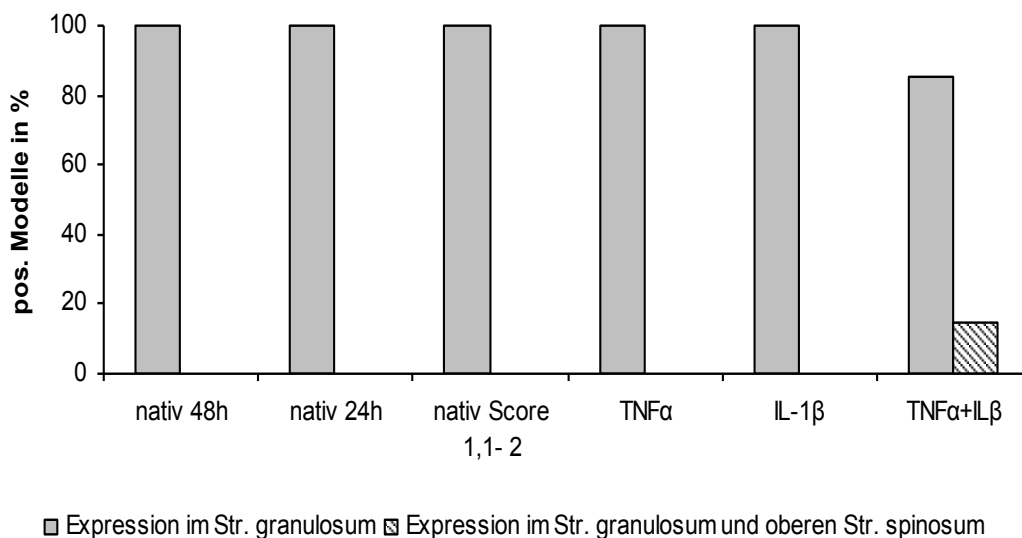


**Abbildung 4.3.3.13** Veränderung der Ocln Expression in verschiedenen Schichten in Abhängigkeit der Beobachtungszeit in Stunden in einer quadratischen Funktion Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberen Str. spinosum bzw. untere Schichten, 3= Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten

## 4.3.3.3 Ocln Expression 48 h nach der Zugabe von Zytokinen und Gap27

## 4.3.3.3.1 Unbeteiligten Epidermis

Wie in Abbildung 4.3.3.14 und 4.3.3.15 zu sehen ist, zeigen alle Modelle, auch unter dem Einfluss von Zytokinen und Gap27, im Vergleich zu Kontroll-Modellen, in allen Kombinationen eine Ocln Expression in der unbeteiligten Epidermis im Str. granulosum. Die einzige Ausnahme ist, dass man nach der Behandlung mit beiden Zytokinen, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , einen kleinen Anteil an Modellen beobachten kann, der eine Lokalisation von Ocln bis in das obere Str. spinosum zeigt. Dies ist aber nicht statistisch signifikant ( $p = 0,533$ ).



**Abbildung 4.3.3.14 Vergleich der Ocln Expression in der unbeteiligten Epidermis zwischen Kontroll-Modellen zu verschiedenen Zeitpunkten und Modellen, die mit TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  behandelt wurden** nativ 48 h n = 9; nativ 24 h n = 7; nativ Score 1,1-2 n = 4, TNF $\alpha$  n = 7; IL-1 $\beta$  n = 8; TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  n = 8

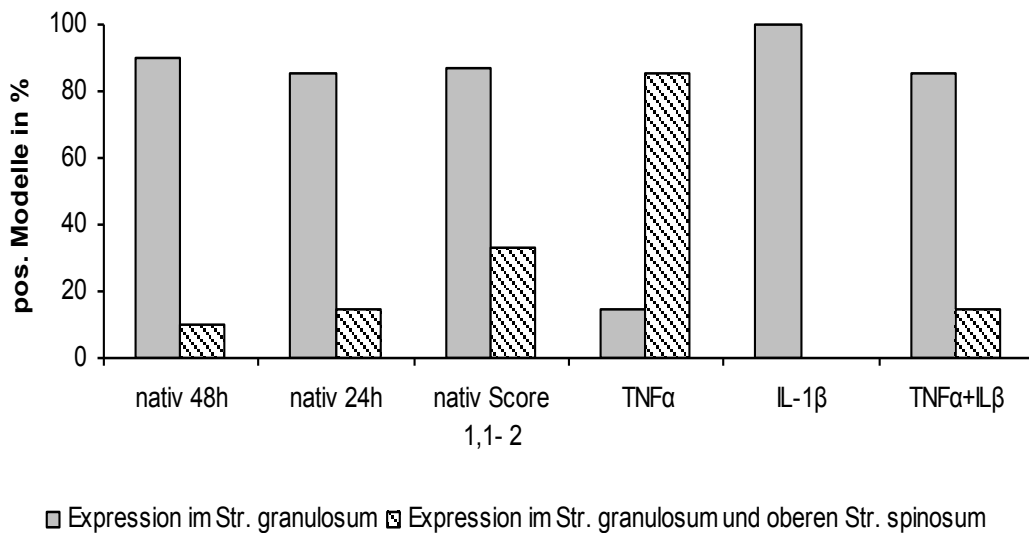


**Abbildung 4.3.3.15 Vergleich der Ocln Expression in der unbeteiligten Epidermis zwischen nativen Kontroll-Modellen und Modellen nach Zugabe von Gap27** nativ 48 h n = 9; nativ 5 d n = 11; nativ Score 3-4 n = 17; Gap27 n = 7.

#### 4.3.3.3.2 Wundrand

##### Zytokine

Vergleicht man die Ocln- Expression, die man nach Zugabe von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  nach 48 h erhält, mit den Kontroll-Modellen, so beobachtet kaum einen Einfluss auf die Lokalisation von Ocln: In Kontroll- und in den behandelten Modellen zeigt der Hauptanteil eine Lokalisation von Ocln ausschließlich im Str. granulosum. Wird hingegen nur TNF $\alpha$  appliziert, so sieht man einen deutlichen Effekt: 85 % der Modelle zeigen eine Ocln Expression, die bis in das obere Str. spinosum reicht. Diese Modelle zeigen mit  $p = 0,011$  im Vergleich zu Kontroll- Modellen einen signifikanten Unterschied. Der Unterschied zu IL-1 $\beta$  ( $p = 0,022$ ) und TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  ( $p = 0,039$ ) ist ebenfalls statistisch signifikant.



**Abbildung 4.3.3.16 Ocln Expression am Wundrand nach der Zugabe von Zytokinen.**

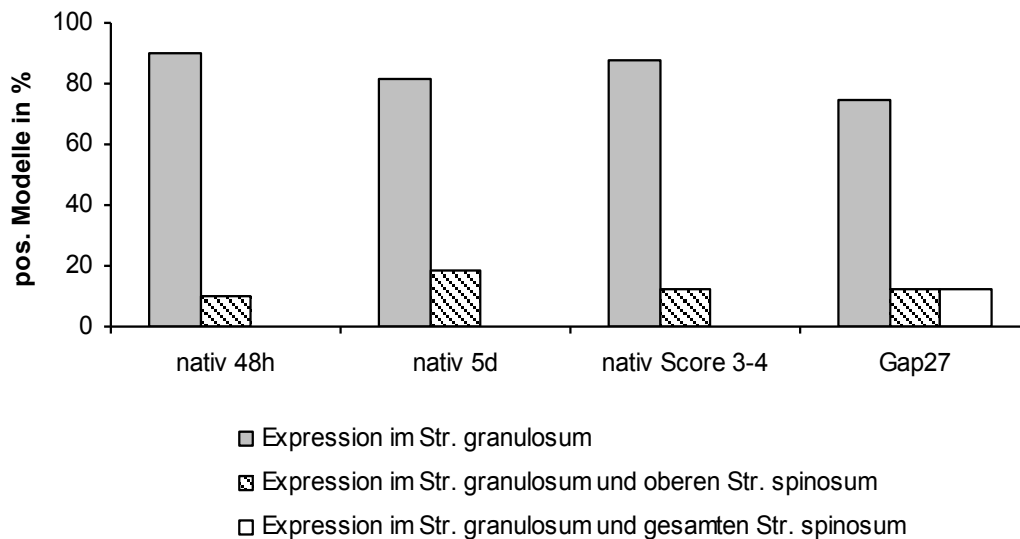
nativ 48 h n = 9; nativ 24 h n = 7; nativ Score 1,1-2 n = 4, TNFα n = 7; IL-1β n = 8; TNFα+IL-1β n = 8

**Tabelle 4.3.3.1 Ocln Expression am Wundrand nach der Zugabe von Zytokinen in Prozent.**

	nativ 48 h	nativ 24 h	nativ Score 1,1-2	TNFα	IL-1β	TNFα+ILβ
<b>Expression im Str. granulosum</b>	90	85,7	87	14,4	100	85,6
<b>Expression im Str. granulosum und oberen Str. spinosum</b>	10	14,3	33	85,6	0	14,4

### Gap27

Mit Gap27 behandelte Modelle unterscheiden sich nicht sehr von Modellen, die die gleiche Wundheilungszeit oder den gleichen Wundheilungsfortschritt haben. Lediglich der Anteil der nach der Behandlung mit Gap27 eine verbreiterte Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum zeigt, steigt auf 12,5 %. Siehe hierzu Abbildung 4.3.3.17 und Tabelle 4.3.3.2. Die statistische Auswertung zeigt keine statistisch signifikanten Veränderungen von Ocln am Wundrand nach der Behandlung mit Gap27.



**Abbildung 4.3.3.17 Ocln Expression am Wundrand nach der Zugabe von Gap27.** nativ 48 h n = 9; nativ 5 d n = 11; nativ Score 3-4 n = 17; Gap27 n = 7.

**Tabelle 4.3.3.2 Ocln Expression am Wundrand nach der Zugabe von Gap27 in Prozent.**

	nativ 48h	nativ 5d	nativ Score 3-4	Gap27
<b>Expression im Str. granulosum</b>	90	81,8	87,5	75
<b>Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum</b>	10	18,2	12,5	12,5
<b>Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum</b>	0	0	0	12,5

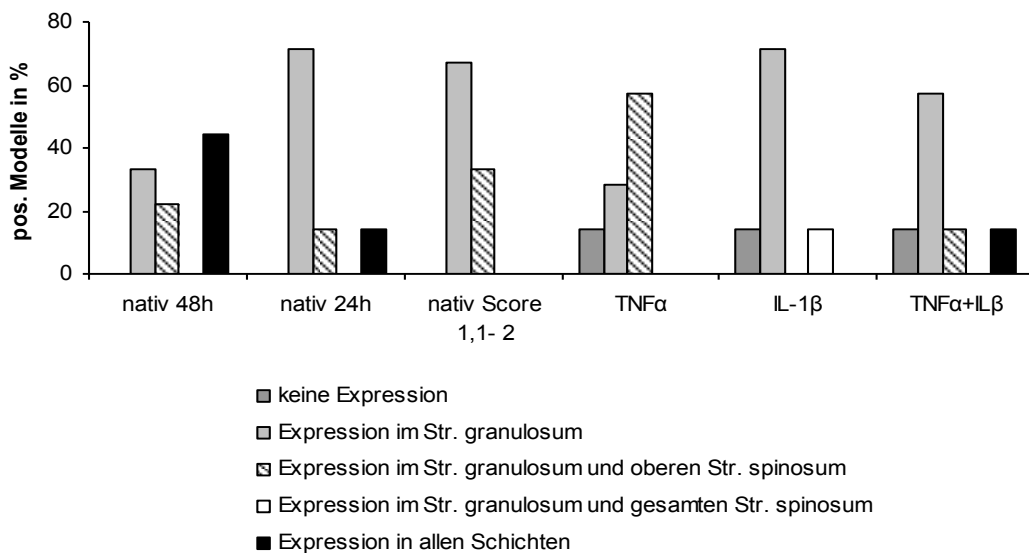
Da die Ocln Expression am Wundrand nach 48 h mit Gap27 den Kontroll-Modellen nach 48 h und den Kontroll-Modellen mit dem entsprechenden Wundheilungsscore (2,1-2,9) in etwa gleicht, ist zu vermuten, dass Gap27 selbst keinen Einfluss auf die Expression von Ocln hat.

#### 4.3.3.3.3 Regenerierende Epidermis

##### Zytokine

In der regenerierenden Epidermis weisen 44 % der 48 h Modelle eine Expression in allen Schichten auf. Diese Lokalisation kann in TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  behandelten Modelle gar nicht und in TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  behandelten Modellen nur in geringerem Umfang gesehen werden. Auffällig ist darüber hinaus, dass bei allen 3 Behandlungen ein Anteil von 14,3 % von Modellen mit einer kompletten Abwesenheit von Ocln in der regenerierenden Epidermis gefunden werden. Die statistische Analyse zeigt statistisch signifikanten Veränderungen von Ocln in der regenerierenden Epidermis nach allen Behandlungen: TNF $\alpha$ : p = 0,025, IL-1 $\beta$  : p = 0,005, TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$ : p = 0,016.





**Abbildung 4.3.3.18 Ocln Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Zytokinen.** nativ 48 h n = 9; nativ 24 h n = 7; nativ Score 1,1-2 n = 4, TNFα n = 7; IL-1β n = 8; TNFα+IL-1β n = 8

Tabelle 4.3.3.3 Ocln Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Zytokinen in Prozent.

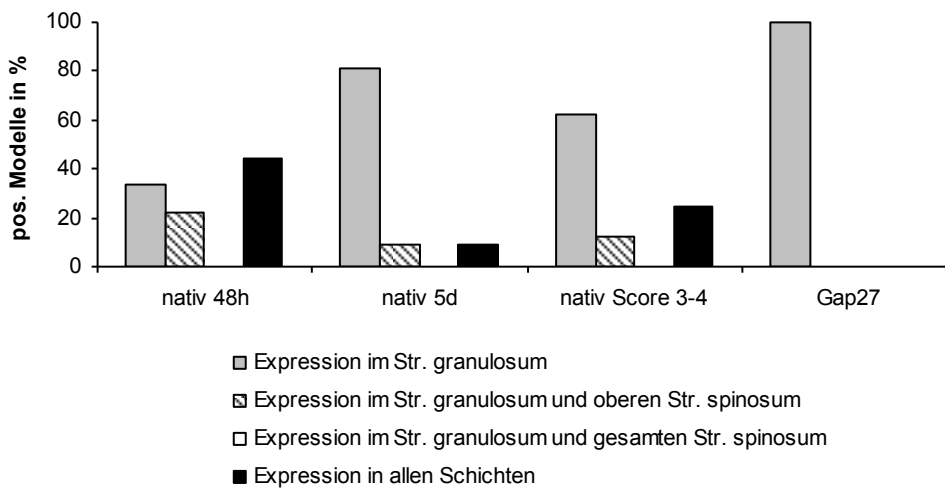
	nativ 48 h	nativ 24 h	nativ Score 1,1-2	TNFα	IL-1β	TNFα+ILβ
<b>keine Expression</b>	0	0	0	14,3	14,3	14,3
<b>Expression im Str. granulosum</b>	33,3	71,3	67	28,6	71,3	57,1
<b>Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum</b>	22,2	14,3	33	57,1	0	14,3
<b>Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum</b>	0	0	0	0	14,3	0
<b>Expression in allen Schichten</b>	44,5	14,3	0	0	0	14,3

### Gap27

In der regenerierenden Epidermis ist die Lokalisation von Ocln in mit Gap27 behandelten Modellen deutlich verschieden zu Kontroll-Modellen: Alle Modelle zeigen nach Applikation von Gap27 eine Lokalisation von Ocln im Str. granulosum, wohingegen dies mit nur 33 % bei der Kontrolle nach 48 h im geringeren Umfang festgestellt werden kann. Die Kontroll-Modelle haben dagegen einen Anteil, der eine Lokalisation von Ocln in allen Schichten zeigt. Dieser Anteil fällt bei Modellen, die mit Gap27 behandelt worden sind, vollständig weg. Die statistische Auswertung zeigt signifikante Veränderungen der Lokalisation von Ocln in der regenerierenden Epidermis nach der Behandlung mit Gap27 ( $p = <0,001$ ).

Vergleicht man die Gap27 behandelten Modelle mit Modellen mit dem gleichen Wundheilungsfortschritt (Score 3-4), so beobachtet man auch in diesem Vergleich deutliche Unterschiede: der Anteil von Modellen mit einer Beschränkung auf das Str. granulosum ist geringer (63%), dahingegen hat man einen deutlichen Anteil von Modellen (25%) mit einer

Expression in allen Schichten. Auch im Vergleich mit Modellen nach 5d, die vom Wundheilungszeitpunkt her dem Wundheilungsfortschritt von Gap27 behandelten Modellen entspricht, beobachtet man deutliche Unterschiede, wenn auch weniger ausgeprägt als zu den anderen Gruppen (siehe Abb. 4.3.3.19). Diesen Ergebnissen nach zu folgern scheint Gap27 in der regenerierenden Epidermis einen direkten Einfluss auf die Lokalisation von Ocln zu haben.



**Abbildung 4.3.3.19 Ocln Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Gap27.** nativ 48 h n = 9; nativ 5 d n = 11; nativ Score 3-4 n = 17; Gap27 n = 7.

**Tabelle 4.3.3.4 Ocln Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Gap27 in Prozent.**

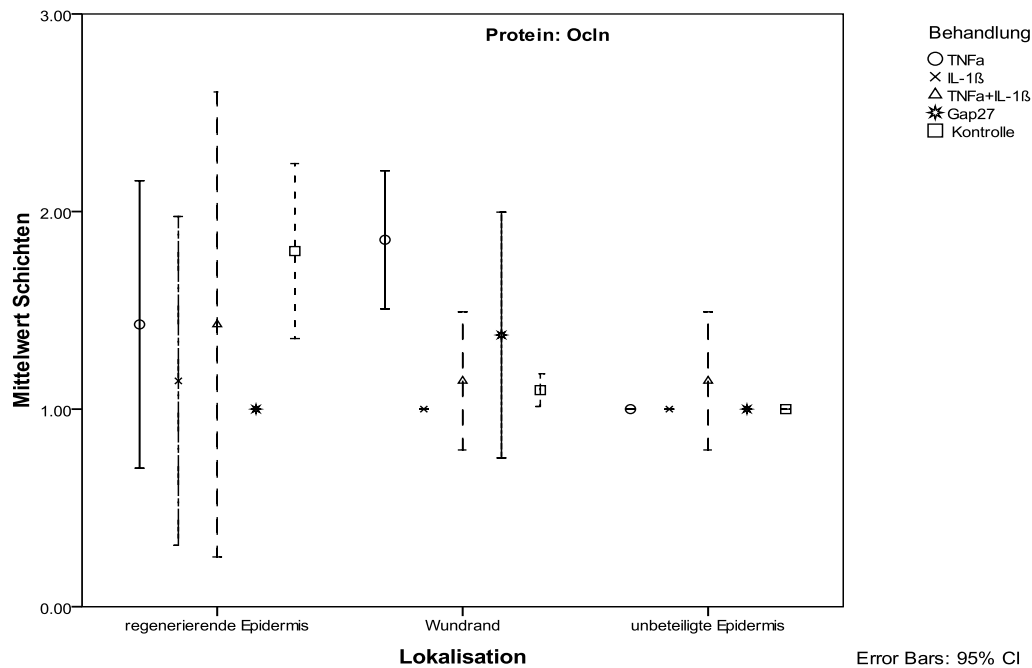
	nativ 48h	nativ 5d	nativ Score 3-4	Gap27
<b>Expression im Str. granulosum</b>	33,3	81	62,5	100
<b>Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum</b>	22,2	9	12,5	0
<b>Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum</b>	0	0	0	0
<b>Expression in allen Schichten</b>	44,5	9	25	0

**Fazit der Wirkung der verschiedenen Behandlungen auf die Ocln Lokalisation:**

In nachstehender Abbildung ist der jeweilige Mittelwert der Schichten für die einzelnen Behandlungen an verschiedenen Wundlokalisationen für Ocln die Expression aufgezeigt. In der regenerierenden Epidermis sieht man, dass durchschnittlich in den Kontroll-Modellen eine Lokalisation von Ocln im Str. granulosum und im oberen bzw. ganzen Str. spinosum zu finden ist. Hingegen ist die Lokalisation nach allen Behandlungen stärker eingeschränkt. Die Unterschiede zur Kontrolle sind in allen Fällen signifikant.

Am Wundrand ist hingegen die Lokalisation in allen Modellen eingeschränkt auf das Str. granulosum und selten das obere spinosum während die Lokalisation in mit TNF $\alpha$

behandelten Modellen im Durchschnitt verbreitert ist. Der Unterschied zwischen  $TNF\alpha$  und allen anderen Behandlungen ist signifikant (Gap27:  $p = 0,026$ , restliche Werte siehe 4.3.3.3.2. In der unbeteiligten Epidermis finden sich keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 4.3.3.20 Mittelwert der Ocln Expression in verschiedenen Schichten mit unterschiedlichen Behandlungen an verschiedenen Wundlokalisationen** Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberen Str. spinosum bzw. untere Schichten, 3= Expression Str. granulosum und im gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten

#### 4.3.4 Expression von ZO-1 während der Wundheilung

##### 4.3.4.1 Korrelation zwischen der ZO-1 Expression und dem Wundheilungsscore

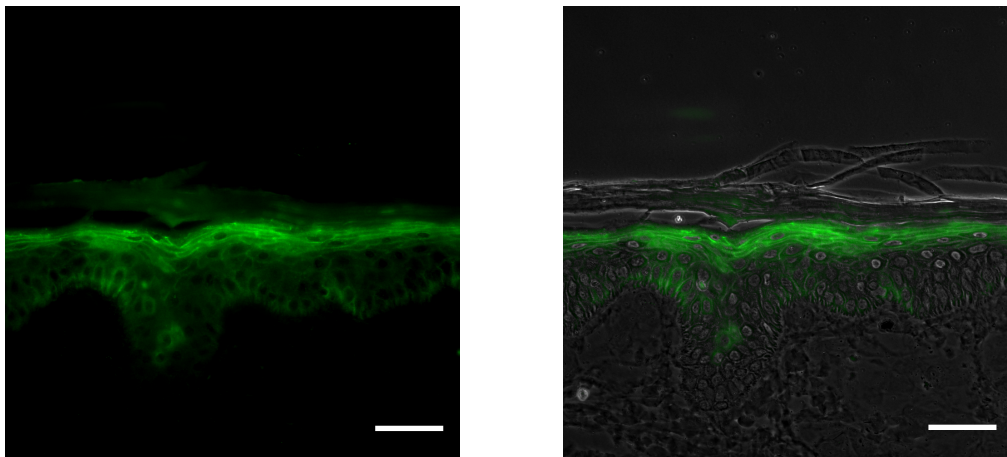
###### 4.3.4.1.1 ZO-1 Expressionsmuster in der unbeteiligten Epidermis

ZO-1 wurde in den oberen Schichten der Epidermis der menschlichen Haut beschrieben (Pummi et al. 2001, Brandner et al. 2002, Langbein et al. 2002). Diese konnte auch ich in meinen Untersuchungen in der unbeteiligten Epidermis im *ex vivo* Wundmodell bestätigen (Abbildungen 4.3.4.1 und 4.3.4.2).

Die ZO-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis wurde als Kontrolle untersucht. Meine Untersuchungen an insgesamt 41 Wundmodellen zeigen, dass man Unterschiede zwischen den verschiedenen Wundheilungsscores, die als Beschreibung des Wundheilungsfortschritts dienen, beobachtet (Abbildung 4.3.4.1).



**Abbildung 4.3.4.1 ZO-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis bei verschiedenen Scorebereichen.** Score 0 n = 17; Score 0,1-1 n = 7; Score 1,1-2 n = 3; 2,1-2,9 n = 4; 3-4 n = 10



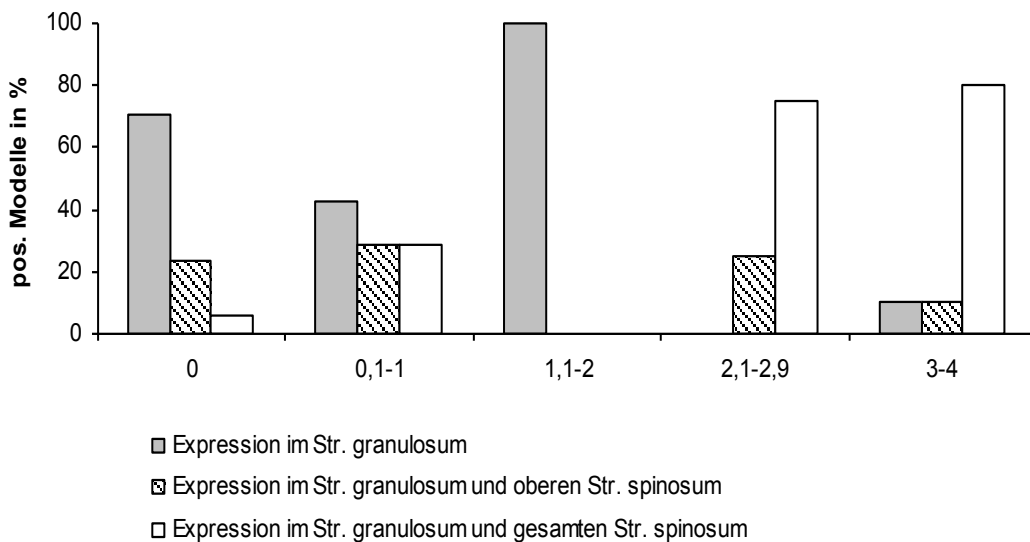
**Abbildung 4.3.4.2 Immunlokalisierung von ZO-1 in der unbeteiligten Epidermis.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der ZO-1 Expression in den oberen epidermalen Schichten. Maßstab: 50  $\mu$ m

#### 4.3.4.1.2 ZO-1 Expressionsmuster am Wundrand

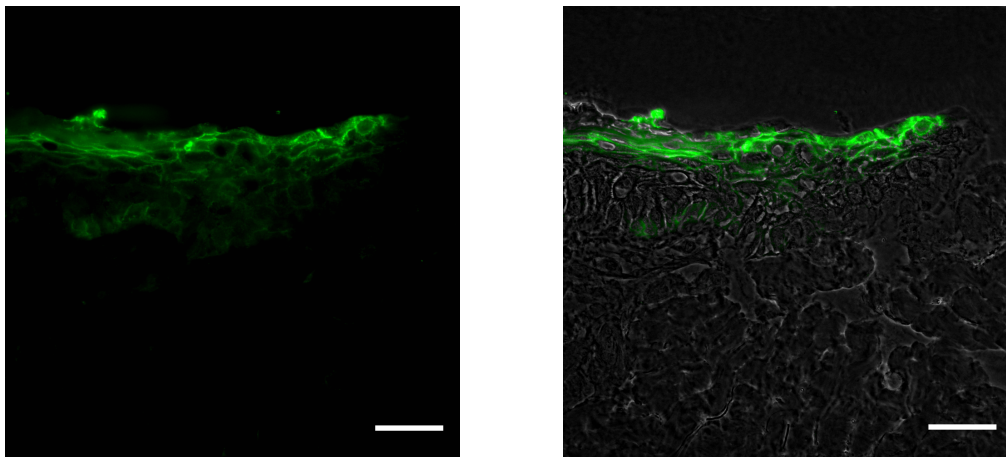
Am Wundrand gibt es Veränderungen bzgl. der Lokalisation von ZO-1: Direkt nach Verwundung zeigen 6% der Modelle und bei einem Score von 0,1-1, 29% der Modelle eine verbreiterte Expression bis in das gesamte Str. spinosum. Im weiteren Verlauf der Wundheilung sieht man im Scorebereich 1,1-2 kein Modell, bei einem Score von 2,1 bis 2,9 in 75 % der Fälle und bei geschlossenen Wunden in 80 % der Fälle eine verbreiterte Expression. (Abbildung 4.3.4.3).

In der statistischen Analyse, in der die Scorewerte unkategorisiert und gleichzeitig auch die Veränderungen in der unbeteiligten Epidermis berücksichtigt wurde zeigt sich mit  $p = 0,158$

für ZO-1 am Wundrand im linearen Term und mit  $p = 0,401$  im quadratischen Modell kein statistisch signifikantes Ergebnis.



**Abbildung 4.3.4.3 ZO-1 Expression am Wundrand bei verschiedenen Scorebereichen.**  
 Score 0 n = 17; Score 0,1-1 n = 7; Score 1,1-2 n = 3; 2,1-2,9 n = 4; 3-4 n = 10



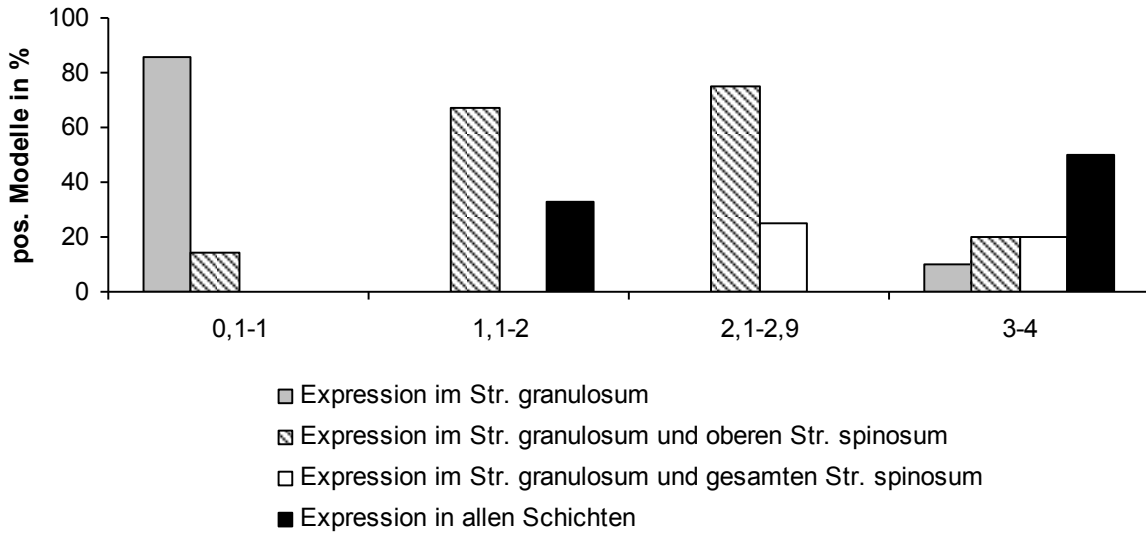
**Abbildung 4.3.4.4 Immunlokalisierung von ZO-1 am Wundrand.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der ZO-1 Expression in den oberen epidermalen Schichten in einer zuheilenden Wunde. Maßstab: 50  $\mu\text{m}$

#### 4.3.4.1.3 ZO-1 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis

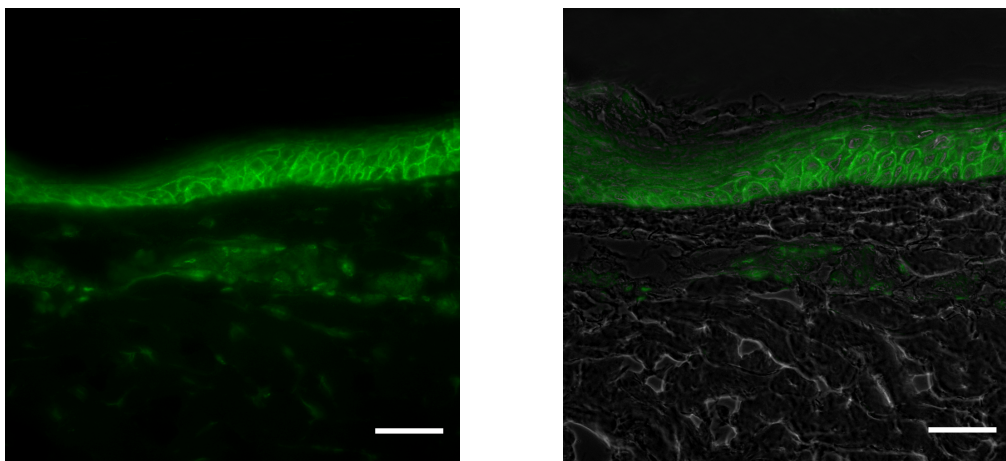
In der regenerierenden Epidermis zeigen die meisten Modelle bis zu einem Score von 1 eine Expression von ZO-1 im Str. granulosum. Bei fortschreitender Wundheilung verändert sich das Bild und ZO-1 zeigt sich bis zu einem Score von 2 verbreitert bis in das obere Str. spinosum bzw. zeigen sogar 33 % eine Lokalisation von ZO-1 in allen neu gebildeten Schichten. Auch in dem Scorebereich bis 2,9 sieht man viele verbreiterte Modelle, keines allerdings, welches eine Lokalisation in allen Schichten zeigt. In geschlossenen Wunden

wies der Hauptteil, mit 50%, eine Lokalisation von ZO-1 bis in alle Schichten auf (Siehe Abbildung 4.3.4.5).

Mit dem p-Wert  $p = 0,166$  zeigt sich für ZO-1 in der regenerierenden Epidermis zwar im quadratischen Modell kein, aber im linearen Term mit  $p = 0,048$  ein statistisch signifikantes Ergebnis und somit ein linearer Zusammenhang zwischen ZO-1 Expression und Wundheilungsfortschritt (siehe auch Abbildung 4.3.4.10).



**Abbildung 4.3.4.5 ZO-1 Expression in der regenerierenden Epidermis bei verschiedenen Scorebereichen.** Score 0,1-1 n = 7; Score 1,1-2 n = 3; 2,1-2,9 n = 4; 3-4 n = 10

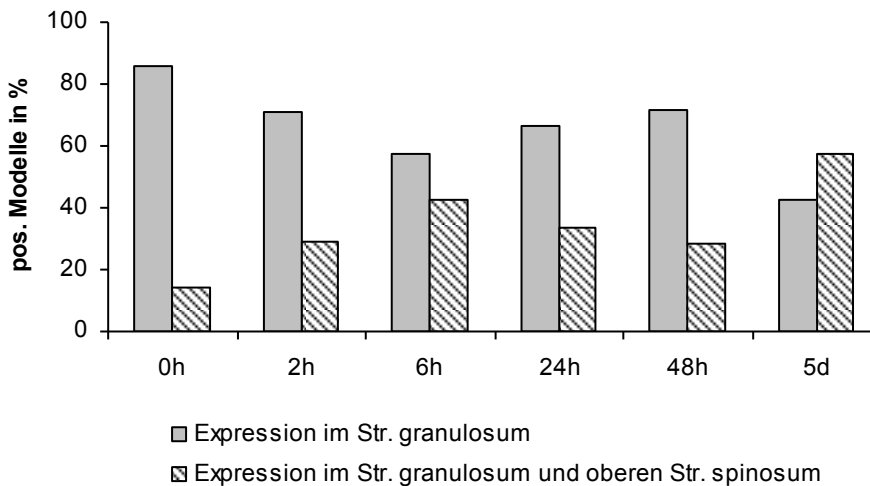


**Abbildung 4.3.4.6 Immunlokalisierung von ZO-1 in der regenerierenden Epidermis.** Links Epifluoreszenzbild, rechts Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrastbild. Darstellung der ZO-1 Expression in allen regenerierten Schichten. Maßstab: 50  $\mu\text{m}$

#### 4.3.4.2 Korrelation zwischen der ZO-1 Expression und verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung

##### 4.3.4.2.1 ZO-1 Expressionsmuster in der unbeteiligten Epidermis

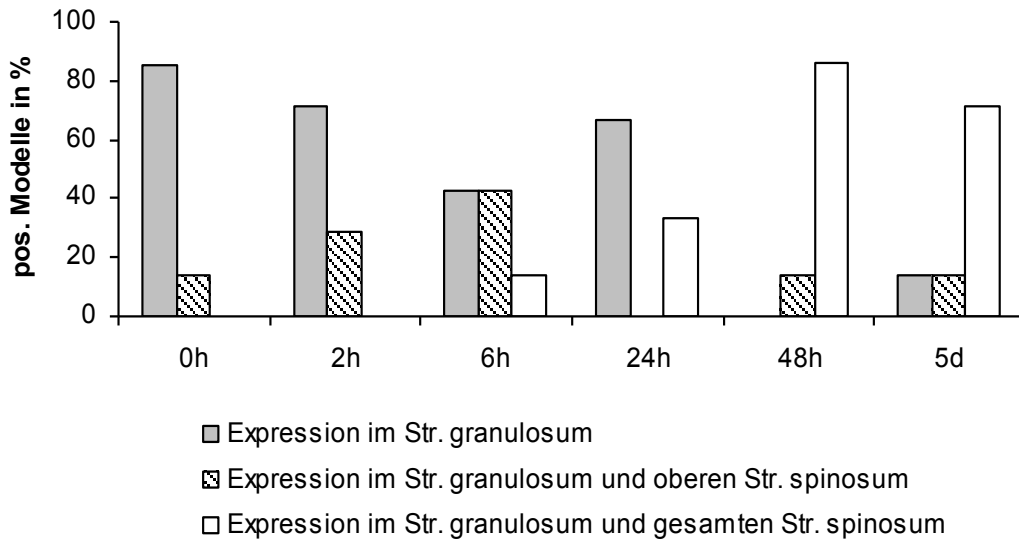
In der unbeteiligten Epidermis ist ZO-1, auch in Korrelation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung, ausschließlich im Str. granulosum und oberem Str. spinosum lokalisiert. Vergleiche hierzu auch Kapitel 4.3.4.1.1. Man findet eine Zunahme des Anteils „Str. granulosum und oberem Str. spinosum“ bis 6 h und nach 5 d, die Unterschiede sind allerdings nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 4.3.4.7 ZO-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis zu verschiedenen Zeitpunkten** 0 h n = 7, 2 h = 7, 6 h n = 7, 24 h n = 7, 48 h n = 7, 5 d n = 7

##### 4.3.4.2.2 ZO-1 Expressionsmuster am Wundrand

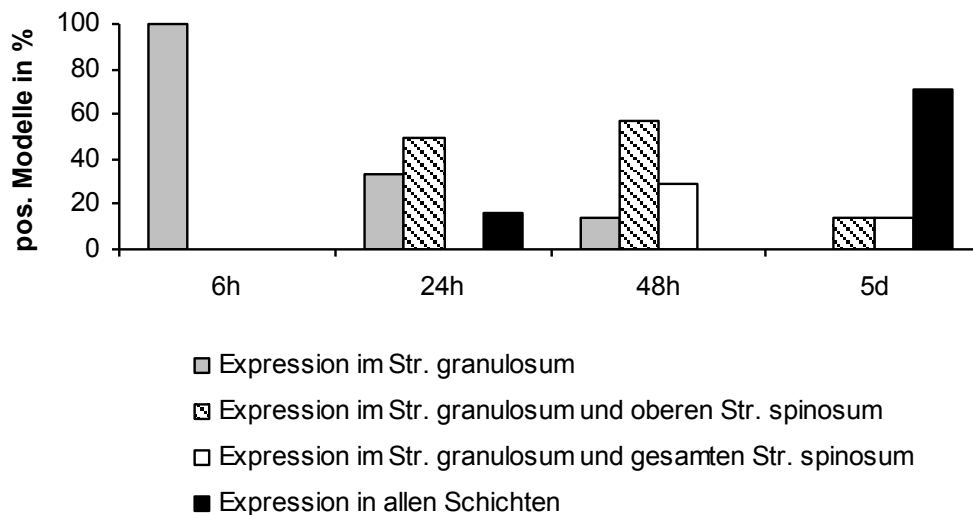
Am Wundrand zeigt sich nach 0 h und 2 h die ZO-1 Lokalisation wie in unbeteiligter Epidermis ausschließlich im Str. granulosum und im oberem Str. spinosum. Ab 6 h zeigen sich steigend bis nach 48 h 86 % der Modelle eine Verbreiterung in der Lokalisation von ZO-1 am Wundrand. Danach nimmt der Anteil wieder geringfügig ab und es können auch wieder Modelle mit einer Beschränkung auf das Str. granulosum gefunden werden. Man kann in Korrelation zur Zeit sagen, dass man erst ab einer bestimmten Wundheilungszeit Veränderungen in der Lokalisation von ZO-1 feststellen kann (Abbildung 4.3.4.8). In der statistischen Analyse zeigen sich im linearen Term und im quadratischen Modell mit jeweils  $p = 0,014$  statistisch signifikante Ergebnisse.



**Abbildung 4.3.4.8 ZO-1 Expression am Wundrand zu verschiedenen Zeitpunkten** 0 h n = 7, 2 h n = 7, 6 h n = 7, 24 h n = 7, 48 h n = 7, 5 d n = 7

#### 4.3.4.2.3 ZO-1 Expressionsmuster in der regenerierenden Epidermis

In der regenerierenden Epidermis zeigt sich ein gemischtes Bild bezüglich der Lokalisation von ZO-1. Nach einer Wundheilungszeit von 24 h und nach 5 d zeigen sich jeweils Modelle, die ZO-1 in allen neu gebildeten Schichten exprimieren. Statistisch signifikante Unterschiede werden weder linear mit  $p = 0,196$  noch quadratisch mit  $p = 0,133$  beobachtet.



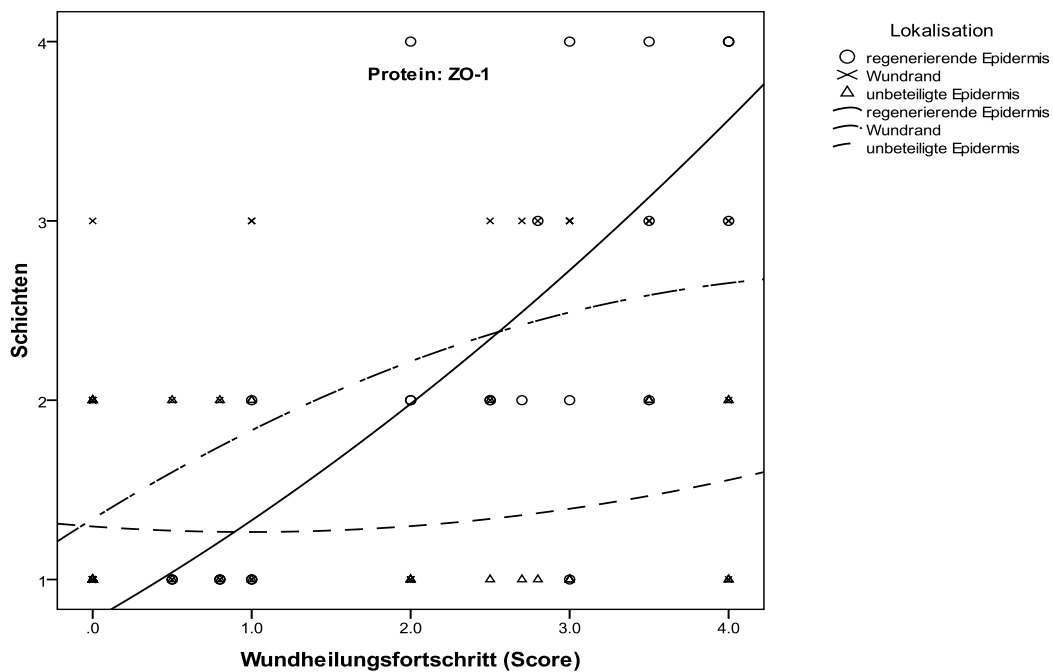
**Abbildung 4.3.4.9 ZO-1 Expression in der regenerierenden Epidermis zu verschiedenen Zeitpunkten** 6 h n = 4, 24 h n = 7, 48 h n = 7, 5 d n = 7

#### **Fazit ZO-1 Lokalisation:**

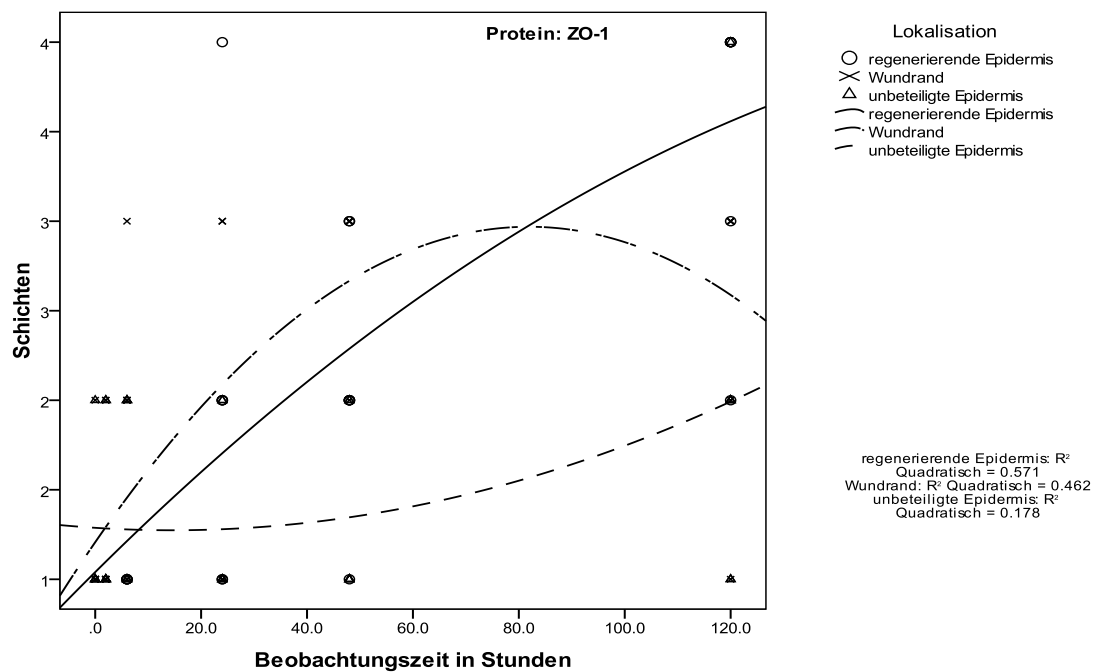
Zusammenfassend sieht man also eine statistische Korrelation der Veränderung der ZO-1 Lokalisation mit dem Wundheilungsfortschritt unabhängig von der Zeit in der



regenerierenden Epidermis im linearen Term sehen, d.h. man beobachtet eine Zunahme der Expression (Abb. 4.3.4.10). Am Wundrand und in der unbeteiligten Epidermis beobachtet man keine statistisch signifikanten Zusammenhänge bzgl. des Wundheilungsfortschrittes. Dahingegen verändert sich die ZO-1 Lokalisation am Wundrand statistisch signifikant mit der Wundheilungszeit im linearen Term und im quadratischen Modell unabhängig vom Wundheilungsfortschritt in einem quadratischen Zusammenhang während es für die regenerierende und die unbeteiligte Epidermis keine signifikante Korrelation gibt (Abb. 4.3.4.11).



**Abbildung 4.3.4.10 Veränderung der ZO-1 Expression in verschiedenen Schichten in Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes, d. h. dem Wundheilungsscore in einer quadratischen Funktion** Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum bzw. unteren Schichten, 3= Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten

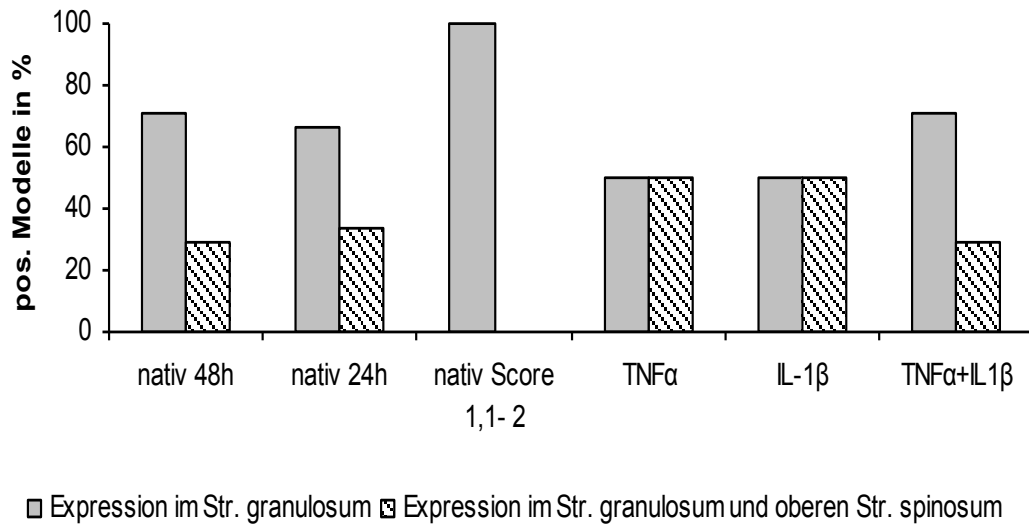


**Abbildung 4.3.4.11 Veränderung der ZO-1 Expression in verschiedenen Schichten in Abhängigkeit der Beobachtungszeit in Stunden in einer quadratischen Funktion** Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum bzw. unteren Schichten, 3= Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten

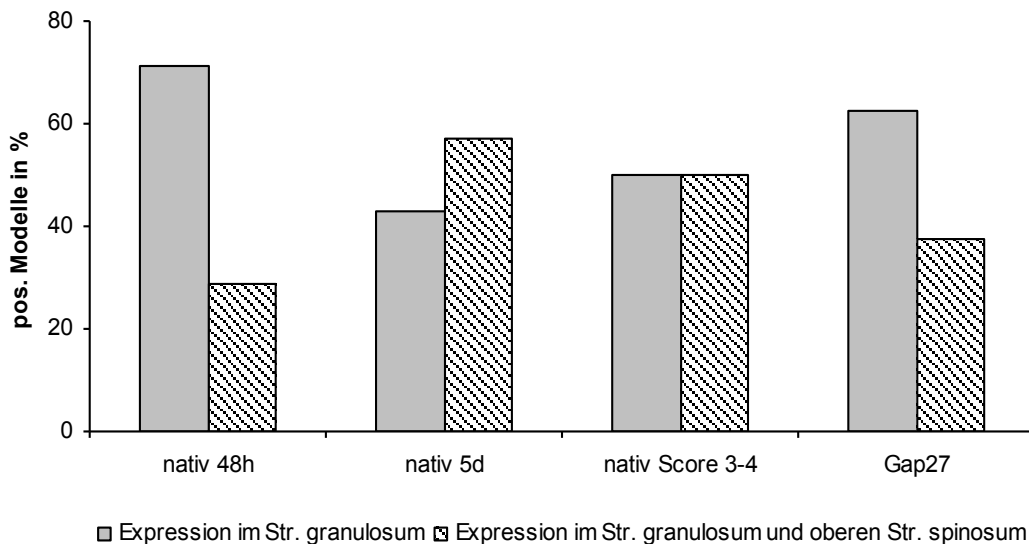
#### 4.3.4.3 ZO-1 Expression 48 h nach der Zugabe von Zytokinen und Gap27

##### 4.3.4.3.1 Unbeteiligte Epidermis

Wie in Abbildung 4.3.4.12 und 4.3.4.13 zu sehen ist, zeigen alle Modelle, auch unter dem Einfluss von Zytokinen und Gap27, im Vergleich zu Kontroll-Modellen, in allen Kombinationen eine ZO-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis, die sich auf das Str. granulosum oder auf das Str. granulosum und das obere Str. spinosum beschränkt, allerdings in verschiedenen Verhältnissen. In der statistischen Analyse zeigt sich, dass die Unterschiede in der ZO-1-Lokalisation in der unbeteiligten Epidermis von 48-h-Kontrollmodellen und Modellen, die mit  $\text{TNF}\alpha$  ( $p = 0,004$ ) und  $\text{IL-1}\beta$  ( $p = 0,004$ ) behandelt wurden statistisch signifikant unterschiedlich sind. Der Unterschied für Gap27 war nicht signifikant.



**Abbildung 4.3.4.12 Vergleich der ZO-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis zwischen Kontroll-Modellen zu verschiedenen Zeitpunkten und Modellen, die mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  behandelt wurden** nativ 48 h n = 7; nativ 24 h n = 7; nativ Score 1,1-2 n = 3, TNF $\alpha$  n = 7; IL-1 $\beta$  n = 8; TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  n = 8



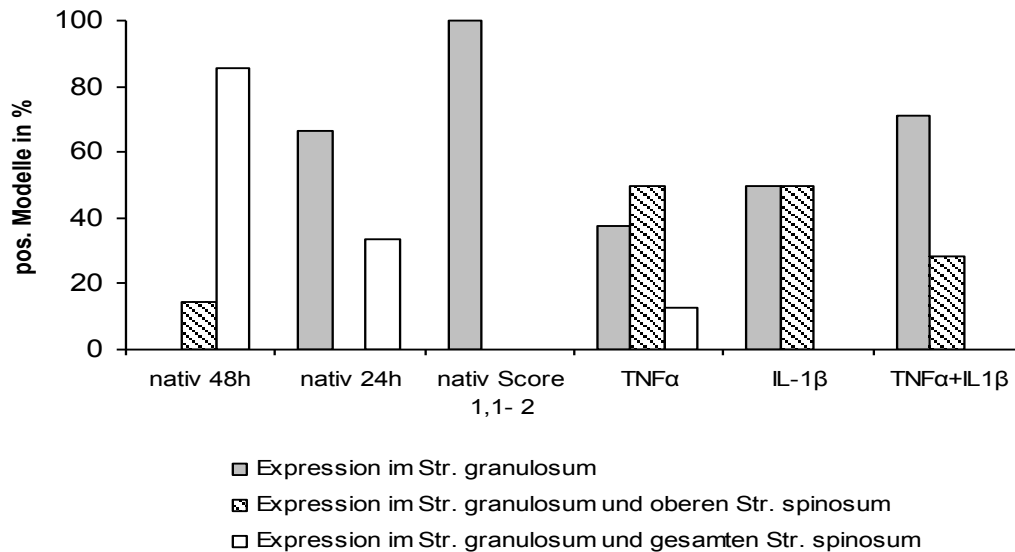
**Abbildung 4.3.4.13 Vergleich der ZO-1 Expression in der unbeteiligten Epidermis zwischen Kontroll-Modellen und Modellen nach Zugabe von Gap27** nativ 48 h n = 7; nativ 5 d n = 7; nativ Score 3-4 n = 10; Gap27 n = 7.

#### 4.3.4.3.2 Wundrand

##### Zytokine

Während in 48 h Kontroll-Modellen ein großer Anteil an Modellen vorhanden ist, der eine ZO-1 Lokalisation bis in das gesamte Str. spinosum zeigt, sieht man nach Zugabe von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  nach 48 h, dass dieser Anteil auf 12,5 bzw. 0 % sinkt. Die Verbreiterung, die man also bei Kontroll-Modellen beobachten konnte, scheint hier, nach

Zytokinzugabe, aufgehoben zu sein: Statistisch analysiert, zeigen die mit  $TNF\alpha+IL-1\beta$  behandelten Modelle im Vergleich zu ihren 48 h Kontroll-Modellen mit  $p = 0,033$  einen statistisch signifikanten Unterschiede in der Lokalisation von ZO-1.



**Abbildung 4.3.4.14 ZO-1 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Zytokinen.**  
 nativ 48 h n = 7; nativ 24 h n = 7; nativ Score 1,1-2 n = 3,  $TNF\alpha$  n = 7;  $IL-1\beta$  n = 8;  $TNF\alpha+IL-1\beta$  n = 8

**Tabelle 4.3.4.1 ZO-1 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Zytokinen in Prozent.**

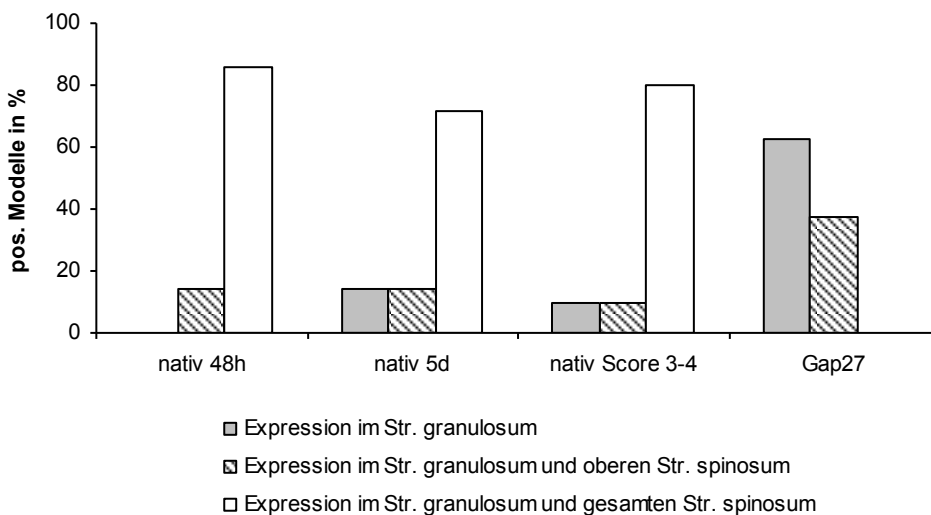
	nativ 48 h	nativ 24 h	nativ Score 1,1-2	$TNF\alpha$	$IL-1\beta$	$TNF\alpha+IL1\beta$
<b>Expression im Str. granulosum</b>	0	66,7	100	37,5	50	71,3
<b>Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum</b>	14,3	0	0	50	50	28,6
<b>Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum</b>	85,7	33,3	0	12,5	0	0

Interessanterweise ähnelt die Verteilung von ZO-1 am Wundrand aber mehr den Wundmodellen mit einem Score, der dem Wundheilungsfortschritt der behandelten Modelle entspricht (1,1-2) bzw. dem Zeitpunkt, der dem Wundheilungsfortschritt von behandelten Modellen in Kontrollmodellen entspräche (24 h). Dies deutet darauf hin, dass die für ZO-1 beobachteten Veränderungen mit der Veränderung des Wundheilungsfortschritts einhergehen.

### Gap27

Mit Gap27 behandelte Modelle unterscheiden sich deutlich von unbehandelten Modellen, die die gleiche Wundheilungszeit oder den gleichen Wundheilungsfortschritt hatten. Bei Kontroll-48 h Modellen zeigen 85 %, nach 5 d 71 % und bei einem Score von 3-4 80 % der Modelle eine Verbreiterung der Lokalisation von ZO-1. Nach Behandlung mit Gap27 gibt es kein einziges Modell, welches ZO-1 bis in das gesamte Str. spinosum exprimiert. Wie schon die

Zugabe der Zytokine scheint auch die Applikation von Gap27 zu bewirken, dass ZO-1 in einem schmaleren Bereich exprimiert wird. Siehe hierzu Abbildung 4.3.4.15 und Tabelle 4.3.4.2. In der statistischen Analyse zeigen mit  $p = <0,001$  die Modelle statistisch signifikante Veränderungen von ZO-1 am Wundrand nach der Behandlung mit Gap27 im Vergleich zu 48 h Kontroll-Modellen.



**Abbildung 4.3.4.15 ZO-1 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Gap27.** nativ 48 h n = 7, nativ 5 d n = 7; nativ Score 3-4 n = 10; Gap27 n = 7.

**Tabelle 4.3.4.2 ZO-1 Expression am Wundrand nach der Zugabe von Gap27 in Prozent.**

	nativ 48h	nativ 5d	nativ Score 3-4	Gap27
<b>Expression im Str. granulosum</b>	0	14,3	10	62,5
<b>Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum</b>	14,3	14,3	10	37,5
<b>Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum</b>	85,7	71,4	80	0

Da die ZO-1 Expression am Wundrand nach 48 h mit Gap27 weder den Kontroll-Modellen nach 48 h, 5 d, noch den Kontroll-Modellen mit dem entsprechenden Wundheilungsscore (3-4) in etwa gleicht, ist zu vermuten, dass Gap27 selbst einen Einfluss auf die Expression von ZO-1 hat.

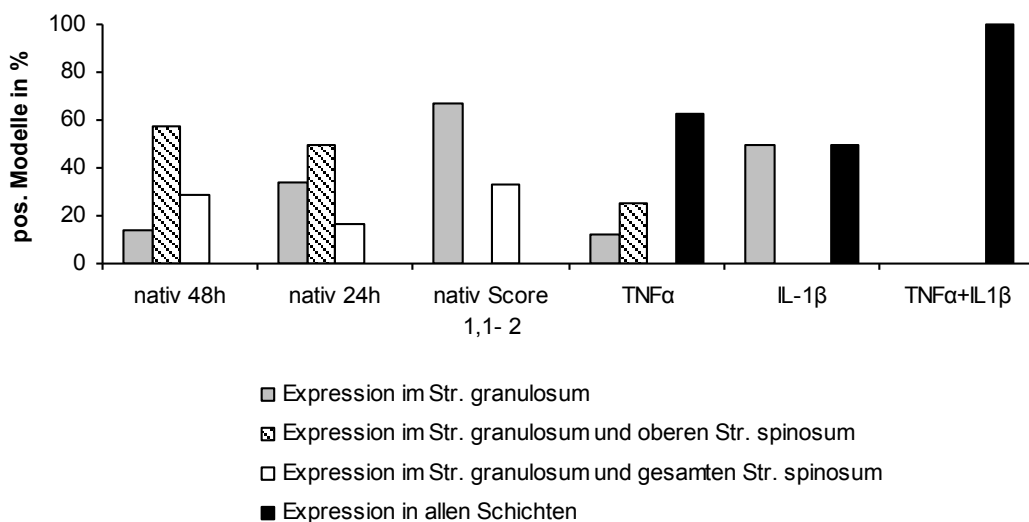
#### 4.3.4.3.3 Regenerierende Epidermis

##### Zytokine

In der regenerierenden Epidermis können, wie am Wundrand, ebenfalls ZO-1 Expressionsunterschiede bei behandelten Modellen im Vergleich zu Kontroll-Modellen

beobachtet werden. Die Veränderung in der regenerierenden Epidermis sieht allerdings anders aus. Während man am Wundrand durch die Zugabe von Zytokinen eine verschmälerte Expression von ZO-1 beobachten konnte, kann man hier eher Gegenteiliges sehen: Bei Kontroll-Modellen geht die maximale Lokalisation bis in das gesamte Str. spinosum. Werden nun Zytokine appliziert, so zeigt sich immer ein Anteil an Modellen, der eine Lokalisation von ZO-1 in allen neu gebildeten Schichten aufweist. Nach der Zugabe von TNF $\alpha$  sind es 62 %, nach Zugabe von IL-1 $\beta$  50 % und werden beide Zytokine appliziert sogar 100 %.

Die p-Werte der statistischen Auswertung zeigen jeweils mit  $p = 0,003$  für IL-1 $\beta$ ,  $p = <0,001$  für TNF $\alpha$  und  $p = <0,001$  für TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  signifikante Veränderungen von ZO-1 in der regenerierenden Epidermis nach den Behandlungen im Vergleich zu 48 h Kontrollmodellen. Darüber hinaus waren auch die Unterschiede zwischen TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ( $p = 0,001$ ) und TNF $\alpha$ + IL-1 $\beta$  zu IL-1 $\beta$  ( $p = <0,001$ ) signifikant.



**Abbildung 4.3.4.16 ZO-1 Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Zytokinen** nativ 48 h n = 7; nativ 24 h n = 7; nativ Score 1,1-2 n = 3, TNF $\alpha$  n = 7; IL-1 $\beta$  n = 8; TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  n = 8

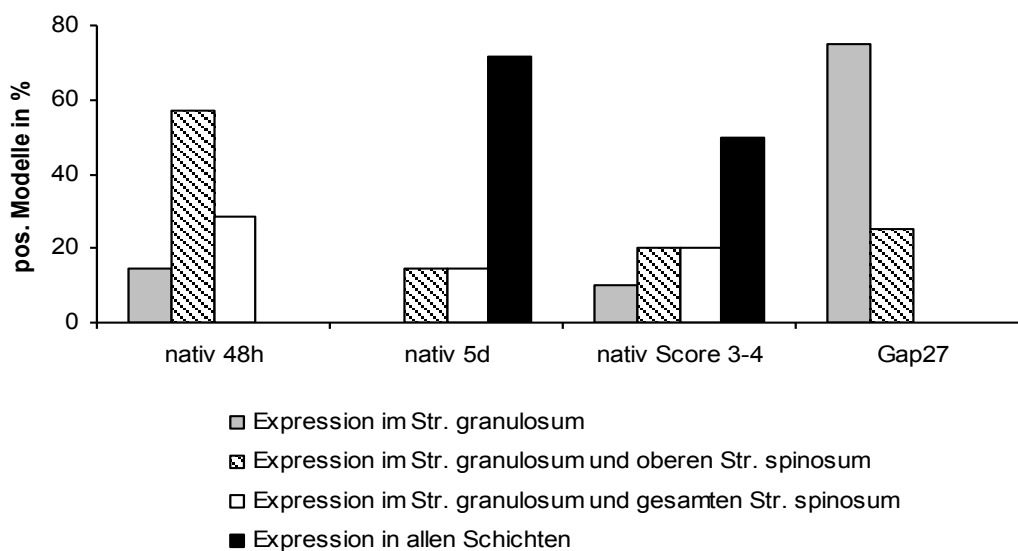
Tabelle 4.3.4.3 ZO-1 Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Zytokinen in Prozent.

	nativ 48 h	nativ 24 h	nativ Score 1,1-2	TNF $\alpha$	IL-1 $\beta$	TNF $\alpha$ + IL1 $\beta$
keine Expression	0	0	0	0	0	0
Expression im Str. granulosum	14,3	33,5	67	12,5	50	0
Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum	57,1	50	0	25	0	0
Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum	28,6	16,5	33	0	0	0
Expression in allen Schichten	0	0	0	62,5	50	100

## Gap27

Wenn Gap27 in die Wunde appliziert wird, können in der regenerierenden Epidermis ähnliche Veränderungen im Expressionsmuster von ZO-1 gefunden werden wie am Wundrand: Am Wundrand sieht man, dass unter dem Einfluss von Gap27 viele Modelle eine Lokalisation von ZO-1 nur noch im Str. granulosum und oberen Str. spinosum zeigen (wohingegen Kontroll-Modelle Verbreiterungen zeigen). Wie man an Abbildung 4.3.4.17 und an Tabelle 4.3.4.4 sehen kann, ist dies in der regenerierenden Epidermis auch der Fall. Diesen Ergebnissen nach zu folgern scheint Gap27 in der regenerierenden Epidermis einen direkten Einfluss auf die Lokalisation von ZO-1 zu haben.

Die p-Werte der statistischen Auswertung zeigen jeweils mit  $p = 0,004$  statistisch signifikanten Veränderungen von ZO-1 in der regenerierenden Epidermis nach der Behandlung mit Gap27 im Vergleich zu 48 h Kontrollmodellen.



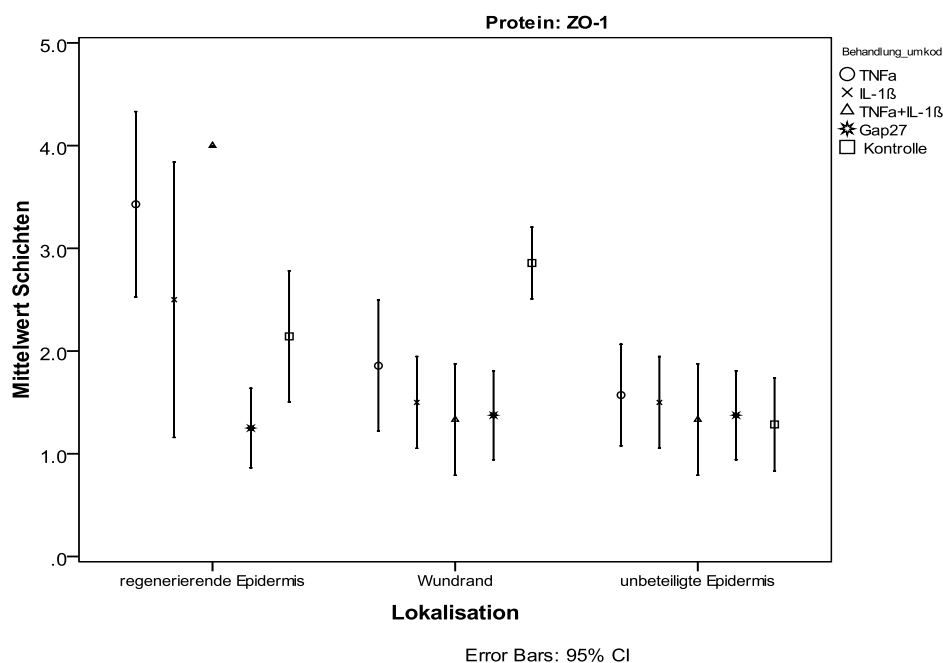
**Abbildung 4.3.4.17 ZO-1 Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Gap27.** nativ 48 h n = 7; nativ 5 d n = 7; nativ Score 3-4 n = 10; Gap27 n = 7.

**Tabelle 4.3.4.4 ZO-1 Expression in der regenerierenden Epidermis nach der Zugabe von Gap27 in**

	nativ 48h	nativ 5d	nativ Score 3-4	Gap27
<b>Expression im Str. granulosum</b>	14,3	0	10	75
<b>Expression im Str. granulosum und oberen Str. spinosum</b>	57,1	14,3	20	25
<b>Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum</b>	28,6	14,3	20	0
<b>Expression in allen Schichten</b>	0	71,4	50	0

### Fazit der Wirkung der verschiedenen Behandlungen auf die ZO-1 Lokalisation:

In nachstehender Abbildung ist der jeweilige Mittelwert der Schichten für die einzelnen Behandlungen an verschiedenen Wundlokalisationen für ZO-1 aufgezeigt. In der regenerierenden Epidermis sieht man, dass durchschnittlich in den Kontroll-Modellen eine Lokalisation von ZO-1 im Str. granulosum und im oberen Str. spinosum zu finden ist. In mit  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$  und  $TNF\alpha$ +IL-1 $\beta$  behandelten Modellen ist diese Lokalisation signifikant verbreitert. Hingegen ist die Lokalisation in mit Gap27 behandelten Modellen signifikant schmaler als in der Kontrolle. Der Unterschied von Gap27 behandelten Modellen ist, zusätzlich zur Kontrolle, auch signifikant im Vergleich zu Modellen, die mit  $TNF\alpha$  ( $p < 0,001$ ), IL-1 $\beta$  ( $p = 0,003$ ) und  $TNF\alpha$ +IL-1 $\beta$  ( $p = <0,001$ ) behandelt worden sind. Am Wundrand ist die Lokalisation mit der Behandlung mit  $TNF\alpha$ +IL-1 $\beta$  mit einem  $p$  von 0,033 und mit Gap27 ( $p = <0,001$ ) im Vergleich zur Kontrolle signifikant schmaler. Darüber hinaus hat man einen signifikanten Unterschied zwischen mit Gap27 behandelten Modellen und mit  $TNF\alpha$  ( $p = <0,001$ ), IL-1 $\beta$  ( $p = 0,002$ ) und  $TNF\alpha$ +IL-1 $\beta$  ( $p = 0,02$ ) behandelten Modellen. Interessanterweise findet man bei ZO-1 auch bereits in der unbehandelten Epidermis signifikante Unterschiede zwischen  $TNF\alpha$  ( $p = 0,004$ ) und IL-1 $\beta$  ( $p = 0,004$ ) zur Kontrolle (siehe 4.3.4.3.1).



**Abbildung 4.3.4.18 Mittelwert der ZO-1 Expression in verschiedenen Schichten mit unterschiedlichen Behandlungen an verschiedenen Wundlokalisationen** Schicht 0= keine Expression, Schicht 1= Expression nur im Str. granulosum, Schicht 2= Expression im Str. granulosum und oberem Str. spinosum bzw. unteren Schichten, 3= Expression im Str. granulosum und gesamten Str. spinosum, 4= Expression in allen Schichten



## 5 DISKUSSION

TJs spielen eine entscheidende Rolle in der Hautphysiologie und -pathologie. In der Vergangenheit konnte mehrfach gezeigt werden, dass es bei Hauterkrankungen zu Veränderungen in der Lokalisation, Expression und Funktionalität von TJ-Proteinen kommt. Als Beispiel sei hier die Psoriasis genannt, eine entzündliche Dermatose, bei der es zu einer veränderten Expression und Lokalisation der TJ-Proteine kommt (Kirschner et al. 2009). Diese Veränderung führt zu einer veränderten Lokalisation von TJ-Strukturen (Yoshida et al. 2001) und der TJ-Barrierefunktion (Kirschner et al. 2010). In dieser Arbeit sollte nun der Einfluss der Verwundung und Wundheilung auf die Lokalisation von TJ-Proteinen untersucht werden. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Zytokinen, die die Wundheilung verlangsamen und von Gap27, einem Connexin-mimetischen Peptid, das die Wundheilung beschleunigt, untersucht.

### 5.1 Dynamik der Veränderung von TJ-Proteinen

Die Regeneration der Epidermis nach Verwundung ist ein dynamischer Prozess. Dabei müssen Keratinozyten vom Wundrand in die Wunde einwandern, sie müssen am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis proliferieren und schließlich müssen sie differenzieren und eine neue Hautbarriere bilden. Da eine Beteiligung von TJ bzw. von TJ-Proteinen an Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten ((De Benedetto et al. 2011) (Kirschner et al. 2012), (Kirschner et al. 2011) sowie der Bildung einer Hautbarriere (Furuse et al. 2002, Tunggal et al. 2005), (Kirschner et al. 2010) beschrieben worden ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Veränderung der Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen während der Wundheilung im porcinen ex-vivo Modell untersucht. Dabei richtete sich das Augenmerk auf drei verschiedene Bereiche: den Wundrand, die regenerierende Epidermis und die sog. „unbeteiligte Epidermis“, die mindestens zwei Reteleisten vom Wundrand entfernt lag. Die Daten wurden sowohl mit dem Wundheilungsfortschritt als auch mit der Dauer der Wundheilung korreliert und die betreffenden Signifikanzen jeweils unabhängig vom anderen Parameter berechnet.

#### **Unbeteiligte Epidermis**

Die Untersuchung der unbeteiligten Epidermis dient als Kontrolle um einen möglichen Einfluss von Kultur- und Färbebedingungen auf Veränderungen von TJ-Proteinen widerzuspiegeln. Im Idealfall ist keine Veränderung zu sehen. Tatsächlich konnte ich für keines der untersuchten Proteine, d.h. Cldn-1, Cldn-4, Ocln und ZO-1 eine statistisch signifikante Veränderung in der unbeteiligten Epidermis beobachten, weder in Korrelation mit dem Wundheilungsfortschritt, noch in Korrelation mit dem Zeitpunkt nach Verwundung.

Allerdings wurde für ZO-1 eine größere Variabilität der Färbung zwischen den Modellen beobachtet, d.h. in einem Teil der Modelle war die Färbung auf das Str. granulosum beschränkt, in einem Teil wurde es darüber hinaus auch im Str. spinosum beobachtet. Das spricht dafür, dass ZO-1 sensibler auf Kulturbedingungen reagieren könnte.

### **Wundrand**

Die Untersuchung des Wundrands in Korrelation mit dem Wundheilungsfortschritt zeigte keine statistische Korrelation zur dynamischen Veränderung für Cldn-1. Allerdings beobachtet man unabhängig vom Wundheilungsfortschritt in einem Teil der Modelle (12,5 bis 57,1 %) eine Herunterregulation von Cldn-1 in den obersten Schichten. Da eine Herabregulation von Cldn-1 mit einem Proteinlevel der Differenzierungsmarker Involucrin und Filaggrin-Monomeren einhergeht (Kirschner et al. 2011), könnte dies ein Zeichen für die Dedifferenzierung von Keratinozyten am Wundrand sein. Da die Veränderung für Cldn-1 aber nicht statistisch signifikant mit dem Wundheilungsfortschritt korreliert, scheint diese Herabregulation für den generellen Wundheilungsfortschritt nicht essentiell zu sein. DeBenedetto und Kollegen konnten 2011 zeigen, dass eine Herabregulation von Cldn-1 zu einer verstärkten Proliferation führt. Da die Herabregulation von Cldn-1 am Wundrand aber nur in den oberen Schichten beobachtet wurde, in denen sich keine proliferativen Zellen befinden, ist es unwahrscheinlich, dass dies einen Einfluss auf die Proliferation hat. Interessanterweise findet man aber eine statistische Korrelation der Herabregulation von Cldn-1 in den oberen Schichten zum Zeitpunkt nach Verwundung, so dass es sich generell um eine Veränderung handeln könnte, die mit der Wundheilungsdauer verbunden sein könnte.

Auch für Cldn-4, Ocln und ZO-1 konnte keine statistische Korrelation zwischen Wundheilungsfortschritt und der Dynamik der Veränderung der Protein-Lokalisation am Wundrand beobachtet werden. Generell beobachtet man aber für Cldn-4 nach Verwundung in einem bestimmten Anteil von Modellen (28,6- 50 %) eine verbreiterte Expression am Wundrand, der in unverwundeten Modellen nicht vorhanden ist. Es zeigte sich aber nur ein Trend zur verbreiterten Lokalisation von Cldn-4 im Laufe des Wundheilungsfortschritts ( $p = 0,098$ ). Die Korrelation mit dem Zeitpunkt nach Verwundung zeigte keine Signifikanz für Cldn-4 und Ocln. Für ZO-1 hingegen konnte eine signifikante Korrelation der verbreiterten Expression mit dem Wundheilungszeitpunkt beobachtet werden. Diese war unabhängig von den Veränderungen in der unbeteiligten Epidermis. Interessanterweise zeigen Malminen und Kollegen 2003 6 Tage nach der Generierung von oberflächlichen humanen in vivo Wunden ebenfalls eine verbreiterte Lokalisation von ZO-1 am Wundrand. In ihren Untersuchungen zeigten sie zusätzlich, dass Ocln am Wundrand im Str. granulosum bleibt, sich aber intensiver und diffuser als in normaler Haut anfärbt. Allerdings wird in der Arbeit nicht ausgeführt, ob dies in allen 8 untersuchten Proben der Fall ist. Der von mir untersuchte

späteste Zeitpunkt der Wundheilung im ex-vivo Modell ist 5 d. Dort konnte ich in 60% der Fälle (n = 7) eine verbreiterte Expression von ZO-1 und in 80 % der Fälle OcIn im Str. granulosum finden (n = 11) und ihre Ergebnisse somit bestätigen. Die Applikation von TNF $\alpha$  führte in meinen Wundmodellen zu einer Verbreiterung von OcIn in fast 90% der Fälle. Dies war allerdings nicht der Fall für IL-1 $\beta$  und die Kombination aus TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Sollten bei Malminen und Kollegen tatsächlich ein Großteil der Modelle eine verbreiterte OcIn-Färbung gezeigt haben, könnte somit ggf. ein anderes Verhältnis von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in den von ihnen verwendeten Saugblasen-Wunden dazu beigetragen haben.

### **Regenerierende Epidermis**

In der regenerierenden Epidermis konnte ich eine signifikante Korrelation zwischen Wundheilungsfortschritt und Cldn-1 Expression beobachten. So nahm die Zahl der in der regenerierenden Epidermis Cldn-1 exprimierenden Modelle im Laufe der Wundheilung erst ab und dann wieder zu. Die Herabregulation von Cldn-1 könnte in einer frühen Phase der Regeneration die Proliferation der Keratinozyten steigern (De Benedetto et al. 2011) sowie eine verfrühte Differenzierung (Kirschner et al. 2011) verhindern. Später, wenn die Regeneration dann bereits weit fortgeschritten ist, könnte dann eine Wiederausdrückung des Moleküls die Proliferation vermindern und die Differenzierung induzieren.

Für Cldn-4 konnte in der regenerierenden Epidermis signifikant zunächst ein verstärktes Auftreten von Wundmodellen mit verbreiteter Lokalisation beobachten, die dann im Laufe des Wundheilungsfortschritts wieder abnahmen. Über die Bedeutung von Cldn-4 in der Haut ist derzeit noch wenig bekannt. Erste unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen einen Einfluss auf die Barrierefunktion von Keratinozyten für Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> und Ca<sup>++</sup> sowie kleinere unpolare Moleküle und größere Tracer (Kirschner et al., in preparation). Da man häufig zeitgleich mit der verstärkten Expression von Cldn-4 eine Abwesenheit von Cldn-1 beobachtet, könnte es sich bei dieser Hochregulation um eine Kompensation der Abwesenheit von Cldn-1 handeln.

Für OcIn konnte keine signifikante Veränderung in der regenerierenden Epidermis im Verlauf der Wundheilung beobachtet werden, weder im Zusammenhang mit dem Wundheilungsfortschritt, noch im Zusammenhang mit dem Zeitpunkt nach Verwundung. Man findet aber generell im Vergleich zu gesunder Haut eine Verbreiterung zu 24 h, 48 h und 5 d (14,5- 44,5 %).

Schließlich konnte ich einen signifikanten Zusammenhang zwischen Veränderung der ZO-1 Lokalisation und Wundheilungsfortschritt (unabhängig vom Zeitpunkt nach Verwundung) beobachten, d.h. eine stetige Zunahme von Modellen mit verbreiteter Expression von ZO-1 im Laufe des Wundheilungsfortschritts. Auch über die Bedeutung von ZO-1 in der Epidermis bzw. Keratinozyten ist noch wenig bekannt. Unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass es keinen Einfluss auf die Proliferation von Keratinozyten hat.

Dahingegen führt ein Verlust des Proteins zu einer tendenziell beschleunigten Migration von Keratinozyten. Das stetige Ansteigen des Proteins könnte also ein Abstoppen der Migration mit fortschreitender Wundheilung bedeuten. Allerdings ist es diesbezüglich verwunderlich, dass man keinen Verlust des Proteins am Wundrand nach Verwundung beobachtet. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Verminderung von ZO-1 zu einer verminderten Barrierefunktion von Keratinozyten führt (Kirschner und Kollegen, in preparation). Somit könnte eine verstärkte Expression wieder zu einer Kompensation des Verlustes von Cldn-1 beitragen. Schließlich wurde ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe beobachtet, dass der knock-down von ZO-1 mit einer verstärkten Expression von IL-1 $\beta$  einhergeht. Da eine wichtige Voraussetzung für das Fortschreiten der normalen Wundheilung eine Herabregulation von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  (nach einer anfänglichen Hochregulation) ist, könnte die verstärkte Expression von ZO-1 (und damit eine verminderte Bildung von IL-1 $\beta$ ) dazu beitragen.

## 5.2 TJ-Proteine als „Rettungssystem“ der Hautbarriere

Das Str. corneum der Epidermis ist die wichtigste Barriere der Haut. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass TJs in der menschlichen Haut eine Barriere bilden (Kirschner et al. 2010). Nach Verwundung der Epidermis muss möglichst schnell wieder eine adäquate Barriere geschaffen werden, um Wasser- und Elektrolytverlusten vorzubeugen und um den Körper vor pathogenen Keimen zu schützen. Wenn das Str. corneum beschädigt ist, könnten TJs als eine Art Rettungssystem der Barriere der Epidermis fungieren (Brandner et al. 2006). Wenn man von der Hypothese dieses „Rettungssystems“ ausgeht, dann würde man nach einer Verwundung der Epidermis zur Kompensation des (noch) fehlenden Str. corneum mit einer verstärkten Expression von TJ-Molekülen (und verstärkter TJ-Funktion) ausgehen. . Cldn-4 zeigt im Verlauf der Wundheilung sowohl am Wundrand, als auch in der regenerierenden Epidermis eine Verbreiterung, Cldn-1 allerdings nicht. Cldn-4 könnte hier gegebenenfalls stellvertretend für Cldn-1 an der Bildung einer neuen Barriere beteiligt sein. Das Protein Occludin weist am Wundrand kaum Veränderungen auf. In der regenerierenden Epidermis allerdings zeigt es sich verbreitert und könnte den gleichen, wie bei Cldn-4 beschriebenen Effekt, aufweisen. ZO-1 bestätigt die o. g. Hypothese ebenfalls offenbar: Sowohl am Wundrand, als auch in der regenerierenden Epidermis kommt es im Verlauf der Wundheilung zu einer verbreiterten Lokalisation. In diesem Zusammenhang wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob und wie sich die Barrierefunktion der TJs für Ionen (gemessen über den *Transepithelialen Widerstand* (TER)) und für Makromoleküle (gemessen über parazellulären Tracerflux) mit veränderter Proteinlokalisierung, auch zu verschiedenen Wundheilungsfortschritten, verhält. Dass eine veränderte Proteinlokalisierung

in der Haut auch eine Veränderung der TJ-Barriere-Lokalisation bedeutet, konnte in den Arbeiten von Kirschner und Kollegen 2010 gezeigt werden. Darüber hinaus konnte in Zellkulturexperimenten mit Keratinozyten gezeigt werden, dass eine veränderte Proteinlokalisierung unterschiedliche TERs widerspiegelt (Tunggal et al. 2005), (Yuki et al. 2007, Ohnemus et al. 2008, Kirschner 2009). Das Verhalten des TER in einer Wunde ist allerdings nicht trivial zu untersuchen, da für seine Messung eine durchgängige Zellschicht nötig ist.

Dass die Expression von TJ-Proteinen denen von Proteinen, die wichtig für die Str. corneum Barriere sind (Involucrin, Filaggrin) und der Bildung eines sichtbaren Str. corneum vorausgehen, konnte in der Arbeit von Brandner und Mitarbeitern 2002, in der Versuche an Hautäquivalenten und im ex-vivo Wundmodell des Menschen gemacht worden sind, gezeigt werden. Im Hautäquivalent sahen sie bereits nach 48 h eine deutliche Expression von Cldn-1 und Ocln obwohl noch kein Filaggrin, anwesend war. Im *ex vivo* Wundmodell wurden Cldn-1, Ocln und ZO-1 schon in frühen Stadien, gleich mit den ersten einwandernden Zellen und vor der Entstehung eines Str. corneum, in der Wundheilung gesehen und gingen der Ausbildung eines Str. corneums voraus. Meine Ergebnisse, die an einer größeren Zahl von Wundmodellen und zu mehreren Zeitpunkten am porcinen Modell durchgeführt wurden bestätigen also die Ergebnisse für Ocln und ZO-1 von Brandner und Mitarbeitern von 2002. Für Cldn-1 konnte ich zeigen, dass neben den bereits beschriebenen Vorkommen von Cldn-1 auch eine beträchtliche Anzahl von Modellen zum Zeitpunkt 24 h und 5 d keine Cldn-1 Expression in der regenerierenden Epidermis zeigen. Dafür konnte ich zeigen, dass Cldn-4, ein TJ-Protein, das von Brandner und Kollegen nicht untersucht wurde, in diesen Fällen verbreitert exprimiert ist und für Cldn-1 kompensieren könnte.

### 5.3 Beeinflussung der Lokalisation von TJ-Proteinen durch Zytokine

Die Ergebnisse in der dynamischen Wundheilung von unbehandelten Wunden zeigen, dass die Veränderung der TJ-Proteine Cldn-1, Cldn-4 und ZO-1 in der regenerierenden Epidermis einen Einfluss auf den Wundheilungsfortschritt haben könnten, während die Veränderungen am Wundrand davon unabhängig sind und (für Cldn-1 und ZO-1) eher aufgrund des Zeitpunkts nach Verwundung zu beobachten sind. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen habe ich die Wundheilung künstlich beschleunigt durch die Zugabe von Gap27, einem Cx-43 mimetischen Peptid, und habe es künstlich verlangsamt durch die Zugabe von hohen Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und einer Kombination der beiden Zytokine. Ziel dieses Experiments war zu überprüfen, ob man tatsächlich bei verminderter bzw. beschleunigter Wundheilung eine Expression der entsprechenden TJ-Proteine vergleichbar

zu dem natürlichen verminderten Wundheilungsscore hat. Natürlich darf man aber nicht außer Acht lassen, dass sowohl die Zytokine als auch Gap27 einen direkten Einfluss auf die TJ-Proteine haben können.

Die Zugabe einer Kombination der Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in einer Konzentration, die in chronischen Wunden vorhanden ist, führte tatsächlich zu einer signifikanten Verlangsamung der Wundheilung im Modell und ist somit ein wichtiger Schritt zum Nachstellen einer chronischen Wunde in einem ex-vivo Modell. Die Zugabe von TNF $\alpha$  alleine führte ebenfalls zu einer signifikanten Verlangsamung, von IL-1 $\beta$  zu einer Verlangsamung, die nicht statistisch signifikant war. Diese Ergebnisse bestätigen die negative Wirkung von erhöhten Leveln an TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf die Wundheilung.

Die Zugabe der Kombination der Zytokine führte für Cldn-1 am Wundrand zu keinem statistischen Unterschied im Vergleich zu unbehandelten Modellen, die ebenfalls 48 h inkubiert waren, d.h. die generelle Verlangsamung der Wundheilung hatte keinen verändernden Einfluss auf die Expression von Cldn-1. Erwartet hätte man eine Expression des Proteins vorwiegend in allen Schichten, vergleichbar zu dem zu der mit der Behandlung erreichten Wundheilungsscores. Allerdings konnte man dieses Lokalisationsmuster statistisch signifikant für die Einzelzugabe von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  beobachten, d.h. in mehr Modellen wurde das Molekül in allen Schichten gefunden. Möglicherweise deuten also die Veränderungen bei den Einzelzytokinen tatsächlich eine Veränderung des Lokalisationsmusters entsprechend des Wundheilungsfortschritts an, während bei der Kombination der Zytokine (auch) ein direkter Einfluss auf Cldn-1 zum Tragen kommt. Man kann allerdings nicht ausschließen, dass auch bei den für die Einzelzytokine beobachteten Lokalisationen bereits ein direkter Einfluss mitschwingt. In der regenerierenden Epidermis konnte kein Einfluss der Zytokine auf die TJ-Lokalisation beobachtet werden. Kirschner und Kollegen konnten 2009 in Zellkulturversuchen zeigen, dass die Zugaben von IL-1 $\beta$  zu kultivierten Keratinozyten nach Induktion der Differenzierung durch Calcium zu einem Anstieg des transepithelialen Widerstands und zu einer verstärkten Lokalisation von Cldn-1 an den Zellgrenzen führt. Die direkte Injektion von IL-1 $\beta$  in gesunde ex-vivo Hautmodelle führt allerdings zu einer teilweisen Herabregulation von Cldn-1 in den obersten Schichten. Diese Unterschiede in den einzelnen Systemen deutet darauf hin, dass man bei der Interaktion von Zytokinen von TJs immer sowohl den Zustand der Zellen (statisch oder dynamisch), den Einfluss der Zytokine auf die TJs und den Einfluss der Zytokine auf die zellulären Vorgänge berücksichtigen muss, wobei letztere sich auch gegenseitig beeinflussen können. In anderen Organen konnte man einen direkten Einfluss von Zytokinen auf die Funktion und Struktur von TJs und damit auf die Pathophysiologie der jeweiligen Erkrankung beobachten. Beispiele hierfür sind Mukoviszidose (Coyne et al. 2002), Atemwegsentzündungen beim Asthma bronchiale (Holgate 2007) oder beim Morbus Crohn (Schulzke et al. 2009).

Für Cldn-4 beobachtet man nach Behandlung mit der Kombination mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  eine verbreiterte Expression des Moleküls in signifikant mehr Modellen. Da man in der Dynamik der Wundheilung erst eine Verbreiterung und dann wieder eine Abnahme des Moleküls beobachtet, passt dies gut ins Bild, da dies einer weniger weit fortgeschrittenen Wundheilung entspricht. Allerdings beobachtet man auch mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  alleine eine Verlangsamung der Wundheilung, aber nur mit der Kombination diesen deutlichen Effekt, so dass dies nicht die einzige Erklärung sein kann und sich somit auch ein direkter Einfluss der Zytokine auf Cldn-4 vermuten lässt. Eine diesbezügliche Untersuchung in Zellkulturen wäre sehr interessant.

Für Ocln führt die Applikation von TNF $\alpha$  in 100% der Modelle zu einer Verbreiterung der Expression am Wundrand. Allerdings ist das nicht der Fall bei IL-1 $\beta$  und der Kombination von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Da Veränderungen von Ocln am Wundrand nicht mit dem Wundheilungsfortschritt korrelieren, passt dies ins Bild, da, obwohl alle drei Zytokine die Wundheilung verlangsamen, nur TNF $\alpha$  einen Effekt auf Ocln hat. Man kann somit von einem direkten Effekt von TNF $\alpha$  auf Ocln ausgehen. Interessant war, dass man keinen Effekt von IL-1 $\beta$  sah, da eine Injektion dieses Zytokins in unverwundete Schweinehaut zu einer verstärkten Expression von Ocln führt (Kirschner et al. 2009). Der Unterschied hierbei könnte darin liegen, dass wir hier bei der Wundheilung eine dynamische Situation haben, während das in normaler unverwundeter Haut nicht der Fall ist. In der regenerierenden Epidermis beobachtet man nach Zytokingabe eine verminderte Expression im Vergleich zu 48 h. Das Bild entspricht mehr dem von 24 h bzw. einem Score von 1,1-2.

Man beobachtet einen deutlichen Einfluss der Zytokine auf die Expression von ZO-1 am Wundrand, d.h. zu einer Verminderung des Anteils von Modellen mit Verbreiterung von ZO-1. Dies ähnelt den früheren Zeitpunkten der Wundheilung. Kirschner und Kollegen konnten 2009 zeigen, dass IL-1 $\beta$  die Expression von ZO-1 erhöht. Die hier gefundene verminderte Expression von ZO-1 steht dazu im Widerspruch und deutet auf einen direkten Einfluss der Wundheilungsverzögerung hin. An dieser Stelle ist die Überlegung anzustellen, ob nicht auch das PBS einen Einfluss auf ZO-1 haben könnte.

In der regenerierenden Epidermis führen alle Zytokine zu einer starken Verbreiterung der Expression von ZO-1. Das Expressionsmuster entspricht weder den Kontrollmodellen zu 48 h, noch Kontrollmodellen zu 24 h oder mit einem Score von 1,1-2. Somit muss man von einem direkten Einfluss der Zytokine auf ZO-1 ausgehen. Dies bestätigt Ergebnisse von Kirschner und Kollegen 2009, die zeigten, dass die Injektion von IL-1 $\beta$  in unverwundete Schweinemodelle zu einer Hochregulation von ZO-1 führt. Die verstärkte Expression kann, wie bereits oben erwähnt, verschiedene Folgen haben. Zum einen eine verminderte Migration, zum anderen eine weitere Verstärkung des IL-1 $\beta$ -Signals, im Sinne eines Teufelskreises und schließlich eine Veränderung der Permeabilität von TJs. Dies könnte gemeinsam zur Verlangsamung der Wundheilung führen. Interessanterweise sieht die

Verteilung von ZO-1 späteren Zeitpunkten der Wundheilung (5 d) bzw. späteren Wundheilungs-Scores ähnlicher. Es könnte somit zu einem verfrühten Abstoppen der Wundheilung kommen, die dann den Wundheilungsstopp nach sich zieht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  einen Einfluss auf die Lokalisation der TJ-Proteine während der Wundheilung zeigen, die z.T. die verlangsamte Wundheilung widerspiegeln, zum Teil nicht. Da die Zytokine in vielen Fällen die TJs vermutlich direkt beeinflussen aber auch die Wundheilung verlangsamen, ist es schwierig, die Veränderungen, die aufgrund einer verlangsamten Wundheilung zur Veränderung der TJs führt, von denen, die aufgrund der direkten Zytokinwirkung zu einer Veränderung der TJs führt, voneinander zu trennen. Darüber hinaus ist natürlich auch ein Einfluss der Zytokine auf die Wundheilung über die TJs möglich. Weitere Experimente in Zellkulturen, die nicht mehr Gegenstand dieser Doktorarbeit waren, sollen diesen direkten Einfluss von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf TJ-Proteine unter dynamischen und statischen Bedingungen weiter aufklären.

#### 5.4 Gap27 beeinflusst die Lokalisation von TJ-Proteinen

Gap27 ist ein mimetisches Peptid, das die Wirkung des Gap-Junction Proteins Connexin 43 vermindert. Wie auch bereits gezeigt (Pollok et al. 2011) beschleunigt die Zugabe von Gap27 die Wundheilung signifikant.

Gap27 führt in der regenerierenden Epidermis für alle Moleküle zu einer Verteilung, die mehr der unverwundeten Haut ähnelt und die häufig sogar noch über die Verteilung, die bei einem Score von 3- 4 bzw. beim späten Wundheilungszeitpunkt (5 d) beobachtet wird, hinausgeht. Man könnte also postulieren, dass diese Lokalisation den weiter fortgeschrittenen Wundheilungsfortschritt widerspiegelt. Am Wundrand führt es bei Cldn-1 und ZO-1 zu einer Lokalisation, die der normalen Haut ähnelt, bei Cldn-4 und Ocln findet man keinen deutlichen Unterschied zu den 48 h Kontrollmodellen. Auch hier ist es, wie bereits oben für die Zytokine ausgeführt, schwer zu trennen zwischen der Veränderung der TJ-Proteine, die man aufgrund der Wundheilungsbeschleunigung beobachtet von der Veränderung durch den direkten Einfluss von Gap27 auf TJ-Proteine. Darüber hinaus muss auch hier die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Gap27 die Wundheilung über die TJ-Proteine beeinflusst. Man weiß allerdings, dass ZO-1 und Connexin43 direkt interagieren können: 1998 wurde von Toyofuku und Mitarbeitern beschrieben, dass Cx43 in Kardiomyozyten mit ZO-1 kolokalisiert. Zudem ist bekannt, dass der C-Terminus von Cx43 an den N-Terminus von ZO-1 bindet, (Giepmans und Moolenaar 1998). Das Andocken und Blockieren von Cx43 könnte zu einer Verdrängung von ZO-1 und dadurch zu einem verstärkten Abbau führen (Becker und Kollegen 2012, in preparation). Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit eine Veränderung in der Lokalisation von ZO-1 hin zu einer verminderten Expression durch die



Zugabe von Gap27, gezeigt werden konnte, könnte einen Hinweis darauf geben, dass auch in diesem Fall eine Interaktion von Cx43 und ZO-1 stattgefunden hat, die durch die Bindung von Gap27 verändert stattgefunden hat. Dies könnte dann anschließend auch die Lokalisation von anderen TJ-Proteinen beeinflussen. Die Ergebnisse passen auch zu den Ergebnissen von Becker und Kollegen (2012, in preparation), der in Fibroblasten gezeigt hat, dass die Herabregulation von Cx43 mit antisense zu einer verminderten ZO-1 Expression führt.

Weitere Experimente in Zellkulturen, die nicht mehr Gegenstand dieser Doktorarbeit waren, sollen diesen direkten Einfluss von Gap27 auf ZO-1 und die anderen TJ-Proteine weiter aufklären.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Verwundung der Haut stellt eine maximale Verletzung der Hautbarriere dar, die regeneriert werden muss. Darüber hinaus müssen während der Wundheilung Zellen entdifferenzieren, proliferieren, migrieren und wieder differenzieren. TJs sind Zellverbindungen, die aus Transmembran- und Plaqueproteinen bestehen und eine enge Verbindung benachbarter Zellen gewährleisten. Sie dienen als mechanische Barriere, halten die Zellpolarität aufrecht und sind an zellulären Signalprozessen beteiligt. In der humanen Epidermis sind TJ-Proteine an der Barrierefunktion der Haut beteiligt. Auch ein Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten wurde gezeigt. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Frage nach der dynamischen Veränderung von TJ-Proteinen während der Wundheilung in Korrelation zum Wundheilungsfortschritt und zum Wundheilungszeitpunkt gestellt.

Dies wurde mit Hilfe eines porcinen *ex vivo* Wundheilungsmodells untersucht, an dem sowohl der Wundheilungsfortschritt als auch die Lage der TJ-Proteine Cldn-1, Cldn-4, Ocln und ZO-1 mit (Immun)-histologischen Techniken bestimmt wurden.

Des Weiteren wurde die TJ-Proteinlokalisierung bei beschleunigter und bei verlangsamter Wundheilung ermittelt. Dabei wurde ein Cx43 mimetisches Peptid (Gap27) zur Beschleunigung und die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in Konzentrationen, die aus chronischen Wunden bekannt sind, zum Verlangsamen der Wundheilung verwendet.

Ich konnte zeigen, dass die Veränderung der Lokalisation von Cldn-1 und ZO-1 am Wundrand signifikant mit dem Wundheilungszeitpunkt unabhängig vom Wundheilungsfortschritt und dass die Veränderung der Lokalisation von Cldn-1, Cldn-4 und ZO-1 in der regenerierenden Epidermis signifikant mit dem Wundheilungsfortschritt unabhängig vom Wundheilungszeitpunkt korreliert. Dies zeigt eine dynamische Veränderung der TJ Proteine während der Wundheilung. Es wurden keine signifikanten Veränderungen in der unbeteiligten Epidermis beobachtet, was einen grundsätzlichen Einfluss der Kulturbedingungen auf die Ergebnisse ausschließt. Die Zugabe von Gap27 führte tatsächlich zu einer signifikanten Beschleunigung der Wundheilung und ich beobachtete eine signifikante Veränderung für ZO-1 und Cldn-1 am Wundrand und für Cldn-1, Cldn-4, ZO-1 und Ocln in der regenerierenden Epidermis. Bei Zugabe von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder einer Kombination aus beiden in Konzentrationen, die für chronische Wunden typisch sind kam es zu einer signifikanten Verlangsamung der Wundheilung. Hier konnte ich eine signifikante Veränderung für Cldn-1, ZO-1 und Ocln am Wundrand und Cldn-4, ZO-1 und Ocln in der regenerierenden Epidermis beobachten. Allerdings zeigte eine detaillierte Analyse der Korrelationen, dass es aufgrund des komplexen Systems schwierig ist, direkte Effekte der

Zytokine bzw. des Cx43 mimetischen Peptids auf die TJ-Proteine von indirekten Effekten, die über die Beschleunigung bzw. Verlangsamung der Wundheilung wirken, zu unterscheiden. In zukünftigen Experimenten müsste deshalb das Verhalten von TJ-Proteinen unter statischen und dynamischen Bedingungen unter Einfluss der Zytokine /Gap27 noch weiter untersucht werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Agarwal SK, Novotny EA, Crabtree JS, Weitzman JB, Yaniv M, Burns AL, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ (2003) Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(19):10770-10775.
- Aijaz S, Balda MS, Matter K (2006) Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol*. 248:261-298.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1995. *Molekularbiologie der Zelle*. Weinheim: VCH
- Amagai M, Yamaguchi H, Nishifuji K, Sugai M, Stanley J (2002) Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. *J Invest Dermatol*. 118:845-850.
- Anderson JM, Van Itallie CM, Fanning AS (2004) Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol*. 16(2):140-145.
- Brandner J (2010) Adherens Junctions, Desmosomes and Tight Junctions in Epidermal Barrier Function. *The Open Dermatology*. 4:14-20.
- Brandner JM, Kief S, Grund C, Rendl M, Houdek P, Kuhn C, Tschachler E, Franke WW, Moll I (2002) Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol*. 81(5):253-263.
- Brandner JM, Houdek P, Husing B, Kaiser C, 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 JM, Kief S, Wladykowski E, Houdek P, Moll I (2006) Tight junction proteins in the skin. *Skin Pharmacol Physiol*. 19(2):71-77.
- Brandner JM, Poetzl C, Schmage P, Hauswirth U, Moll I (2008) A (leaky?) barrier: Tight junction proteins in skin diseases. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 5(1):e39-e45.
- Brandner JM (2009) Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *Eur J Pharm Biopharm*. 72(2):289-294.
- Brown EJ (1995) Phagocytosis. *Bioessays*. 17(2):109-117.
- Capaldo CT, Nusrat A (2009) Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*. 1788(4):864-871.
- Clark RA. 1996. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York Plenum Press
- Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG (2002) Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell*. 13(9):3218-3234.
- De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo

- RL, Novak N, Weidinger S, Beaty TH, Leung DY, Barnes KC, Beck LA (2011) Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 127(3):773-786 e771-777.
- Elias PM (1983) Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol.* 80 Suppl:44s-49s.
- Evans WH, Boitano S (2001) Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 4):606-612.
- Fahey TJ, 3rd, Sherry B, Tracey KJ, van Deventer S, Jones WG, 2nd, Minei JP, Morgello S, Shires GT, Cerami A (1990) Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. *Cytokine.* 2(2):92-99.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology.* 123:1777-1788.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *Journal of Cell Biology.* 156:1099-1111.
- Furuse M, Tsukita S (2006) Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* 16(4):181-188.
- Giepmans BN, Moolenaar WH (1998) The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr Biol.* 8(16):931-934.
- Goliger JA, Paul DL (1995) Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol Biol Cell.* 6:1491-1501.
- Gumbiner BM (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(8):622-634.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008) Wound repair and regeneration. *Nature.* 453(7193):314-321.
- Hart J (2002) Inflammation. 2: Its role in the healing of chronic wounds. *J Wound Care.* 11(7):245-249.
- Heldin CH, 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
- Holgate ST (2007) Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 120(6):1233-1244; quiz 1245-1236.
- Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W, Takai Y (2004) Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. *Semin Cell Dev Biol.* 15(6):643-656.
- Kirschner N (2009) Untersuchung der Expression, Lokalisation und Funktionalität von Tight Junctions in murinen und humanen Modellsystemen mit Barriere-defekten in der Haut. Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Hamburg.
- Kirschner N, Poetzl C, von den Driesch P, Wladykowski E, Moll I, Behne MJ, Brandner JM (2009) Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol.* 175(3):1095-1106.

- Kirschner N, Houdek P, Fromm M, Moll I, Brandner JM (2010) Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol.* 89(11):839-842.
- Kirschner N, Haftek M, Niessen CM, Behne MJ, Furuse M, Moll I, Brandner JM (2011) CD44 regulates tight-junction assembly and barrier function. *J Invest Dermatol.* 131(4):932-943.
- Kirschner N, Rosenthal R, Gunzel D, Moll I, Brandner JM (2012) Tight junctions and differentiation--a chicken or the egg question? *Exp Dermatol.* 21(3):171-175.
- Kupper TS (1990a) The role of epidermal cytokines. In: *Immunophysiology: The Role of Cells and Cytokines in Immunity and Inflammation.* E. Shevach, J. Oppenheim (Hrg.) Oxford University Press, New York, 285-305.
- Kupper TS (1990b) Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *J Clin Invest.* 86(6):1783-1789.
- Langbein L, Grund C, Kuhn C, Praetzel S, Kartenbeck J, Brandner JM, Moll I, Franke WW (2002) Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur J Cell Biol.* 81(8):419-435.
- Larson D, al. e (1990) Junctional Communication and the wound healing response. In: *Cell Intercommunication.* (Hrg.) CRC Press.
- Mack D, Bartscht K, Fischer C, Rohde H, de Grahl C, Dobinsky S, Horstkotte MA, Kiel K, Knobloch JK (2001) Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Methods Enzymol.* 336:215-239.
- Malminen M, Koivukangas V, Peltonen J, Karvonen SL, Oikarinen A, Peltonen S (2003) Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis. *Br J Dermatol.* 149(2):255-260.
- Matter K, Balda MS (2003) Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(3):225-236.
- Morita K, Itoh M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Furuse M, Yoneda K, Imamura S, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Subcellular distribution of tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, ZO-2) in rodent skin. *Journal of Investigative Dermatology.* 110:862-866.
- Nelson WJ (2003) Epithelial cell polarity from the outside looking in. *News Physiol Sci.* 18:143-146.
- Niessen CM (2007) Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 127(11):2525-2532.
- Ohnemus U, Kohrmeyer K, Houdek P, Rohde H, Wladykowski E, Vidal S, Horstkotte MA, Aepfelbacher M, Kirschner N, Behne MJ, Moll I, Brandner JM (2008) Regulation of epidermal tight-junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative *Staphylococcus* strains. *J Invest Dermatol.* 128(4):906-916.
- Oviedo-Orta E, Errington RJ, Evans WH (2002) Gap junction intercellular communication during lymphocyte transendothelial migration. *Cell Biol Int.* 26(3):253-263.
- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC (1997) The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol.* 137(6):1445-1457.

- Pollok S (2010) Connexin 43 als möglicher Angriffspunkt zur Beschleunigung normaler und diabetischer kutaner Wundheilung im humanen und porcinen System. Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Hamburg.
- Pollok S, Pfeiffer AC, Lobmann R, Wright CS, Moll I, Martin PE, Brandner JM (2011) Connexin 43 mimetic peptide Gap27 reveals potential differences in the role of Cx43 in wound repair between diabetic and non-diabetic cells. *J Cell Mol Med.* 15(4):861-873.
- Pummi K, Malminen M, Aho H, Karvonen SL, Peltonen J, Peltonen S (2001) Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 117(5):1050-1058.
- Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z (1988) Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science.* 241(4866):708-712.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke J-D, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell.* 11:4131-4142.
- Saurat JH, Didierjean L, Skalli O, Siegenthaler G, Gabbiani G (1984) The intermediate filament proteins of rabbit normal epidermal Merkel cells are cytokeratins. *Journal of Investigative Dermatology.* 83:431-435.
- Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286(6):C1213-1228.
- Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H, Richter J, Bojarski C, Schumann M, Fromm M (2009) Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 1165:294-300.
- Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 341(10):738-746.
- StaeHELIN LA (1974) Structure and function of intercellular junctions. *Annu Rev Cytol.* 39:191-283.
- Stevenson BR, Silicano JD, Mooseker M, Goodenough DA (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *Journal of Cell Biology.* 103:755-766.
- Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M (1998) Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 273(21):12725-12731.
- Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Gunzel D, Fromm M, Kemler R, Krieg T, Niessen CM (2005) E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *Embo J.* 24(6):1146-1156.
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell.* 126(4):741-754.
- VanItallie C, Rahner C, Anderson JM (2001) Regulated expression of claudin 4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest.* 107:1319-1327.

Yoshida Y, Morita K, Mizoguchi A, Ide C, Miyachi Y (2001) Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. *Archives of Dermatological Research*. 293:239-244.

Yuki T, Haratake A, Koishikawa H, Morita K, Miyachi Y, Inoue S (2007) Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Exp Dermatol*. 16(4):324-330.



## 8 LEBENSLAUF

### PERSONALIEN

Name und Vorname: Janina Stephanie Lentfer  
Geburtsdatum: 28.06.1986  
Geburtsort: Berlin  
Familienstand: ledig  
Vater: Joachim Lentfer  
Mutter: Heike Betty Charlotte Lentfer

### SCHULISCHER WERDEGANG

1993 - 1997 Anton-Rée-Grundschule, Hamburg  
1997 - 2006 Gymnasium Allermöhe, Hamburg  
13.06.2006 Abitur

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2006/07 Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Hamburg  
09.09.2008 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Herbst 2012 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## 9 DANKSAGUNG

Zunächst danke ich Frau Prof. Dr. Ingrid Moll für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die exzellente Möglichkeit, es in der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zu bearbeiten.

Ganz besonderen Dank gilt Frau PD Dr. Johanna Brandner, Leiterin des zellbiologischen Labors der Klinik für Dermatologie und Venerologie, die mich mit ihrer Hilfsbereitschaft, Großzügigkeit und Geduld, trotz Ihrer großen Belastung in Lehre und Forschung, zu jeder Zeit eifrig unterstützt hat. Ohne ihre konstruktive Kritik und ihren zahlreichen Anregungen wäre diese Arbeit nicht entstanden

Weiteren Dank schulde ich den wunderbaren Mitarbeitern aus dem zellbiologischen Labor. An dieser Stelle seien Dr. Simone Pollok, Christian Börnchen, Claudia Bohner, Thomas Volksdorf und Dr. Nina Kirschner erwähnt, die mich mit ihren unzähligen Hilfestellungen unterstützt haben. Eine fabelhafte Einarbeitung und umfassende Unterstützung in die Methoden dieser Arbeit erhielt ich von den medizinisch technischen Assistenten. Meinen Dank richte ich an dieser Stelle an Pia Houdek, Sabine Vidal, Ewa Wladykowski und Frank Fischer.

Ebenso danke ich Herrn Germar Schüring für die administrative Hilfe dieser Arbeit und Frau Sehner aus dem Institut für Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Eppendorf für ihren unermüdlichen Einsatz bei der statistischen Auswertung. Außerdem danke ich meinem Freund Thorsten Heilmann, meiner Schwester Inessa Lentfer, meinen Freunden und meinen Eltern, die mir reichlich emotionale und motivierende Unterstützung gaben, die für die Fertigstellung dieser Arbeit notwendig war.

## 10 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

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

Unterschrift: .....