

**Charakterisierung humaner diabetischer Haut und diabetischer
Modellsysteme bezüglich Barrierefunktion, Dermisstruktur und
der Wirkung von Triterpenen auf die Wundheilung**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik,

Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christopher Ueck

aus Lübeck

Hamburg

2016

meinen Eltern gewidmet

Annahme der Dissertation durch die Prüfungskommission am 29. März 2016

Datum der Disputation: 13. Mai 2016

Veröffentlichung der Dissertation mit Genehmigung der Prüfungskommission

Gutachter

1. Prof. Dr. rer. nat. Johanna Maria Brandner

Zell- und Molekularbiologisches Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

2. Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Burmester

Zoologisches Institut der Universität Hamburg

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, den 18.02.2016



Christopher Ueck

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
<i>Abstract</i>	3
1 Einleitung	
1.1 Aufbau der Haut	5
1.1.1 Epidermis	6
1.1.2 Dermis	7
1.2 Hautbarriere	9
1.2.1 Physikalische Barriere durch das <i>Stratum corneum</i>	9
1.2.2 <i>Tight Junctions</i>	10
1.2.2.1 TJ-Proteine in humaner Haut	12
1.3 Kutane Wundheilung	15
1.3.1 Ablauf der kutanen Wundheilung	16
1.3.1.1 Hämostase und inflammatorische Phase	16
1.3.1.2 Regenerationsphase	16
1.3.1.3 Remodellierungsphase	17
1.3.2 Bedeutung von Connexinen in der Wundheilung	19
1.3.3 Bedeutung von Triterpenen in der Wundheilung	20
1.3.3.1 Triterpenextrakt aus den Korkschichten der äußeren Rinde von Birken	21
1.4 Diabetes mellitus	22
1.4.1 Physiologische Steuerung der Glukose-Aufnahme und -Verwertung	22
1.4.2 Klassifikation des <i>Diabetes mellitus</i>	24
1.4.2.1 Typ-1- <i>Diabetes</i>	24
1.4.2.2 Typ-2- <i>Diabetes</i>	24
1.4.3 Auswirkungen des <i>Diabetes mellitus</i> auf die Haut	25
1.4.4 Aktuelle Behandlungskonzepte bei diabetischen Wunden	28
1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit	28
2 Material	
2.1 Geräte	30
2.2 Chemikalien	32
2.3 Galenische Formulierungen mit Triterpenextrakt-Anteil für Wundheilungsanalysen	33
2.3.1 <i>In-vitro</i> -Wundheilungsanalysen	33
2.3.2 <i>Ex-vivo</i> -Wundheilungsanalysen	34
2.4 Lösungen	34
2.5 Kits	34
2.6 Peptide	35
2.7 Antikörper	35
2.7.1 Antikörper für immunhistochemische Analysen	35
2.7.2 Antikörper für <i>Western-Blot</i> -Analysen	36
2.8 DNA-Oligonukleotide	37
2.9 Gewebe und Zellen	38

2.10	Software	41
3	Methoden	
3.1	Zellkultur	42
3.1.1	Anzucht humaner Keratinozyten aus infanten Vorhäuten	42
3.1.2	Anzucht humaner Keratinozyten aus dem Hautgewebe adulter nicht-diabetischer und diabetischer und Spender	43
3.1.3	Subkultivierung von primären humanen Keratinozyten	43
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl von primären humanen Keratinozyten	44
3.1.5	Kryokonservierung von primären humanen Keratinozyten	45
3.1.6	Auftauen von primären humanen Keratinozyten	45
3.1.7	<i>Scratch-Assay</i>	45
3.1.7.1	Klassischer <i>Scratch-Assay</i>	46
3.1.7.2	<i>IncuCyte-Zoom®</i> -System in Kombination mit dem <i>Woundmaker™</i> ...	47
3.1.7.3	Auswertung der <i>Scratch-Assays</i>	47
3.1.8	Bestimmung der Proliferation humaner adulter Keratinozyten	48
3.1.9	Permeabilitätsanalysen an kultivierten humanen adulten Keratinozyten	49
3.1.9.1	Vorbereitung der Keratinozyten in <i>Transwells</i>	49
3.1.9.2	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER)	50
3.1.9.3	Bestimmung der Permeabilität von FD-4 und FD-40 an Primärkulturen von humanen adulten Keratinozyten	51
3.2	Gewebekultur	52
3.2.1	Herstellung und Kultivierung von porcinen <i>Ex-vivo</i> -Modellen	52
3.2.2	Verwundung der <i>Ex-vivo</i> -Modelle	53
3.2.3	Das diabetische <i>Ex-vivo</i> -Wundheilungsmodell	53
3.2.4	Applikation von Substanzen in die Wunde der <i>Ex-vivo</i> -Modelle	54
3.2.5	Kryokonservierung von porcinem und humanem Hautgewebe	54
3.2.6	Auswertung der <i>Ex-vivo</i> -Wundheilungsmodelle	54
3.2.7	Kryokonservierung von humanem und porcinem Gewebe zur Analyse mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop	55
3.3	Histologische Methoden	56
3.3.1	Anfertigung von vertikalen Kryoschnitten	56
3.3.2	Anfertigung von horizontalen Kryoschnitten für die Analyse mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop	56
3.3.3	HE-Färbung (Hämalaun nach Mayer/Eosin)	56
3.3.4	Fixierung von Gewebeschnitten	57
3.3.5	Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von kryokonserviertem Gewebe ...	57
3.3.5.1	Auswertung der Intensität und Lokalisation der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung von kryokonserviertem Gewebe	59
3.3.6	Zwei-Photonen-Mikroskopie	60
3.3.6.1	Das Prinzip der Zwei-Photonen-Mikroskopie	60
3.3.6.2	Messung des <i>Second-Harmonic-Generation</i> (SHG)-Signals von Kollagenfasern und der Autofluoreszenz von Elastinfasern in der Dermis humaner und porciner Haut	62
3.4	Molekularbiologische Methoden	65
3.4.1	Proteine	65
3.4.1.1	Proteinisolation aus adhärennten Kulturzellen	65
3.4.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach <i>Bradford</i>	65
3.4.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	67

3.4.1.4	Transfer von Proteinen auf eine Membran	68
3.4.1.5	Anfärbung von Proteinbanden im SDS-Gel	69
3.4.1.6	Proteindetektion mittels Antikörperreaktion	69
3.4.1.7	<i>Strippen</i> von Nitrozellulosemembranen	70
3.4.2	Nukleinsäuren	71
3.4.2.1	Isolierung von RNA aus Gewebe und kultivierten Zellen	71
3.4.2.1.1	Vorbereitung von kryokonserviertem humanem Gewebe	71
3.4.2.1.2	Vorbereitung der kultivierten Zellen	71
3.4.2.1.3	Aufreinigung von RNA	72
3.4.2.1.3.1	Gewebe	72
3.4.2.1.3.2	Kultivierte, adhärenzte Keratinozyten	72
3.4.2.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und der RNA-Reinheit	73
3.4.2.3	Überprüfung der RNA-Integrität	73
3.4.2.4	Synthese von komplementärer DNA (cDNA)	74
3.4.2.5	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR (qRT-PCR) mittels <i>TaqMan</i> [®] -Sonden	75
3.4.2.6	Relative RNA-Quantifizierung	77
3.4.2.7	Alternative Analyse der Genexpression	78
3.4.2.7.1	Synthese von komplementärer DNA	78
3.4.2.7.2	<i>High Throughput Real Time quantitative PCR</i> mittels <i>TaqMan</i> [®] -Sonden	79
3.5	Statistische Auswertungen	80
4	Ergebnisse	
4.1	Hautbarriere und <i>Diabetes mellitus</i>	81
4.1.1	TJ-Proteine in diabetischer und nicht-diabetischer humaner Haut	81
4.1.1.1	Immunintensität und Lokalisation von TJ-Proteinen in Hautgewebe von Diabetikern im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollen	81
4.1.2	Genexpression von TJ-Proteinen in humanem Gewebe und in daraus isolierten Keratinozyten	86
4.1.3	Die Immunlokalisation und -intensität sowie die Genexpression von Filaggrin in Hautgewebe von Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen	87
4.1.4	Einfluss des diabetischen Phänotyps von humanen Keratinozyten auf die physikalische Barriere für Ionen sowie höher- und hochmolekulare Substanzen	88
4.1.5	Auswirkungen von Hyperglykämie und Insulinresistenz auf die Ionenpermeabilität von primären humanen Keratinozyten	90
4.1.5.1	Auswirkungen hyperglykämischer Bedingungen auf die Ionenpermeabilität von Keratinozyten nicht-diabetischen Ursprungs	90
4.1.5.2	Auswirkungen einer in Zellkultur induzierten Insulinresistenz auf die Ionenpermeabilität von Keratinozyten nicht-diabetischen Ursprungs	91
4.1.5.2.1	Antagonisierung des Insulin-Rezeptors	91
4.1.5.2.2	Gleichzeitige Antagonisierung des Insulin-Rezeptors und des IGF- <i>I</i> -Rezeptors	93
4.2	Dermisstruktur und <i>Diabetes mellitus</i>	96
4.2.1	Genexpression verschiedener Strukturproteine in der Dermis humaner Haut	96
4.2.2	Orientierung von Kollagen- und Elastinfasern in der Dermis humaner Haut	97
4.2.2.1	Räumliche Ausrichtung von Kollagen- und Elastinfasern in humanem Gewebe diabetischer Spender im Vergleich zu gesunden Kontrollen	98
4.2.3	Polaritäten von Kollagen- und Elastinfasern in porcinem Gewebe nach Kultivierung unter hyperglykämischen im Vergleich zu euglykämischen Bedingungen	100

4.3	Wundheilung und <i>Diabetes mellitus</i>	104
4.3.1	<i>Tight-Junction</i> -Proteine in der diabetischen Wundheilung	104
4.3.1.1	Genexpression von TJ-Proteinen in humanen diabetischen und nicht- diabetischen Keratinozyten unter Wundheilungsbedingungen ..	104
4.3.2	<i>Gap-Junction</i> -Proteine in der diabetischen Wundheilung	106
4.3.2.1	Lokalisation und Expression von Connexinen in diabetischen verglichen mit gesunden, nicht-diabetischen Geweben und Keratinozyten	106
4.3.3	Wundheilung in verschiedenen diabetischen Modellsystemen und seine Beeinflussung durch den Triterpenextrakt (TE) aus Birkenkork und seinen Einzelkomponenten	110
4.3.3.1	Charakterisierung zweier <i>Scratch-Assay</i> -Varianten zur Untersuchung der <i>In-vitro</i> -Wundheilung	111
4.3.3.2	Analyse der <i>In-vitro</i> -Wundheilung von Keratinozyten diabetischen verglichen mit nicht-diabetischen Ursprungs mit zwei <i>Scratch-Assay</i> -Varianten	112
4.3.3.3	Auswirkungen hyperglykämischer Bedingungen auf die <i>Scratch</i> -Wundheilung von primären humanen Keratinozyten - Etablierung von diabetischen <i>In-vitro</i> -Wundheilungsmodellen	113
4.3.3.3.1	Auswirkungen verschiedener Kulturmedien auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung von humanen infanten Keratinozyten unter hyperglykämischen im Vergleich zu euglykämischen Bedingungen	114
4.3.3.3.2	Einfluss von Zusatzstoffen im <i>Keratinocyte-SFM</i> -Medium auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung von humanen infanten Keratinozyten unter verschiedenen Glukose-Bedingungen	116
4.3.3.4	Analyse der <i>In-vitro</i> -Wundheilung von adulten, nicht-diabetischen und diabetischen humanen Keratinozyten unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen mit zwei <i>Scratch-Assay</i> -Varianten	118
4.3.3.5	Etablierung diabetischer <i>Ex-vivo</i> -Wundheilungsmodelle	121
4.3.3.5.1	Einfluss verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Wundheilung und den Phänotyp von porcinen <i>Ex-vivo</i> -Wundheilungsmodellen	121
4.3.3.6	Analyse von TE und seiner Hauptkomponente Betulin in diabetischen Modellsystemen	123
4.3.3.6.1	Einfluss von TE in verschiedenen galenischen Formulierungen auf die <i>Ex-vivo</i> -Wundheilung unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen	123
4.3.3.6.2	Einfluss von W/O-Emulsionen mit unterschiedlichem Wassergehalt auf die Wundheilung im porcinen <i>Ex-vivo</i> -Wundheilungsmodell	123
4.3.3.6.3	Einfluss von TE in verschiedenen galenischen Formulierungen auf die porcine <i>Ex-vivo</i> -Wundheilung unter hyperglykämischen Bedingungen	124
4.3.3.6.4	Auswirkungen von TE und seiner Hauptkomponente Betulin auf die Wundheilung in verschiedenen diabetischen <i>In-vitro</i> -Modellsystemen	125
4.3.3.6.5	Einfluss von TE und seiner Hauptkomponente Betulin auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung infanter Keratinozyten	126
4.3.3.6.6	Einfluss von TE und seiner Einzelkomponenten auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung adulter, nicht-diabetischer Keratinozyten unter verschiedenen Glukosebedingungen	128

4.3.3.6.7	Einfluss von TE und seiner Einzelkomponenten auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung diabetischer Keratinozyten	132
4.3.3.6.8	Einfluss von TE und Betulin auf das Proliferationsvermögen adulter, nicht-diabetischer Keratinozyten unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen	134
5	Diskussion	
5.1	Charakterisierung der physikalischen Hautbarriere bei Diabetikern und in diabetischen Zellen	136
5.1.1	Die Haut von Diabetikern weist Veränderungen für TJ- und SC-Proteine auf.	136
5.1.2	Diabetische Keratinozyten weisen eine erhöhte Permeabilität für Ionen sowie für höher- und hochmolekulare Substanzen auf.	138
5.1.3	Mögliche Ursachen des verminderten TER in diabetischen Keratinozyten	140
5.2	Charakterisierung der Dermisstruktur von humaner diabetischer Haut	142
5.2.1	Die Genexpression dermalen Strukturproteine ist in Fibroblasten diabetischen Ursprungs im Vergleich zu gesunden Kontrollen verändert.	142
5.2.2	Kollagenfasern weisen in humaner diabetischer Haut eine veränderte Orientierung im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf.	144
5.2.3	Die Orientierungen von Kollagen- und Elastinfasern in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut können mit porcinem Hautgewebe nicht nachgestellt werden.	145
5.3	Auswirkungen des <i>Diabetes mellitus</i> auf die Wundheilung	146
5.3.1	TJ-Proteine sind vor und während der diabetischen im Vergleich zur normalen <i>In-vitro</i> -Wundheilung auf mRNA-Ebene verändert exprimiert.	146
5.3.2	Charakterisierung der <i>Gap-Junction</i> -Proteine Cx26 und Cx43 in unverwundeter diabetischer Haut und in der diabetischen Wundheilung	147
5.3.3	Einfluss eines Triterpenextraktes aus dem Korkmaterial der äußeren Rinde von weißen Birken (<i>Betulae cortex</i>) auf die diabetische Wundheilung	149
5.3.3.1	Beurteilung der Eignung von verschiedenen <i>In-vitro</i> - und <i>Ex-vivo</i> -Modellen zur Untersuchung der diabetischen Wundheilung bzw. zur Testung von neuen Wirkstoffen	150
5.3.3.2	Hochosmotische, aber euglykämische Kulturbedingungen als Kontrolle für Hyperglykämie zeigten ebenfalls negative Auswirkungen auf die <i>In-vitro</i> - und <i>Ex-vivo</i> -Wundheilung.	155
5.3.3.3	Der Effekt von TE und Betulin auf die Wundheilung im diabetischen Kontext.	156
6	Verzeichnisse	
6.1	Literaturverzeichnis	160
6.2	Abbildungsverzeichnis	181
6.3	Tabellenverzeichnis	183
6.4	Formelverzeichnis	184
6.5	Abkürzungsverzeichnis	184
Publikationen		188
Danksagung		189

Zusammenfassung

Diabetes mellitus stellt eine Stoffwechselerkrankung dar, die mit einer Fehlregulation des Glukosemetabolismus einhergeht. Aufgrund von Bewegungsmangel und fettreicher Ernährung ist Typ-2-*Diabetes* in den vergangenen Jahrzehnten zu einer Volkskrankheit geworden und wird als eines der größten Gesundheitsprobleme der Zukunft angesehen. *Diabetes mellitus* Typ 2 ist durch einen Zustand gekennzeichnet, bei dem die Körperzellen betroffener Patienten nicht adäquat auf Insulin ansprechen (Insulinresistenz). Aus dem fehlenden Abstrom von Glukose in die Gewebe resultiert ein erhöhter Blutzuckerspiegel. Bei chronischer Hyperglykämie können sich pathologische Veränderungen verschiedener Organe manifestieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen des *Diabetes mellitus* auf die kutane Homöostase hinsichtlich der Barrierefunktion, der Dermisstruktur und der Fähigkeit zur Wundheilung analysiert. Darüber hinaus wurde ein Triterpenextrakt aus der Birkenrinde (TE), dessen positive Wirkung auf die normale Wundheilung bekannt ist, unter Verwendung verschiedener Modellsysteme hinsichtlich seines Potenzials, auch die diabetische Wundheilung zu fördern, charakterisiert.

Die Untersuchung von Komponenten der physikalischen Hautbarriere zeigte, dass die TJ-Proteine Claudin-1, Claudin-4 und Occludin auf Proteinebene und/oder mRNA-Ebene in humaner Haut diabetischen Ursprungs signifikant vermindert gefunden wurden. Das *Stratum-corneum*-Protein Filaggrin war sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene tendenziell erhöht. Permeabilitätsanalysen an kultivierten Keratinozyten zeigten, dass Zellen diabetischen Ursprungs eine erhöhte Durchlässigkeit für Ionen sowie für höher- und hochmolekulare Substanzen besaßen. In Folgeexperimenten wurde nachgewiesen, dass der erhöhte Ionendurchfluss sowohl durch hyperglykämische Kulturbedingungen als auch durch Inhibition der Insulin-vermittelten Signaltransduktion (Insulinresistenz) teilweise nachgestellt werden konnte. Diese Ergebnisse legen eine verminderte Hautbarriere von Diabetikern nahe, die für ihre erhöhte Infektionsgefahr mitverantwortlich sein könnte.

Die Analyse von Proteinen der Dermis in diabetischem verglichen mit nicht-diabetischem Hautgewebe ergab für Kollagen I ($\alpha 1$) und Kollagen V ($\alpha 2$) heterogen veränderte mRNA-Level. Für Elastin und Fibronectin wurde eine tendenziell verminderte Genexpression beobachtet, während sich für Fibrillin-1 ein Trend zu einem erhöhten mRNA-Level zeigte. Unter Anwendung der Zwei-Photonen-Mikroskopie wurde für Kollagenfasern eine signifikant erhöhte Variabilität bestimmter Orientierungen in diabetischer Haut beobachtet, die mit negativen Auswirkungen

auf die Integrität der Haut assoziiert sein könnte. Solche strukturellen Veränderungen der Dermis könnten beispielsweise auch zur eingeschränkten Wundheilung von Diabetikern beitragen. Für Elastinfasern zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen Geweben verschiedenen Ursprungs. Die Nachstellung der veränderten Orientierungen von Kollagenfasern in humaner diabetischer Haut mit porcinem Gewebe, das bei erhöhter Glukosekonzentration kultiviert wurde – in der Absicht, ein Testsystem für die Wirkung von aktiven Substanzen auf die diabetische Dermisstruktur zu entwickeln –, war nicht möglich.

Bezüglich der diabetischen Wundheilung konnten für die TJ-Proteine Claudin-1, Claudin-4 und Occludin auf mRNA-Ebene signifikante Unterschiede zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Keratinozyten beobachtet werden. Dies deutet einen Einfluss dieser Proteine auf die diabetische Wundheilung an. Zur Analyse des TE wurden zunächst *In-vitro* (primäre humane Keratinozyten)- und *Ex-vivo* (porcines Hautgewebe)-Modelle etabliert, die das verminderte Wundheilungsvermögen von diabetischer Haut nachstellen. Die *In-vitro*-Wundheilungsmodelle zeigten profunde Limitierungen bei der Austestung von TE und lieferten Ergebnisse, die zum Teil seiner *In-vivo*-Wirkung widersprachen. Das *Ex-vivo*-Modell entspricht deutlich mehr der *In-vivo*-Wundheilungscharakteristik. Bei seiner Verwendung konnte ein signifikant positiver Effekt von TE auf die Wundheilung unter hyperglykämischen Bedingungen beobachtet werden. Daher könnte TE eine vielversprechende Option zur Behandlung diabetischer Ulzera sein.

Abstract

Diabetes mellitus is a disorder associated with a dysregulation of the glucose metabolism. Due to a sedentary lifestyle und high-fat diet, type 2 diabetes has become a widespread disease over the last decades and is regarded one of the major health problems of the future. Type 2 diabetes is characterised by a state called insulin resistance, the gradually increasing inability of the body cells to properly respond to insulin, that is, to take in glucose. As a consequence of this, sugars accumulate in the blood. If remaining undiagnosed, a state of chronic hyperglycemia will establish. Persistently elevated blood glucose levels possibly lead to pathological alterations affecting various organs. In the present thesis, the impact of diabetes mellitus on the cutaneous homeostasis concerning barrier function, dermis structure and wound healing capacity was analysed. Besides, a triterpene extract from birch bark (TE), whose positive effect on normal wound healing is known, was tested in respect of its potential to promote diabetic wound healing using different model systems.

Analysing components of the physical skin barrier, it could be shown that the tight junction proteins claudin-1, claudin-4 and occludin were downregulated on protein and/or mRNA level. Filaggrin, a protein of the stratum corneum, was tendentially elevated both on protein and mRNA level. Permeability analyses of cultured keratinocytes showed an increase in flux of ions and larger molecules in cells of diabetic origin. The elevated permeability of ions could be partly reproduced when keratinocytes of non-diabetic origin were cultured under hyperglycemic conditions and under insulin resistance conditions. These results suggest a disturbed skin barrier of diabetics which could be responsible for their higher risk of infections.

The analysis of dermis structure in diabetic compared to non-diabetic human skin showed heterogenously altered mRNA levels of collagen I ($\alpha 1$), collagen V ($\alpha 2$). The mRNA levels of elastin and fibronectin were tendentially downregulated, while there was a trend for an increased gene expression of fibrillin 1. By means of two-photon microscopy, a significantly higher variability of specific collagen fiber orientations was observed in diabetic skin, which might be associated with negative effects on skin integrity. Such structural alterations of the dermis might also contribute to decreased wound healing capacity of diabetics. For elastin fibers there were only marginal changes between the tissues of different origin. The simulation of collagen fiber orientations seen in human diabetic skin using porcine skin, that was incubated

under hyperglycemic conditions – with the intention to develop a testing system for the analysis of active substances on diabetic dermis structure –, was not possible.

Concerning the characterization of diabetic wound healing, significant differences of mRNA levels of the tight junction proteins claudin-1, claudin-4 and occludin were found in diabetic keratinocytes compared to non-diabetic keratinocytes. This observation suggests an influence of these proteins on diabetic wound healing. To analyse the effect of TE, I first established in vitro (primary human keratinocytes) and ex vivo (porcine skin tissue) models, which mimic the reduced wound healing capacity of diabetic skin. The use of in vitro wound healing models was associated with profound limitations in testing TE and led to results that are in part contradictory to its effects in vivo. In the ex vivo model, which rather displays in vivo wound healing characteristics, a significantly positive effect of TE could be detected under hyperglycemic conditions. Therefore, TE might be a promising option in treating diabetic ulcers.

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut stellt mit einer Fläche von eineinhalb bis zwei Quadratmetern das größte menschliche Organ dar. Sie setzt sich aus drei Schichten zusammen (**Abbildung 1.1**). Die Epidermis (Oberhaut) bildet die äußerste Lage und ist über die Basalmembran strukturell mit der darunter gelegenen Dermis (Lederhaut) verbunden. Epidermis und Dermis werden begrifflich zur Kutis (Haut) zusammengefasst. Als tiefste Schicht der Haut folgt das Unterhautfettgewebe (Subkutis). Nach unten grenzt die Subkutis an die allgemeine Körperfaszie und dient damit als Bindeglied zwischen der Haut und tiefer gelegenen Strukturen wie Muskeln. Die Dicke der Haut ist abhängig von Körperlokalisierung, Alter und Geschlecht. Im Folgenden wird der Aufbau von Epidermis und Dermis jeweils näher betrachtet.

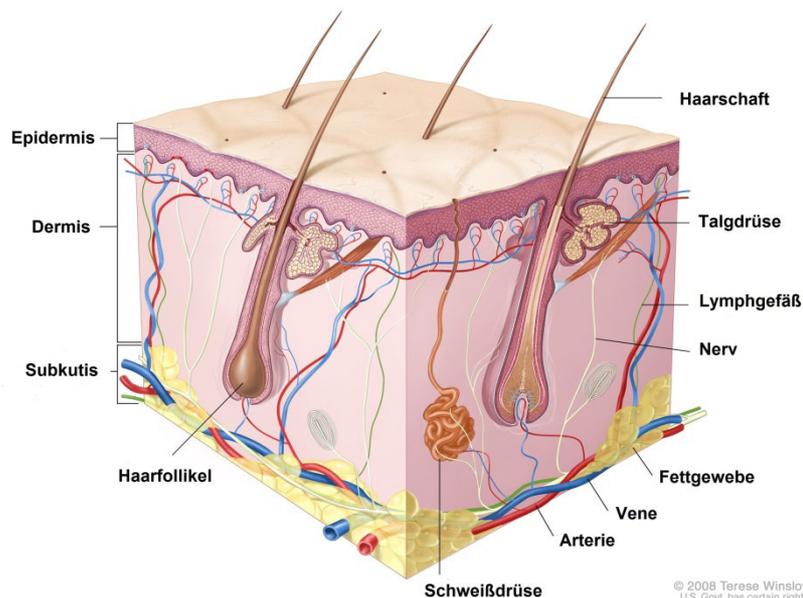


Abbildung 1.1: Schematischer Querschnitt der menschlichen Haut. Die Haut besteht aus der Epidermis mit ihren charakteristischen zapfenförmigen Ausstülpungen (Reteleisten) in die darunter liegende Dermis, gefolgt von der Subkutis. Hautanhangsgebilde (Haarfollikel mit assoziierter Talgdrüse und Haarbalgmuskel sowie Schweißdrüsen) haben ihren Ursprung in der unteren Dermis. Ihre Ausführungsgänge reichen bis zur Hautoberfläche. Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenfasern erstrecken sich von der Subkutis bis in die obere Dermis (Abbildung modifiziert nach Winslow, 2008).

1.1.1 Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel ohne Blutgefäße. Ihre Sauerstoff- und Nährstoffversorgung erfolgt ausschließlich per Diffusion aus der darunter liegenden Dermis. Die Epidermis besteht zu über 90 % aus Keratinozyten. Zu den weiteren Zellpopulationen gehören Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und Lymphozyten. Ihre Dicke variiert je nach Körperlokalisierung, Alter und Geschlecht zwischen 30 bis 300 µm (Moll, 2010; Sterry, 2011).

Unmittelbar oberhalb der Basallamina, die das verbindende Element zwischen Dermis und Epidermis darstellt, befindet sich das einschichtige *Stratum basale*. Die Keratinozyten weisen eine kuboide Gestalt auf und sind basal über Hemidesmosomen verankert. Sie verfügen über mitotische Aktivität und charakterisieren diese Zellschicht daher als Kompartiment der Proliferation. Eine der zwei Tochterzellen verbleibt im *Stratum basale*, die andere durchwandert die suprabasalen Schichten der Epidermis und reift in einem Prozess, der terminale Differenzierung genannt wird, zu einem toten Keratinozyten an der Hautoberfläche. Das Kompartiment der Differenzierung beginnt mit dem vielschichtigen *Stratum spinosum*. Im Vergleich zum *Stratum basale* weisen die Keratinozyten hier eine polygonale Morphologie auf. Dieses stachelige Erscheinungsbild resultiert aus Zytoplasmaausläufern, an deren Enden benachbarte Keratinozyten über Desmosomen miteinander verbunden sind. In höheren Schichten des *Stratum spinosum* flachen die Zellen zunehmend ab und es kommt zur Ausbildung von *lamellar bodies*, die Lipide und Enzyme einschließen (Odland, 1960). Im anschließenden ein- bis mehrschichtigen *Stratum granulosum* setzt sich die terminale Differenzierung der Keratinozyten fort. Dazu gehört die weitere Abflachung der Zellen. Zudem reichern sich im Zytoplasma der Keratinozyten basophile Keratohyalin granula an (Fukuyama und Epstein, 1967). Die Verhornung der Keratinozyten geht mit der Lyse aller Zellorganellen einher. Parallel dazu wird der lipidreiche Inhalt der *lamellar bodies* zum Aufbau einer hydrophoben Lipidmatrix in den Interzellularraum ausgeschleust. Darüber hinaus werden Proteine des Zytoplasmas unterhalb der Plasmamembran durch Transglutaminasen quervernetzt und bilden so eine stabile Hornhülle (*cornified envelope*) (Rice und Green, 1977; Sun und Green, 1976). Am Ende der Keratinisierung nach dieser genetisch programmierten Abfolge von morphologischen Veränderungen und Stoffwechselfvorgängen steht ein terminal differenzierter, maximal abgeflachter Korneozyt mit extrazellulären Lipiden, die gemeinsam das *Stratum corneum* bilden. Korneozyten sind dicht gefüllt mit Keratinmakrofibrillen, die in ein amorphes Material eingebettet sind. Das *Stratum corneum* als äußerste Schicht der Epidermis kann je nach Körperregion zwischen 12 und 200 Zellschichten stark sein. Die Zeit vom Beginn der terminalen epidermalen Differenzierung bis hin zum Abschilfern eines Korneozyten von der Hautoberfläche beträgt ungefähr vier Wochen (**Abbildung 1.2**) (Moll, 2010; Sterry, 2011).

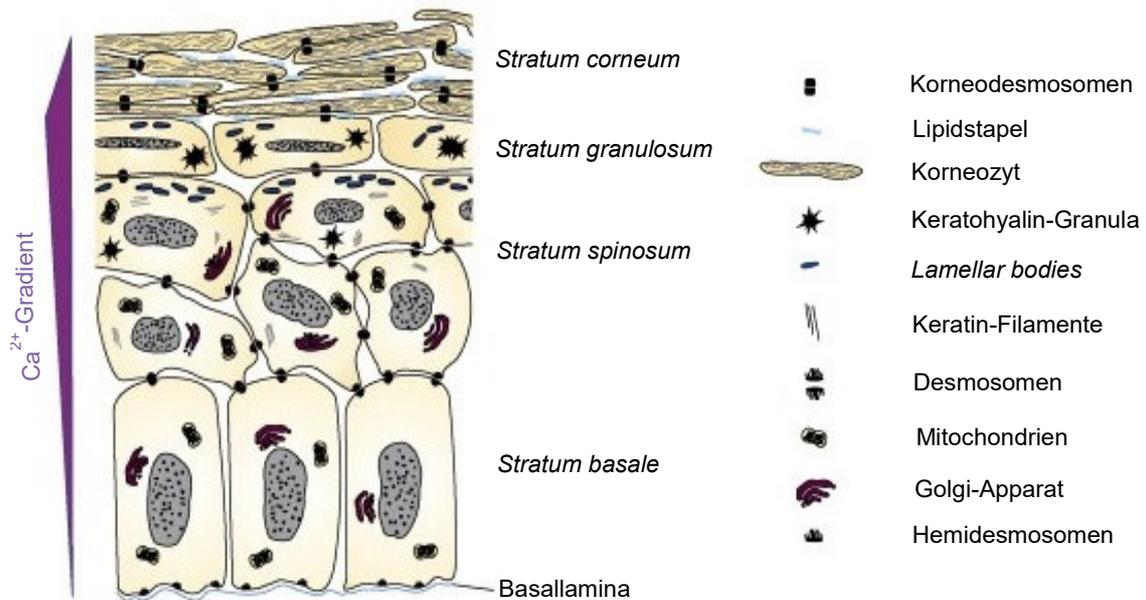


Abbildung 1.2: Schematischer Querschnitt der Epidermis. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Plattenepithelgewebe, das sich aus *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* zusammensetzt. Zur Tiefe ist die Epidermis durch die Basallamina begrenzt. Die ausgehend vom *Stratum basale* hin zum *Stratum granulosum* sukzessiv ansteigende Konzentration extrazellulärer Calcium-Ionen trägt maßgeblich zur Differenzierung der Keratinozyten bei. Im *Stratum corneum* sinkt sie steil ab (Abbildung modifiziert nach Ovaere *et al.*, 2009).

1.1.2 Dermis

Als Dermis oder Lederhaut (lat. *Corium*) wird die Hautschicht zwischen der Epidermis und dem subkutanen Fett bezeichnet. Sie besteht hauptsächlich aus Bindegewebe und Zellen, die in eine gelartige Matrix eingebettet sind. Histologisch betrachtet wird die Dermis in zwei Schichten unterteilt, das an die Epidermis grenzende *Stratum papillare* und das darunter liegende *Stratum reticulare* (**Abbildung 1.3**). Das *Stratum papillare* erstreckt sich in die Räume zwischen den Reteleisten der Epidermis. Die in die Epidermis ragenden Ausstülpungen des *Stratum papillare* werden als dermale Papillen bezeichnet. Das Prinzip der Verzahnung bildet die Grundlage für eine vergrößerte Kontaktfläche zwischen Dermis und Epidermis. Auf diese Weise wird nicht nur der mechanische Zusammenhalt beider Schichten gefestigt, sondern auch die ausreichende Versorgung der gefäßfreien Epidermis ermöglicht. Da die Abgabe von Sauerstoff und Nährstoffen an die Epidermis per Diffusion erfolgt, ist jede dermale Papille mit einer Blutkapillarschlinge ausgestattet, die aus dem subpapillären Gefäßplexus gespeist wird. Die Lymphkapillaren sind gleichermaßen angelegt. Zur Reizaufnahme verfügt sie zudem über zahlreiche freie Nervenendigungen und Tastkörperchen. Das *Stratum papillare* ist relativ arm an Bindegewebsfasern, die in Form lockerer Netzwerke aus feinen Elastinfasern und dünnen

Kollagenfasern vom Typ *III* vorhanden sind. Vielmehr enthält diese Schicht überwiegend Zellen und Matrixsubstanz. Letztere zeichnet sich durch hochmolekulare Glykosaminoglykane, Proteoglykane und Proteoglykanaggregate mit enormer Wasserbindungskapazität aus. Das wesentlich breitere *Stratum reticulare* weist ein dicht gepacktes Bindegewebe auf, das von Kollagenfasern dominiert ist. Diese setzen sich hauptsächlich aus homotypischen Fibrillen des Kollagen-Typs *I* zusammen. Daneben können ebenfalls heterotypische Fibrillen mit Kollagen-Typ *V*-Molekülen ausgebildet werden, die sich zumeist aus zwei $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Ketten zusammensetzen (Wenstrup *et al.*, 2004). Diese straffen, fibrillären Kollagen-Strukturen verleihen dem Gewebe Zugfestigkeit und mechanische Stabilität. Daneben besteht das *Stratum reticulare* aus Elastinfasern, die wellenartig in der gesamten Schicht verteilt sind. Sie stellen nach den Kollagenfasern den zweithäufigsten Fasertyp des Bindegewebes dar. Elastinfasern setzen sich aus dem Protein Elastin und weiteren Mikrofibrillen wie Fibrillin und Fibulin zusammen und bedingen die reversible Dehnbarkeit der Haut. In das bestehende Netzwerk aus Bindegewebsfasern fügen sich die Komponenten der Matrixsubstanz ein. Hierzu zählt unter anderem das Glykoprotein Fibronectin, das zelluläre Prozesse wie Migration, Wachstum, Differenzierung beeinflusst. Damit kommt dem Protein eine entscheidende Bedeutung im Rahmen der Wundheilung zu (Lenselink, 2015). Verglichen mit dem *Stratum papillare* sind im *Stratum reticulare* nur wenige Zellen vorhanden. Vereinzelt sind Fibroblasten in das Bindegewebe eingelagert, die für die Produktion der Strukturproteine zuständig sind. Oberhalb des Übergangs zur Subkutis im tiefen *Stratum reticulare* sind ein weiterer Gefäß- und Lymphplexus lokalisiert (Moll, 2010).

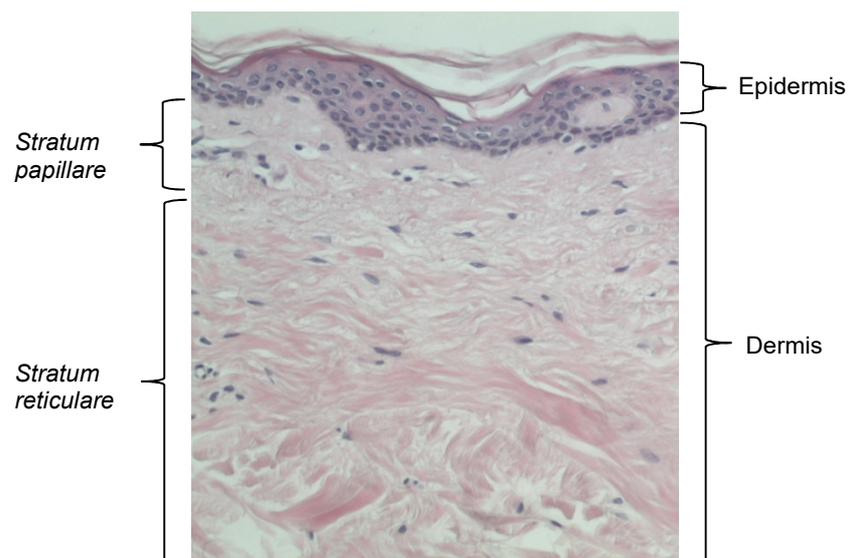


Abbildung 1.3: HE-Färbung eines Querschnittes von humaner Haut. Dargestellt ist die Kutis bestehend aus Epidermis und Dermis. Die Dermis setzt sich aus dem *Stratum papillare* und dem darunter liegenden *Stratum reticulare* zusammen. Für nähere Informationen zu den beiden Schichten der Dermis siehe Fließtext unter **1.1.2**.

1.2 Hautbarriere

Die Haut stellt eine Barriere gegenüber äußeren Einflüssen dar und verhindert darüber hinaus den unkontrollierten Verlust von Wasser und Soluten aus dem Körperinneren. Zu ihrer Funktion als Barriere tragen eine Vielzahl unterschiedlicher Komponenten bei, die sich zum Teil gegenseitig beeinflussen. Die physikalische Barriere der Haut setzt sich aus dem *Stratum corneum* und die im *Stratum granulosum* lokalisierten *Tight Junctions* zusammen. Antimikrobielle Peptide (AMPs) mit der Fähigkeit zur direkten Lyse von pathogenen Keimen bilden eine chemische Barriere in den oberen Epidermisschichten und auf der Hautoberfläche. Hierbei wird zwischen konstitutiv exprimierten und induzierbaren AMPs unterschieden. Die Hautoberfläche weist zudem ein umfangreiches Mikrobiom auf, das sich aus pathogenen und kommensalen Keimen zusammensetzt. Der ständige Konkurrenzkampf um den Platz und Nährstoffe auf der Hautoberfläche verhindert, dass sich krankheitserregende Mikroorganismen dauerhaft etablieren können. Daneben können schützende Keime durch die Freisetzung bestimmter Substanzen das Wachstum ihrer Gegenspieler hemmen oder durch den Abbau von Hauttalg den mikrobiziden Säureschutzmantel stärken (Cogen *et al.*, 2008). Die immunologische Barriere der Haut in Form von Langerhans-Zellen zur Antigenerkennung, rekrutierbaren neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen mit phagozytotischer Aktivität und induzierbarer proinflammatorischer Zytokine ist ein Schutzmechanismus der innaten Immunabwehr. Auch Mastzellen wird in diesem Zusammenhang ein entscheidender Beitrag zugeschrieben (Galli *et al.*, 1999). Aufgrund ihrer Bedeutung für die vorliegende Arbeit sollen im Folgenden sowohl das *Stratum corneum* als auch die TJ-basierte Barriere näher beschrieben werden.

1.2.1 Physikalische Barriere durch das *Stratum corneum*

Im Rahmen der epidermalen Differenzierung erfolgt die Umwandlung von lebenden in tote Keratinozyten über die Dephosphorylierung des hochmolekularen Profilaggrins und seinen proteolytischen Verdau zu Filaggrin-Monomeren, die für die irreversible Aggregation von Keratinfilamenten zu Makrofibrillen verantwortlich sind (Dale *et al.*, 1978). Letztere sind neben den Proteinen Loricrin und Involucrin sowie kleinen prolinreichen Proteinen Bestandteile der stabilen Zellhülle von Korneozyten, die als *cornified envelope* bezeichnet wird. Transglutaminasen vermitteln Quervernetzungen zwischen den einzelnen Komponenten des *cornified envelope*, um einen schwer löslichen Komplex auszubilden (Candi *et al.*, 2005). Parallel dazu wird zum Aufbau einer hydrophoben Lipidmatrix der Inhalt der *lamellar bodies* in den Interzellularraum exozytiert. Dort formieren sich multilamellare Strukturen aus Lipiddoppelschichten, die Ceramide, Cholesterol und Fettsäuren enthalten (Elias, 2012). Der

cornified envelope von Hornzellen zusammen mit den extrazellulären Fetten sind die Basis für eine effektive physikalische Barriere gegen externe Umwelteinflüsse, wie Licht, Hitze, Chemikalien, Pathogene, und ein wirksamer Schutz gegen den Verlust von Wasser und löslichen Stoffen aus dem Körperinneren. Ein fester Zusammenhalt der einzelnen Zellen untereinander wird durch das Vorhandensein von Korneodesmosomen realisiert. Eine intakte Hautbarriere bedarf insbesondere einer ausreichenden Hydratation des *Stratum corneum*. Hierfür sind natürliche Feuchtigkeitsfaktoren (*natural moisturizing factors*, NMFs) verantwortlich. Hygroskopische Aminosäuren, die aus dem Abbau von monomerem Filaggrin resultieren, sind vor allem in hautoberflächennahen Schichten als NMFs für die Homöostase der Haut von großer Wichtigkeit.

Die zentrale Bedeutung von Filaggrin für die Hautbarriere zeigt sich bei vollständigem Verlust des Proteins. *Loss-of-function*-Mutationen im Filaggrin-Gen sind ursächlich für die Hauterkrankung *Ichthyosis vulgaris*, die mit einem dysfunktionalen *Stratum corneum* assoziiert ist (Smith *et al.*, 2006). Daneben wird eine verminderte Immunintensität von Filaggrin in läsionaler und nicht-läsionaler Haut bei Erwachsenen mit atopischer Dermatitis beobachtet (Batista *et al.*, 2015; Wolf *et al.*, 2012; Pellerin *et al.*, 2013). Die pathogene Symptomatik basiert auch in diesem Fall auf einem Hautbarrieredefekt (Wolf *et al.*, 2012). Darüber hinaus besteht eine inverse Korrelation zwischen der Filaggrin-Expression und dem Schweregrad der Erkrankung (Batista *et al.*, 2015).

1.2.2 Tight Junctions

Im *Stratum granulosum* der humanen Epidermis formieren *Tight Junctions* (TJ) in gürtelartiger Anordnung um die gesamte Zelle eine weitere Ebene der physikalischen Hautbarriere (Brandner *et al.*, 2002). *Tight Junctions* sind interzelluläre Verbindungskomplexe, die die parazelluläre Permeabilität von Epithelien wie der Haut maßgeblich bedingen (Anderson und Van Itallie, 1995) (**Abbildung 1.4**). Die deshalb auch als Verschlusskontakte bezeichneten Strukturen setzen sich aus integralen und peripheren Membranproteinen zusammen (Paris *et al.*, 2008). Zu den integralen Membranproteinen gehören Occludin (Ocldn), Claudine (Cldn), Tricellulin und junktionale Adhäsionsmoleküle (JAM). Neben Transmembran-Domänen besitzen sie außerdem intrazelluläre und extrazelluläre Domänen. Über direkte Wechselwirkungen der extrazellulären Domänen von integralen Membranproteinen benachbarter Epithelzellen entsteht eine selektive Diffusionsbarriere, die den Interzellularraum vollständig durchspannt. Hierbei werden die zum funktionellen Aufbau der *Tight Junctions* notwendigen Komponenten von den beteiligten Zellen zu gleichen Anteilen bereitgestellt. Die Permeabilitätseigenschaften von TJ-Strukturen variieren je nach ihrer Proteinzusammensetzung (Günzel und Yu, 2013; Van Itallie *et*

al., 2003). In diesem Zusammenhang wird zwischen dem *pore pathway* und dem *leak pathway* unterschieden. Der *pore pathway* ist durch die Permeabilität für Ionen in Abhängigkeit von ihrer Ladung und für kleine ungeladene Moleküle charakterisiert. Über die Ladungsselektivität bestimmt hierbei die Aminosäurezusammensetzung der extrazellulären Domänen von Claudinen (Günzel und Yu, 2013). Beim ladungsunabhängigen *leak pathway* wird die Permeation zusätzlich auch von größeren Molekülen ermöglicht. Der *pore pathway* und *leak pathway* verharren nicht in einem konstant offenen oder geschlossenen Zustand, sondern stellen dynamische Strukturen dar, die durch externe Stimuli beeinflusst werden (Le Shen *et al.*, 2011). Einhergehend mit der Assemblierung von TJ-Komplexen bildet sich bei kultivierten Epithelzellen in Analogie zu einfachen Epithelien ein transepithelialer elektrischer Widerstand (TER) aus (u. a. Helfrich *et al.*, 2007; Kirschner *et al.*, 2013; Yuki *et al.*, 2007), der, wie durch 2-Wege-Impedanz gezeigt werden konnte, überwiegend ein Maß für den parazellulären Fluss von Ionen ist (Kirschner *et al.*, 2013). Untersuchungen an Primärkulturen von humanen Keratinozyten zeigten nach der Induktion von *Tight Junction*-Strukturen eine Barriere für Ionen, wie Na^+ , Cl^- und Ca^{2+} , sowie für Wasser (Kirschner *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurde eine verminderte Permeation von apikal applizierten Fluorescein (376 Da) und FITC-Dextranmolekülen mit 4 kDa und 40 kDa beobachtet, was eine effektive *Outside-in*-Barrierefunktion für *Tight Junctions* nahelegt (Kirschner *et al.*, 2013; Yuki *et al.*, 2007). Die Untersuchung der *Outside-in*-Barrierefunktion von *Tight Junctions* an intakter Epidermis ist schwierig, weil die entsprechenden *Tracer*-Moleküle bereits vom *Stratum corneum* aufgehalten werden. Furuse *et al.* (2002, Maus) und Kirschner *et al.* (2010, Mensch) wiesen aber nach, dass an *Tight Junction*-Strukturen in der Epidermis ein parazellulärer *Inside-out*-Diffusionsstopp für Biotin-SH (557) besteht. Ferner stellen *Tight Junctions* eine Barriere für höher- und hochmolekulare Substanzen dar (Furuse *et al.*, 2002; Kirschner *et al.*, 2010; Yokouchi *et al.*, 2015). Da *Tight Junctions* in beide Richtungen dieselbe Barrierefunktion ausüben (Anderson, 2001), kann somit davon ausgegangen werden, dass in der Epidermis auch eine Barrierefunktion der TJ für diese Moleküle von außen nach innen gegeben ist.

An die intrazellulären Domänen der integralen Membranproteine binden periphere TJ-Proteine, zu denen *Zonula-occludens* (ZO)-Proteine, Membran-assoziierte Guanylatkinasen mit invertierter Orientierung (MAGIs), Cingulin, ZO-1-assoziiertes Nukleinsäure-bindendes Protein (ZONAB), Rab-13 und weitere gehören (Guillemot *et al.*, 2008). ZO-Proteine, die nicht spezifisch für *Tight Junctions*, sondern auch Bestandteil weiterer Zell-Zell-Verbindungen sind, vermitteln im Komplex mit Cingulin die Assoziation der TJ-Strukturen mit dem Zytoskelett (Fanning *et al.*, 1998). Auf diese Weise wird der Zusammenhalt des Epithelzellverbandes gefördert. Weiterhin bedingen periphere TJ-Proteine die Barrierefunktion der *Tight Junctions*

und koordinieren die Transduktion eingehender Signale zur Regulation von zellulären Prozessen wie Proliferation und Differenzierung (Takano *et al.*, 2014).

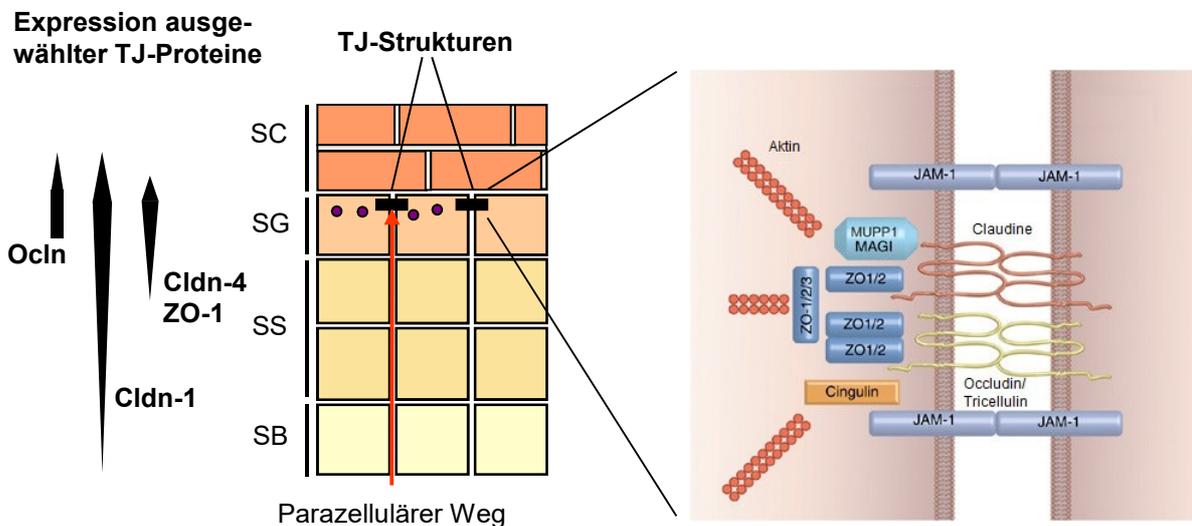


Abbildung 1.4: Lokalisation und Aufbau von *Tight Junctions* in humaner Haut. *Tight Junction*-Strukturen im *Stratum granulosum* bestehen aus integralen Membranproteinen (Claudine, Occludin/Tricellulin, JAM-1) mit extrazellulären Domänen, die den Interzellularraum verschließen, und intrazellulären Domänen, über die sie mit zytosomatischen Plaque-Proteinen (ZO-1/2/3, Cingulin, MUPP 1/MAGI) assoziiert sind. Die Expression von Ocln (Occludin), Cldn-1 (Claudin-1), Cldn-4 (Claudin-4) und ZO-1 (*Zonula-occludens*-Protein 1) in den Schichten der Epidermis humaner Haut ist durch Pfeile angedeutet. JAM-1: Junktionaler Adhäsionsmolekül 1, MAGI: *Membrane-associated guanylate kinase-like protein inverted*, MUPP1: *Multi-PDZ domain protein 1*, SB: *Stratum basale*, SS: *Stratum spinosum*, SG: *Stratum granulosum*, SC: *Stratum corneum*, ZO: *Zonula-occludens*-Protein (Abbildung modifiziert nach Brandner, 2012 und Niessen, 2007).

1.2.2.1 TJ-Proteine in humaner Haut

In diesem Abschnitt werden die TJ-Proteine, die in meiner Arbeit eine Rolle spielen, näher beschrieben.

Claudin-1

Claudin-1 (Cldn-1) mit einer Molekülmasse von ungefähr 22 kDa besitzt vier transmembranäre Domänen, zwei extrazelluläre Schleifenstrukturen und zwei zytoplasmatische Termini. Es wird in allen Schichten der humanen Epidermis gefunden (Brandner *et al.*, 2002; Haftek *et al.*, 2011; Morita *et al.*, 2004). Claudin-1 ist in der Lage, unabhängig von weiteren Komponenten, die Ausbildung von TJ-Strängen zu initiieren (Furuse *et al.*, 1998). Darüber hinaus trägt es maßgeblich zur Barrierefunktion von *Tight Junctions* bei (Furuse *et al.*, 2002; Inai *et al.*, 1999;

Kirschner *et al.*, 2013; Mrsny *et al.*, 2008). In kultivierten humanen Keratinozyten führte der *Knockdown* von Cldn-1 zu einer erhöhten Permeabilität für Ionen (Na^+ , Cl^- und Ca^{2+}) und größeren Molekülen (FITC-Dextran 4 und 40 kDa), jedoch nicht für Wasser (Kirschner *et al.*, 2013). Cldn-1-defiziente Mäuse sterben postnatal infolge eines massiven transepidermalen Wasserverlustes (Furuse *et al.*, 2002), was durch eine zusätzliche Veränderung des *Stratum corneum* bedingt ist (Sugawara *et al.*, 2013). Beim Menschen resultiert der vollständige Verlust von Cldn-1 in einem milderem Phänotyp, der als NISCH-Syndrom bezeichnet wird (Feldmeyer *et al.*, 2006; Hadj-Rabia *et al.*, 2004). Die Bedeutung des TJ-Proteins für die humane Hautbarriere äußert sich in weiteren kutanen Komplikationen, die bei veränderter Immunintensität von Cldn-1 auftreten. Abhängig von der ethnischen Kohorte wird Cldn-1 bei Patienten mit atopischer Dermatitis bereits in nicht-läsionaler Haut (De Benedetto *et al.*, 2011) oder in läsionaler Haut (Batista *et al.*, 2015; Gruber *et al.*, 2015) vermindert gefunden. Psoriatische Haut weist ebenfalls eine Herabregulation von Cldn-1 auf (Kirschner *et al.*, 2009). Darüber hinaus zeigten sich beim Plattenepithelkarzinom in nicht-verhornten Tumorzellen Unregelmäßigkeiten in der Immunintensität von Cldn-1 (Morita *et al.*, 2004).

Claudin-4

Claudin-4 (Cldn-4) ist bezüglich des Molekulargewichtes und der Domänenstruktur identisch zu Cldn-1 und entspricht damit dem charakteristischen Aufbau der Claudin-Proteinfamilie. Im Gegensatz zu Cldn-1 findet sich Cldn-4 vorrangig im *Stratum granulosum*, kann aber auch im oberen *Stratum spinosum* vorhanden sein (Morita *et al.*, 2004). Sonoda *et al.* (1999) haben erstmals unter Verwendung von MDCK-Zellen gezeigt, dass Cldn-4 zur TJ-basierten Permeabilitätsbarriere für Ionen und FD-4 beiträgt. Gleiches gilt für Cldn-4 in primären humanen Keratinozyten (Kirschner *et al.*, 2013; Yuki *et al.*, 2007). Hinsichtlich der Ionenbarriere wird bei *Knockdown* von Cldn-4 eine erhöhte Permeabilität für Na^+ , Cl^- und Ca^{2+} beobachtet (Kirschner *et al.*, 2013). Eine veränderte Immunintensität von Cldn-4 hat Auswirkungen auf die Homöostase der Haut. So wird Cldn-4 in nicht-läsionaler Haut bei Patienten mit atopischer Dermatitis hochreguliert (Gruber *et al.*, 2015). Darüber hinaus zeigte sich bei AD-Patienten eine aberrante Verteilung von Cldn-4 an den Zellgrenzen epidermaler Keratinozyten (Kubo *et al.*, 2014). In psoriatischer Haut wird es in mehr Epidermis-Schichten gefunden als in gesunder Haut (Kirschner *et al.*, 2009).

Während Claudin-Moleküle vor allem die Permeabilität über den *pore pathway* bedingen und damit die Hauptdeterminanten der TJ-Barriere darstellen, wird für Occludin und ZO-1 angenommen, dass sie an der Regulation des *leak pathway* beteiligt sind (Le Shen *et al.*, 2011).

Occludin

Occludin (Ocln) mit einem Molekulargewicht von 65 kDa weist keine Sequenzhomologie zu Claudin-Molekülen auf (Furuse *et al.*, 1998), besitzt aber eine vergleichbare Domänenstruktur bestehend aus vier Transmembraneinheiten, zwei extrazellulären Schleifen sowie den intrazellulär gelegenen C- und N-Termini. Ocln wird in humaner Haut vor allem im *Stratum granulosum* gefunden (Brandner *et al.*, 2002; Pummi *et al.*, 2001). Für die Ausbildung von TJ-Strukturen ist Ocln initial nicht erforderlich (Saitou *et al.*, 2000). Obwohl Ocln nach Phosphorylierung in TJ-Strukturen eingebaut wird (Wong, 1997), ist sein Beitrag zur Barrierefunktion von TJ umstritten. Auf der einen Seite führt die Überexpression von Ocln in MDCK-Zellen zu einem erhöhten TER (McCarthy *et al.*, 1996; Van Itallie *et al.*, 2010), aber auch zu einem gesteigerten Durchfluss von Mannitol (Balda *et al.*, 1996). Die erhöhte Permeabilität für ungeladene Moleküle (3-7 Ångström) konnten Van Itallie *et al.* (2010) nicht bestätigen. Obwohl der *Knockdown* von Ocln in MDCK-Zellen ohne Veränderung des *Steady-State*-TER einhergeht, zeigt sich ein Anstieg der Permeabilität für mono- und divalente anorganische und organische Kationen bis zu einem Durchmesser von 6,96 Ångström, während die Durchlässigkeit für Chlorid-Ionen und Mannitol nicht oder nur wenig beeinflusst ist (Yu *et al.*, 2005). Für größere organische Ionen wird ebenfalls ein erhöhter Durchfluss beobachtet (Yu *et al.*, 2005). In humanen Keratinozyten ist der *Ocln-Knockdown* mit einem verminderten TER assoziiert (Kirschner *et al.*, 2013). Spezifische Permeabilitätsanalysen zeigen, dass die TJ-Barriere für Na⁺-, Cl⁻- und Ca²⁺-Ionen sowie für ein FITC-assoziiertes Dextran-Molekül von 4 kDa signifikant vermindert ist (Kirschner *et al.*, 2013).

Auf der anderen Seite ist in *Ocln*-defizienten Mäusen weder die Morphologie von TJ-Strukturen noch ihre Barrierefunktion in Epithelien des Magen-Darm-Traktes beeinträchtigt (Saitou *et al.*, 2000; Schulzke *et al.*, 2005). Dennoch zeigen sich histologische und funktionale Abnormalitäten von verschiedenen Geweben (Saitou *et al.*, 2000; Schulzke *et al.*, 2005). Die Haut von Patienten mit Psoriasis weist *Ocln*, analog zu Claudin-4, in mehr epidermalen Schichten als in gesunder Haut auf (Kirschner *et al.*, 2013). Beim Plattenepithelkarzinom wird häufig ein vollständiger Verlust von *Ocln* in epidermalen Keratinozyten gefunden (Morita *et al.*, 2004; Rachow *et al.*, 2013). Der *Knockdown* von *Ocln* in humanen Keratinozyten resultiert neben dem oben beschriebenen Barrieredefekt ferner in einer reduzierten epithelialen Zell-Zell-Adhäsion und Anfälligkeit gegenüber der Induktion von apoptotischen Prozessen, zellulären Eigenschaften, die zur Tumorgenese beitragen (Rachow *et al.*, 2013). Darüber hinaus wird *Ocln* eine Rolle bei der Differenzierung von Keratinozyten zugeschrieben (Rachow *et al.*, 2013).

Zonula-occludens-Protein 1

Im Unterschied zu den Claudin-Molekülen und Occludin, die Transmembran-Proteine darstellen, ist *Zonula-occludens-Protein 1* (ZO-1) im Zytoplasma lokalisiert und zählt damit zu den peripheren TJ-Proteinen. Immunhistochemische Färbungen von humaner Epidermis sind im *Stratum granulosum* und im oberen *Stratum spinosum* positiv für ZO-1 (Brandner *et al.* 2002; Pummi *et al.*, 2001). Bei einem Molekulargewicht von 220 kDa setzt es sich aus drei PDZ-Domänen, einer SH3-Domäne, einer GUK-Domäne und einer prolinreichen Region am C-Terminus zusammen. Diese Domänen sind jeweils durch U (*Unique*)-Regionen voneinander getrennt. Es konnte gezeigt werden, dass ZO-1 für die korrekte Organisation von Claudin-Molekülen zu TJ-Strängen benötigt wird (Umeda *et al.*, 2006) und mit den meisten transmembranären TJ-Proteinen, wie Occludin (Müller *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2004), JAMs (Ebnet *et al.*, 2000) und Tricellulin (Riazuddin *et al.*, 2006), wechselwirkt. Als Gerüstprotein, zur Familie der MAGUK-Proteine gehörend, assoziiert ZO-1 nicht nur mit transmembranären TJ-Proteinen, sondern weist auch Bindungsmotive für das Zytoskelett (Van Itallie *et al.*, 2009) und andere periphere Plaque-Proteine auf. Über letztere wird entweder eine Verbindung zu Aktin- und Myosinfilamenten hergestellt oder die Signaltransduktion der Zelle beeinflusst (Bauer *et al.*, 2009). Außerdem interagiert ZO-1 mit Proteinen, die in die Regulation des Zellzyklus und die Genexpression involviert sind (Bauer *et al.*, 2009). Eine ZO-1-Gendeletion führt bei Mäusen zu embryonaler Letalität (Katsuno *et al.*, 2008), während in epithelialen Zellmodellen nur die Ausbildung der Barriere verzögert ist (McNeil *et al.*, 2006; Umeda *et al.*, 2004). In kultivierten Keratinozyten führt der *Knockdown* von ZO-1 zu einer verminderten Barriere für Ionen und FITC-Dextran-Moleküle von 4 und 40 kDa (Kirschner *et al.*, 2013). Eine breitere Verteilung von ZO-1 in humaner Epidermis wird bei Patienten mit *Psoriasis* und beim Plattenepithelkarzinom beobachtet (Kirschner *et al.*, 2009; Rachow *et al.*, 2013). Die Hauterkrankung *Ichthyosis vulgaris* ist dagegen mit einer verminderten Immunintensität von ZO-1 assoziiert (Gruber *et al.*, 2011).

1.3 Kutane Wundheilung

Verletzungen der Haut führen zu einem Verlust der Hautbarriere und erhöhen die Gefahr des Eindringens von Pathogenen und des Verlustes von Wasser und Soluten, was die Homöostase des Körpers beeinträchtigt. Deshalb ist das Ziel der Wundheilung, die Integrität des verletzten Gewebes so schnell wie möglich wiederherzustellen.

1.3.1 Ablauf der kutanen Wundheilung

Der Wundheilungsprozess setzt sich aus drei teilweise überlappenden Phasen zusammen (**Abbildung 1.5**).

1.3.1.1 Hämostase und inflammatorische Phase

Unmittelbar nach einer Hautverletzung wird im Rahmen der Hämostase die Blutung zum Stillstand gebracht. Parallel zur Hämostase wird bereits die frühe inflammatorische Phase initiiert. Hierbei kommt es zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den Wundbereich (Werner und Grose, 2003). Ursächlich für ihre Rekrutierung sind die Aktivierung des Komplementsystems, die Degranulation von Neutrophilen sowie Nebenprodukte des bakteriellen Abbaus (Reinke und Sorg, 2012). Die Stimulation ihrer Effektorfunktionen befähigt neutrophile Granulozyten zur Phagozytose sowie zur Sekretion von hochaktiven antimikrobiellen Peptiden und proteolytischen Enzymen, um Bakterien zu töten und nekrotisches Gewebe zu verdauen (Hendrixson *et al.*, 2003). Darüber hinaus sezernieren neutrophile Granulozyten proinflammatorische Mediatoren wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Cassatella, 1995) und fördern durch die Freisetzung von VEGF und IL-8 die Angiogenese (Ancelin *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Schrufer *et al.*, 2005). Neutrophile leisten einen wesentlichen Beitrag zur Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen an die Entzündungsstelle, indem sie chemotaktische Faktoren generieren (Bennouna *et al.*, 2003; Chertov *et al.*, 1997). Schließlich sind neutrophile Granulozyten in der Lage, neben Monozyten und Makrophagen ebenfalls Natürliche Killerzellen und unreife dendritische Zellen zu aktivieren (Baggiolini *et al.*, 1994; Oppenheim *et al.*, 1991).

Drei Tage nach Verwundung treten Makrophagen in den Wundbereich ein und markieren damit den Beginn der späten inflammatorischen Phase. Als Fresszellen unterstützen sie die neutrophilen Granulozyten bei der Phagozytose von Pathogenen und Zelldebris (Koh und DiPietro, 2011). Zudem orchestrieren Makrophagen durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Zytokinen die komplexen Prozesse von zellulärer Proliferation und beginnender Geweberegeneration innerhalb der Wunde (DiPietro und Polverini, 1993) (**Abbildung 1.5 A**).

1.3.1.2 Regenerationsphase

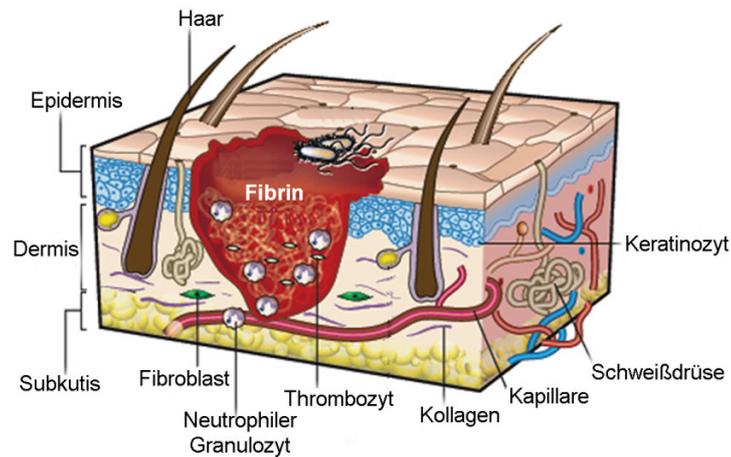
Die Regenerationsphase der Wundheilung (**Abbildung 1.5 B**) erstreckt sich über einen Zeitraum von 2 bis 10 Tagen nach Verletzung und besteht darin, die entstandene Lücke mit neuem Gewebe aufzufüllen. Ausgehend von den Wundrändern erfolgt durch Migration von

lokalen Keratinozyten die Reepithelialisierung des geschädigten Bereichs. Die Aktivierung dieses Prozesses erfordert die Freisetzung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren wie EGF, KGF, IGF-1 und NGF von epithelialen und nicht-epithelialen Zellen an den Wundrändern (Werner und Grose, 2003). Die Keratinozyten hinter der Migrationsfront proliferieren und differenzieren, um die Barrierefunktion des Gewebes wiederherzustellen. Zeitgleich mit der Reepithelialisierung bildet sich das Granulationsgewebe. Hierbei wird die provisorische Fibrin/Fibronektin-Wundmatrix durch ein Übergangsgewebe ersetzt (Midwood *et al.*, 2004). Aktivierte Fibroblasten migrieren in das Wundgebiet, wo sie unter der Kontrolle von regulierenden Zytokinen (IFN- γ und TGF- β), die durch Makrophagen sekretiert werden, proliferieren und große Mengen von Kollagen *III*, Fibronektin und weiteren Komponenten der extrazellulären Matrix synthetisieren (Bainbridge, 2013). Weiterhin müssen Blutgefäße für den geschädigten Bereich temporär wiederhergestellt werden, um die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sicherzustellen. Neben locker organisierten Kollagenbündeln zeichnet sich das Granulationsgewebe somit durch eine hohe Dichte von Fibroblasten, Granulozyten, Makrophagen und Blutkapillaren aus (Gurtner *et al.*, 2008). Damit sich ein Gleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau von Bindegewebe einstellen kann, nimmt bei sukzessiver Abnahme der Fibroblasten-Proliferation ihre Kollagensynthese zu (Madden und Peacock, 1971). Am Ende dieser Wundheilungsphase ist die Integrität des Gewebeareals hinsichtlich der Barrierefunktion weitgehend wiederhergestellt.

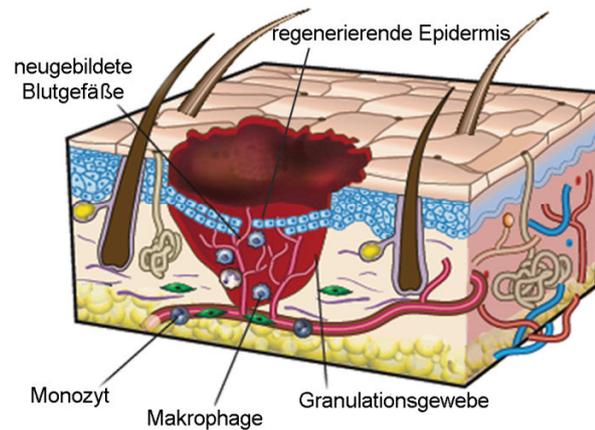
1.3.1.3 Remodellierungsphase

Der Umbau von Granulationsgewebe in Narbengewebe stellt die letzte Phase der Wundheilung dar und erfolgt innerhalb eines Jahres nach Verletzung. Um die Bildung von Granulationsgewebe zu beenden, unterziehen sich die Endothelzellen, Makrophagen und Myofibroblasten der Apoptose oder verlassen die Wundregion (Greenhalgh, 1998). Weiterhin nehmen angiogene Prozesse ab und die metabolische Aktivität der Wunde wird vermindert (Reinke und Sorg, 2012). Im späteren Verlauf der Umbauphase wird Kollagen *III* durch das stabilere Kollagen *I* ersetzt. Hierfür werden Matrixmetalloproteasen benötigt, die in der Wundregion von verbliebenen Zellen freigesetzt werden (Armstrong und Jude, 2002; Gurtner und Evans, 2000). Myofibroblasten verursachen durch ihre zahlreichen Anheftungsstellen am Kollagen Wundkontraktionen und helfen somit dabei, die Oberfläche der sich entwickelnden Narbe zu vermindern (Tziotzios *et al.* 2012). Hautanhangsgebilde, wie Haarfollikel und Schweißdrüsen, werden nach Verletzung nicht zurückgebildet. Darüber hinaus unterscheidet sich die Epidermis der resultierenden Narbe von unverwundeter Haut durch das Fehlen von Reteleisten (Robson *et al.*, 2001) (**Abbildung 1.5 C**).

Hämostase und Inflammationsphase
(0 - 48 Stunden)



Regenerationsphase
(2 - 10 Tage)



Remodellierungsphase
(2 Wochen - 12 Monate)

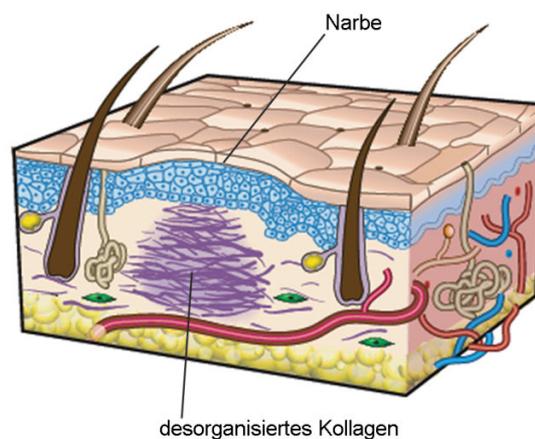


Abbildung 1.5: Ablauf der kutanen Wundheilung. Übersicht der drei teilweise überlappend ablaufenden Phasen der Wundheilung (Abbildung modifiziert nach Gurtner *et al.*, 2008).

1.3.2 Bedeutung von Connexinen in der Wundheilung

Connexine (Cx) sind Transmembranproteine, die *Gap Junctions* (GJ) aufbauen. GJ verbinden die Zytoplasmen benachbarter Zellen eines Gewebes und vermitteln den Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von ungefähr 1000 Dalton. So können beispielsweise *Second-Messenger*-Moleküle durch GJ von einer Zelle zur nächsten gelangen (Meşe *et al.*, 2007), was für die direkte Zell-Zell-Kommunikation äußerst wichtig ist. Ein GJ-Kanal zur Überbrückung des Interzellularraums setzt sich aus zwei Halbkanälen (Connexonen) zusammen, die wiederum durch hexagonale Anordnung von jeweils sechs Connexinen in den Plasmamembranen der beteiligten Zellen ausgebildet werden (**Abbildung 1.6**). In Abhängigkeit von der Anzahl verschiedener Connexine können sowohl Connexone als auch GJ-Kanäle homomer oder heteromer sein. Die Cx-Zusammensetzung von GJ-Kanälen bedingt ihre Selektivität bezüglich der hindurchtretenden Moleküle (Brisette *et al.*, 1994; Elfgang *et al.*, 1995; Falk *et al.*, 1997; Veenstra, 1996).

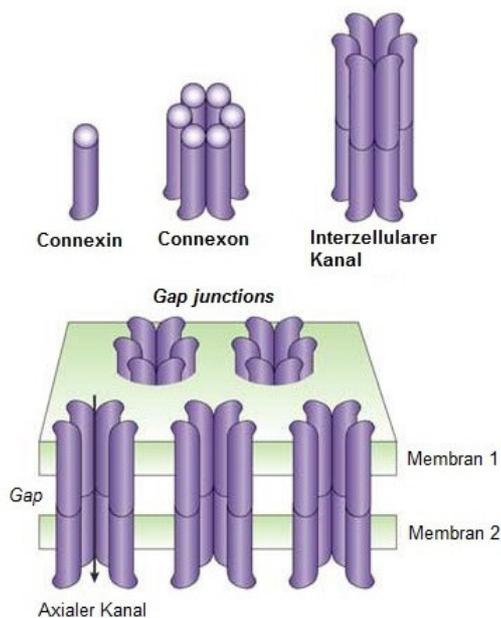


Abbildung 1.6: Zusammensetzung von Gap Junctions und ihrer Untereinheiten.

Schematische Darstellung eines Connexin-Monomers, der Zusammenlagerung von sechs Connexinen zu einem Connexon und eines interzellulären Kanals, der sich aus zwei Connexonen zusammensetzt.

Ansammlungen von interzellulären Kanälen werden als *Gap Junctions* bezeichnet. Jeder interzelluläre Kanal stellt eine Verbindung zwischen den Zytoplasmen benachbarter Zellen her (Abbildung modifiziert nach Goodenough und Paul, 2003).

Die Zellkommunikation via GJ spielt für die Keratinozyten-basierte Reepithelialisierung von kutanen Wunden eine wichtige Rolle (Brandner *et al.*, 2004; Brisette *et al.*, 1994; Lucke *et al.*, 1999; Pitts *et al.*, 1986; Risek *et al.*, 1994 und 1998; Salomon *et al.*, 1993). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die epidermale Immunintensität von Connexinen im Rahmen der Wundheilung dynamischen Veränderungen unterliegt (Brandner *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 2003; Goliger und Paul, 1995; Kretz *et al.*, 2003; Saitoh *et al.*, 1997). In unverwundeter humaner Epidermis ist Cx26 nur sehr schwach und sporadisch im *Stratum granulosum* vorhanden, während Cx43 in allen epidermalen Schichten mit der höchsten

Intensität im oberen *Stratum granulosum* beobachtet wird (Brandner *et al.*, 2004). Die Haut von diabetischen Ratten weist gegenüber gesunder Kontrollhaut eine verminderte Immunintensität für Cx26 und Cx43 auf (Wang *et al.*, 2007), wobei beachtet werden muss, dass in gesunder Nagerhaut im Gegensatz zu humaner Haut Cx26 deutlich exprimiert wird (Goliger und Paul, 1995).

Zu Beginn der spontanen Wundheilung humaner Haut wird Cx26 in der Nähe des Wundrandes gefunden, während Keratinozyten am Wundrand bis zur epidermalen Regeneration negativ für Cx26 bleiben (Brandner *et al.*, 2004). Cx43 wird hingegen bereits früh nach Verwundung vollständig herunterreguliert (Brandner *et al.*, 2004). In schlecht heilenden diabetischen Ulzera ist Cx26 am Wundrand und im angrenzenden Hautareal vorhanden (Brandner *et al.*, 2004). Darüber hinaus kommt es nicht zur Herunterregulation von Cx43 in Keratinozyten am Wundrand (Brandner *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). Auf mRNA-Ebene weisen humane Hautbiopsien und kultivierte Keratinozyten diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs für Cx26 und Cx43 keine Unterschiede auf (Brandner *et al.*, 2008). Gleiches gilt für Cx26 in Keratinozyten, die in *Ex-vivo*-Wunden transplantiert wurden. Bezüglich der Genexpression von Cx43 zeigen transplantierte Keratinozyten verschiedenen Ursprungs dagegen unterschiedliche Dynamiken im Transplantationsverlauf (Brandner *et al.*, 2008). Durch den Einsatz von Cx43-mimetischen Peptiden zur Inhibition der interzellulären Kommunikation wird die Migrationsgeschwindigkeit und das Proliferationsvermögen von Keratinozyten und Fibroblasten diabetischen Ursprungs sowie von Fibroblasten unter hyperglykämischen Bedingungen erhöht (Pollok *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2009 und 2012).

1.3.3 Bedeutung von Triterpenen in der Wundheilung

Triterpene sind eine Gruppe biologisch aktiver Verbindungen, die in den meisten Pflanzen gefunden werden. Sie setzen sich aus sechs Isopreneinheiten zusammen und kommen in der Natur vorwiegend tetra- oder pentazyklisch vor. Triterpene zeichnen sich durch ein breites Wirkungsspektrum aus. So konnte nachgewiesen werden, dass sie die Wundheilung akuter Wunden fördern (Harish *et al.*, 2008; Perez-Gutierrez und Vargas-Solis, 2008, Ebeling *et al.*, 2014). Zudem werden ihnen antioxidative (Laszczyk, 2009; Sudhakar *et al.*, 2006), antiinflammatorische (Alakurtti *et al.*, 2006; de la Puerta *et al.*, 2000; Geetha *et al.*, 2001; Manez *et al.*, 1997; Safayhi und Sailer, 1997) und antimikrobielle Effekte (Aiken und Chen, 2005; Pavlova *et al.*, 2003; Woldemichael *et al.*, 2003) zugeschrieben.

1.3.3.1 Triterpenextrakt aus den Korkschichten der äußeren Rinde von Birken

Die Korkschichten der äußeren Rinde von weißen Birken (*Betulae cortex*) enthalten einen hohen Anteil pentazyklischer Triterpene vom Oleanan- und vom Lupan-Typ (Ekman, 1983). Der aus dem Korkmaterial extrahierte Triterpenextrakt (TE) besteht überwiegend aus Betulin. Zu den weniger angereicherten Triterpenen zählen Lupeol, Betulinsäure, Erythrodiol und Oleanolsäure (Laszczyk *et al.*, 2006). Im Rahmen pharmakokinetischer Studien an Ratten und Hunden zeigte sich nach Verabreichung des TE eine gute Bioverfügbarkeit seiner Hauptkomponente Betulin ohne Anzeichen von Toxizität (Jäger *et al.*, 2009). *In-vitro*-Untersuchungen zeigten, dass TE die Migration von primären humanen Keratinozyten zu bestimmten Zeitpunkten erhöht (Ebeling *et al.*, 2014). Weiterhin wurden positive Effekte auf die porcine *Ex-vivo*-Wundheilung und die Regeneration der Hautbarriere nachgewiesen (Ebeling *et al.*, 2014). Die Homogenisierung des TE aus der Birkenrinde in Sonnenblumenöl führt spontan zur Ausbildung eines stabilen Oleogels (Laszczyk *et al.*, 2006), das die Wundheilung von porciner Haut ebenfalls förderte (Ebeling *et al.*, 2014). Daneben wurde die TE-angereicherte Formulierung (10 % TE in Sonnenblumenöl) unter der Bezeichnung Oleogel-S10 in klinischen Studien getestet. Es zeigte im Vergleich zu einer *State-of-the-art*-Behandlung (Mepilex®) positive Ergebnisse bei der Behandlung oberflächlicher Wunden hinsichtlich der Reepithelialisierungsgeschwindigkeit sowie des ästhetischen Ergebnisses (Metelmann *et al.*, 2012 und 2015) (**Abbildung 1.7**). Darüber hinaus wirkte sich die Anwendung des Oleogels wundheilungsfördernd auf Läsionen von Patienten mit aktinischer Keratose aus (Huyke *et al.*, 2005). Die topische Anwendung von TE als Bestandteil einer Emulsion aus Wasser in Jojoba-Öl stellt eine effektive Behandlungsoption mit guter Verträglichkeit von Patienten mit chronischem Pruritus dar (Laszczyk *et al.*, 2009).

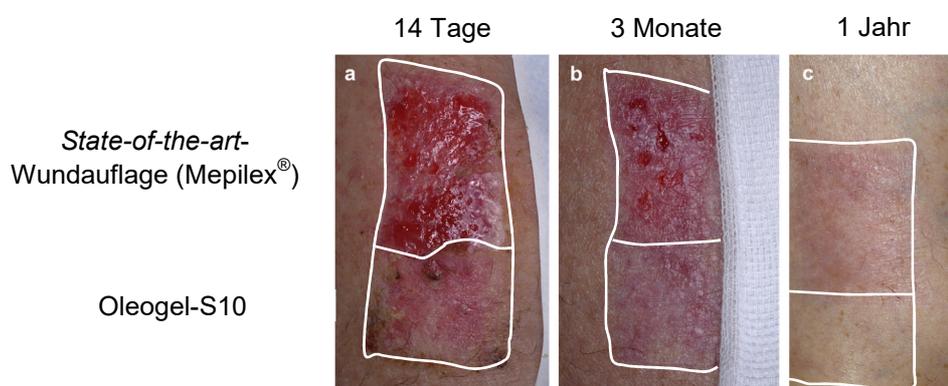


Abbildung 1.7: Wirkung von TE auf die normale Wundheilung. Exemplarische Darstellung des Heilungsverlaufs von Spalthautwunden, die im oberen Abschnitt mit Mepilex® und im unteren Abschnitt mit dem TE-enthaltenden Oleogel (Oleogel S-10) behandelt wurden, (a) 14 Tage, (b) 3 Monate und (c) 1 Jahr nach Verwundung (Abbildung modifiziert nach Metelmann *et al.*, 2012).

1.4 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus bezeichnet eine metabolische Erkrankung, bei der entweder ein Defekt der Insulinsekretion vorliegt oder die Zellen des Körpers nicht adäquat auf das ausgeschüttete Hormon ansprechen. Darüber hinaus kann eine Kombination beider Defekte auftreten (Kerner und Brückel, 2015). Der verminderte Abstrom von Glukose in die Gewebe führt zu Störungen des Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsels (Fraser, 1972). Die resultierende Hyperglykämie wird als Parameter zur Diagnose der Krankheit herangezogen. Bei metabolisch gesunden Menschen beträgt die Nüchternblutglukosekonzentration $< 5,6$ mmol/l (Landgraf *et al.*, 2015). Gemäß der Deutschen *Diabetes* Gesellschaft ist *Diabetes mellitus* durch eine Nüchternplasmaglukose $\geq 7,0$ mmol/l charakterisiert (Kerner und Brückel, 2015). Blutglukosekonzentrationen $\geq 11,1$ mmol/l zwei Stunden nach der Einnahme einer kohlenhydratreichen Mahlzeit gelten ebenfalls als Kriterium für die Erkrankung (Kerner und Brückel, 2015). Ein Parameter zum Nachweis einer länger andauernden Hyperglykämie stellt der prozentuale Anteil von glykiertem Hämoglobin A1 (HbA1c) am Gesamthämoglobin dar ($\geq 6,5$ %) (Kerner und Brückel, 2015). *Diabetes mellitus* wird mit derzeit 346 Millionen Erkrankten weltweit als eines der wesentlichen Gesundheitsprobleme des 21. Jahrhunderts sowohl in Industrienationen als auch in Entwicklungsländern betrachtet. Hinzu kommt, dass die Zahl der Betroffenen, vor allem des Typ-2-*Diabetes*, weiterhin stetig ansteigt (Whiting *et al.*, 2011).

1.4.1 Physiologische Steuerung der Glukose-Aufnahme und -Verwertung

Nach Einnahme einer kohlenhydratreichen Mahlzeit wird als Reaktion auf die erhöhte Glukosekonzentration im Blut Insulin aus den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse freigesetzt. Per Definition durch die Deutsche *Diabetes* Gesellschaft sollte die Blutglukosekonzentration zwei Stunden nach Verzehr der Mahlzeit $< 7,8$ mmol/l betragen (Landgraf *et al.*, 2015). Das Hormon sorgt dafür, dass der Glukosespiegel sukzessive auf seinen präprandialen Wert zurückgeführt wird. Insulin erzielt seine Wirkung über die Bindung an den nahezu ubiquitär exprimierten Insulinrezeptor und an den IGF-*I*-Rezeptor, bei denen es sich um integrale Membranproteine mit Tyrosinkinaseaktivität handelt. Die veränderte Signaltransduktion der Zielzelle bewirkt in der Herz- und Skelettmuskulatur sowie im Fettgewebe die Rekrutierung des insulinabhängigen Glukosetransporters GLUT-4 aus intrazellulären Vesikeln. Infolge seines umfangreichen Einbaus in die Plasmamembran wird die vermehrte Aufnahme von Glukose in diese Gewebe begünstigt. In der Muskulatur wird das Gros der so aufgenommenen Glukose dem Speichermolekül Glykogen zugeführt, lediglich ein kleinerer Teil wird durch glykolytischen und

oxidativen Abbau unmittelbar als Energieträger verwertet. In Fettzellen erfolgt die Metabolisierung von Glukose zu Acetyl-CoA, das anschließend zur Synthese von Triacylglycerinen verwendet wird. Sobald sich die Blutglukosekonzentration wieder seinem Basalwert annähert, nimmt die Freisetzung von Insulin zunehmend ab, während Glucagon, sein hormoneller Gegenspieler, vermehrt ins Blut abgegeben wird. Damit einhergehend werden die GLUT4-Moleküle durch Endozytose wieder internalisiert und in Membranvesikeln gespeichert, um bei einer weiteren Insulinausschüttung erneut zur Verfügung zu stehen. In der Leber wird Glukose nach Insulinausschüttung verstärkt über den GLUT2-Uniporter aufgenommen und in Glykogen eingebaut. Gleichzeitig wird die Mobilisierung von Glukose aus dem Speichermolekül gehemmt (Klinke *et al.*, 2009). Neben seiner Rolle als metabolischer Regulator vermittelt Insulin ebenfalls mitogene Effekte über den Insulin-Rezeptor und den IGF-*I*-Rezeptor (Ballotti *et al.*, 1989; Saltiel und Kahn, 2001) (**Abbildung 1.8**).

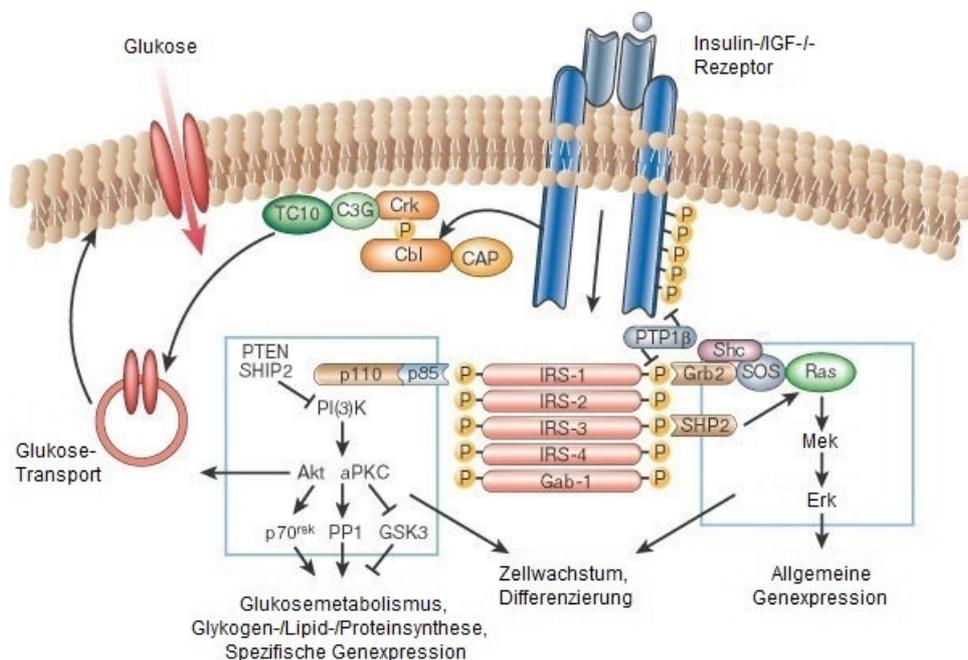


Abbildung 1.8: Insulin-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion. Der Insulin- und der IGF-*I*-Rezeptor sind Tyrosinkinasen, die sich nach Bindung von Insulin einer Autophosphorylierung unterziehen. Anschließend katalysieren sie die Übertragung von Phosphatresten auf Proteine der IRS-Familie sowie auf Shc und Cbl. Diese vermitteln in Wechselwirkung mit weiteren Signalmolekülen die Induktion diverser Transduktionswege. Im Rahmen dieser kommt es zur Aktivierung, d. h. Phosphorylierung, von stromabwärts gelegenen Komponenten wie Akt und der MAP-Kinase Erk, was zu metabolischen und mitogenen Antworten der Zelle führt. Für Abkürzungen siehe Anhang D Abkürzungsverzeichnis (Abbildung modifiziert nach Saltiel und Kahn, 2001).

1.4.2 Klassifikation des *Diabetes mellitus*

Die ätiologische Klassifikation des *Diabetes mellitus* in Typ 1 und Typ 2 basiert auf der Art des Insulindefekts. Es bestehen weitere spezifische Formen des *Diabetes mellitus*, die im Vergleich zu den beiden Haupttypen selten sind und hier daher nicht weiter betrachtet werden sollen (Kerner und Brückel, 2015).

1.4.2.1 Typ-1-*Diabetes*

Typ-1-*Diabetes* ist mit einer geringen oder nicht vorhandenen endogenen Insulinsekretionskapazität der Patienten assoziiert (Insulindefizienz) (Böhm *et al.*, 2015). Daher benötigen Typ-1-Diabetiker zum Überleben eine Insulin-Substitutionstherapie. Ursächlich für die Ausprägung eines Typ-1-*Diabetes* ist die Zerstörung der pankreatischen β -Zellen, die für die Produktion des Hormons verantwortlich sind. Bei 90 % der Patienten wird diese auf einen Autoimmunprozess zurückgeführt, für den eine genetische Prädisposition besteht (Bastaki, 2005). Für die übrigen 10 % der Fälle gibt es keine ätiologische Grundlage (Bastaki, 2005). Der akute bis subakute Beginn des Typ-1-*Diabetes* betrifft vor allem Kinder und Jugendliche (Böhm *et al.*, 2015). Erwachsene entwickeln diese Form der Zuckerkrankheit selten. Typ-1-Diabetiker machen ungefähr 10 bis 15 % aller Erkrankten aus und besitzen im Vergleich zu Typ-2-Diabetikern ein normales oder sogar vermindertes Körpergewicht (Böhm *et al.*, 2015)

1.4.2.2 Typ-2-*Diabetes*

Typ-2-*Diabetes* ist mit 85 bis 90 % die häufigste Form des *Diabetes mellitus* und betrifft 7 % der Bevölkerung in den westlichen Ländern (Bastaki, 2005). Zudem wird eine hohe Dunkelziffer angenommen sowie eine enorm steigende Prävalenz vorausgesagt (Whiting *et al.*, 2011). Die Diagnose von *Diabetes* Typ 2 erfolgt im Gegensatz zu Typ-1-*Diabetes* normalerweise erst bei Erwachsenen ab dem 40., vor allem aber nach dem 60. Lebensjahr, wenn sich die Spätfolgen einer chronischen Hyperglykämie, die über viele Jahre unerkannt blieb, bereits manifestiert haben. Deshalb wird diese Form der Krankheit auch als Alters*diabetes* bezeichnet (Kirkman *et al.*, 2012). Demgegenüber stehen jedoch Patienten immer jüngeren Alters, so dass der Typ-2-*Diabetes* ein steigendes Problem auch unter Jugendlichen und sogar Kindern wird (Hillier und Pedula, 2003; Kaufman, 2002).

Diabetes mellitus Typ 2 resultiert aus einem pathophysiologischen Zustand, der als Insulinresistenz bezeichnet wird. Ihre Ursachen reichen von fettreicher Ernährung (Riccardi *et al.*, 2004) über viszerale Adipositas (Ye, 2013 als Übersichtsartikel) bis hin zu Bewegungsmangel (Admiraal *et al.*, 2011). Da sich die Insulinresistenz meist auf zellulärer

Ebene durch Beeinträchtigungen der Insulin-vermittelten Signaltransduktion manifestiert (Wilcox, 2005), können auch Defekte in Genen, die für Proteine der intrazellulären Signalkaskade (**siehe Abbildung 1.8**) kodieren, zu ihrer Entstehung beitragen (Lebovitz, 2001). So wird bei Patienten mit Typ 2-*Diabetes* die metabolische Signalkaskade über die PI3-Kinase nach Insulin-Stimulation nicht aktiviert, wie durch ausbleibende Phosphorylierung des Insulinrezeptors und von IRS-1 belegt wird (Cusi *et al.*, 2000). Darüber hinaus kommt es nicht zur Assoziation von IRS mit stromabwärts gelegenen Signalkomponenten wie p85 und der PI3-Kinase (Cusi *et al.*, 2000). Erhöhte *Level* von freien Fettsäuren führen zur Phosphorylierung von IRS-Proteinen und der PI3-Kinase an Serin- und Threoninresten. Auf diese Weise wird ihre Tyrosinphosphorylierung verhindert, die zur Weiterleitung des insulinvermittelten Signals notwendig ist (Dresner *et al.*, 1999). Die Aufhebung der Signaltransduktion kann ferner über die Wirkungsweise von Tyrosinphosphatasen und SOCS-Proteinen erfolgen (Paz *et al.*, 1997; Zick *et al.*, 2001). Um eine physiologische Blutglukosekonzentration trotz verminderter Insulinwirkung aufrechtzuerhalten, kommt es zur erhöhten Produktion und Freisetzung des Hormons. Diese kompensatorische Hyperinsulinämie kann ihrerseits wiederum die Insulinresistenz fördern (Shanik *et al.*, 2008). Bei chronisch erhöhter Insulinkonzentration wird der Insulinrezeptor auf der Zelloberfläche herunterreguliert (Gavin *et al.*, 1974). Darüber hinaus sinkt die Affinität des Hormons für die Bindung an den Insulinrezeptor (De Meyts *et al.*, 1973; Seino *et al.*, 1989). Schließlich ist Hyperinsulinämie mit einer verminderten Tyrosinkinase-Aktivität der Zielrezeptoren von Insulin assoziiert (Kanety *et al.*, 1994). Wenn der sukzessiv zunehmende Bedarf an Insulin nicht mehr durch die Bauchspeicheldrüse bereitgestellt werden kann, liegt ein relativer Insulinmangel vor. Dieser Zustand resultiert schließlich in einer erhöhten Blutglukosekonzentration. Darüber hinaus wird durch Hyperinsulinämie und Hyperglykämie die Ausbildung von Insulin-/IGF-1-Hybridrezeptoren gesteigert, die eine geringere Affinität für Insulin aufweisen als der klassische Insulinrezeptor (Federici *et al.*, 1998 und 1999). Dies könnte ebenfalls zur verminderten metabolischen Antwort bei Typ-2-*Diabetes* beitragen (Sesti *et al.*, 2001).

1.4.3 Auswirkungen des *Diabetes mellitus* auf die Haut

Kutane Komplikationen treten bei fast 80 % aller Diabetiker auf (Demirseren *et al.*, 2014), die mitunter die Hautbarriere, die Dermisstruktur und die Wundheilung betreffen können.

Hautbarriere

Diabetiker weisen kutane Eigenschaften auf, die auch bei altersbedingter Hauttrockenheit vorzufinden sind (Sakai *et al.*, 2005). Diesbezüglich wird über einen verminderten Hydratisierungszustand des *Stratum corneum* (SC) und einen reduzierten Lipidgehalt der Hautoberfläche berichtet (Sakai *et al.*, 2005; Seite *et al.*, 2011). Interessanterweise findet man aber keinen Unterschied im transepithelialen Wasserverlust im Vergleich zu Kontrollprobanden (Seirafi *et al.*, 2009). Daneben zeichnet sich diabetische Haut durch weniger feine Schuppen aus (Yoon *et al.*, 2002). Wie unter 1.2.1 beschrieben wurde, besitzt das Protein Filaggrin eine zentrale Rolle bei der Ausbildung eines intakten *Stratum corneum*, das für die Integrität der Hautbarriere entscheidend ist (Sandilands *et al.*, 2009). Da der Anteil von Personen mit Filaggrin-Null-Mutationen in einer dänischen Kohorte unter Diabetikern gegenüber gesunden Probanden signifikant erhöht war, besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen *Diabetes mellitus* und einer gestörten SC-Barriere (Thyssen *et al.*, 2011). Dieser könnte das erhöhte Hautinfektionsrisiko von Diabetikern erklären (Muller *et al.*, 2005). Die TJ-Barriere in diabetischer Haut ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

Dermisstruktur

Eine dauerhaft anhaltende Hyperglykämie führt bei schlecht eingestellten Diabetikern zu einer Akkumulation von *advanced glycation endproducts* (AGEs) in der Dermis (Schnider und Kohn, 1980; Uhoda *et al.*, 2005). Dermale Strukturproteine, wie Kollagen- und Elastinfasern, sind besonders anfällig durch nicht-enzymatische Glykierung modifiziert zu werden, da sie einen geringen Umsatz haben (Reiser *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 2014). AGEs vermitteln die Entstehung von Querverbindungen zwischen benachbarten Fasern und verändern so die physikochemischen Eigenschaften der Makromoleküle (Avery und Bailey, 2006; Reihnsner *et al.*, 2000; Schnider und Kohn, 1981 und 1982; Yoshinaga *et al.*, 2012). Abdominelle Haut diabetischen Ursprungs weist eine verminderte Dermisdicke mit verkürzten, dünneren und desorganisierten Kollagenfasern auf (Niu *et al.*, 2012). Die Elastizität des Bindegewebes von diabetischer Haut geht daher zugunsten eines rigiden Netzwerkes verloren, das weniger widerstandsfähig gegenüber mechanischen Einwirkungen ist (Avery und Bailey, 2006; Seirafi *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2002). Da die Orientierung von Kollagen- und Elastinfasern eng mit den strukturellen und funktionalen Eigenschaften des Bindegewebes verknüpft ist (Kumar *et al.*, 2014; Yasui *et al.*, 2004), könnten Veränderungen ihrer räumlichen Ausrichtung zu einer beeinträchtigten Integrität der Haut führen.

Wundheilung

Zu den Auswirkungen einer dauerhaft erhöhten Blutglukosekonzentration zählt weiterhin eine gestörte Wundheilung (Greenhalgh, 2003). Daher ist die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von chronischen Wunden beim Diabetiker im Vergleich zur gesunden Population um ein Vielfaches gesteigert (Richard *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang ist das diabetische Fußsyndrom von großer klinischer Bedeutung. Durch das Tragen des gesamten Körpergewichtes und das sie umgebende Schuhwerk sind Füße enormen Druckbelastungen ausgesetzt und daher in besonderem Maße anfällig für Verletzungen (**Abbildung 1.9**). Infolge einer sensorischen Neuropathie kann es bei Diabetikern deshalb wiederholt zu unbemerkten Läsionen kommen (Veves *et al.*, 1992). Die damit einhergehenden Fußdeformationen begünstigen die Ausbildung weiterer Druckpunkte, an denen bevorzugt Ulzerationen entstehen (Falanga, 2005; Levin, 2002; Shaw und Boulton, 1995). Ein diabetischer Fuß kann auch das Ergebnis einer arteriellen Insuffizienz sein, wenn nicht ausreichend Sauerstoff in das betroffene Areal gelangt (Greenhalgh, 2003; Silhi, 1998). Hierbei besteht ferner die unmittelbare Gefahr der Gewebnekrose. Eine Kombination aus Neuropathie- und Ischämie-bedingten Hautschäden ist ebenfalls möglich. Erschwerend können Infektionen mit Pathogenen hinzukommen, die den chronischen Charakter der Wunde fördern (Muller *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang halten erhöhte *Level* von inflammatorischen Zellen und Zytokinen den entzündlichen Status der Wunde aufrecht (Robson *et al.*, 1990). Hierzu tragen gleichermaßen Gewebsproteasen bei, die Granulationsgewebe und Wachstumsfaktoren abbauen (Kranke *et al.*, 2004). Schließlich weisen Keratinozyten am Wundrand von diabetischen Ulzera eine erhöhte Proliferation auf, während ihre Kapazität zur Migration und zur Differenzierung vermindert ist (Usui *et al.*, 2008). Über die Rolle von TJ-Proteinen in der diabetischen Wunde ist bisher noch nichts bekannt.

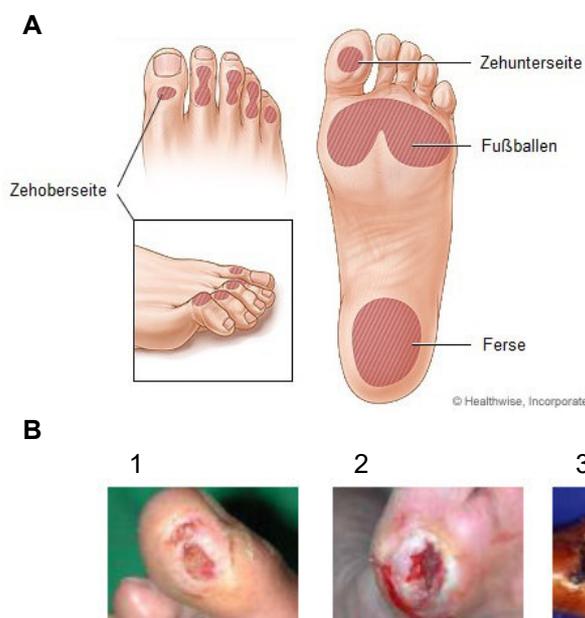


Abbildung 1.9: Wahrscheinliche Lokalisation und dramatischer Verlauf des diabetischen Fußsyndroms. (A) Anfällige Stellen zur Ausbildung eines Ulcus (Abbildung modifiziert nach <http://www.webmd.com>). (B) Das diabetische Fußsyndrom beginnt mit einem (1) oberflächlichen Ulcus (mit potenzieller Infektion oder Infektion nur im Wundbereich), geht über in ein (2) tiefes, gelenknah infiziertes Ulcus, das sich zu (3) einer Osteomyelitis oder einem Abszess entwickelt und schließlich in (4) lokaler Vorderfußnekrose resultiert (Abbildung modifiziert nach Merfort privat).

1.4.4 Aktuelle Behandlungskonzepte bei diabetischen Wunden

Bei Vorliegen einer diabetischen Wunde sind die vorrangigen Behandlungsziele, die Vergrößerung der Wunde zu verhindern und den Wundheilungsprozess bis zum vollständigen Wundschluss zu unterstützen. Ohne geeignete Maßnahmen können die Folgen einer diabetischen Wunde von langen, unbefriedigenden Behandlungszeiten bis hin zur Amputation der betroffenen Körperregion reichen, wodurch die Lebensqualität der Patienten massiv eingeschränkt wird und hohe Kosten für das Gesundheitswesen entstehen (Driver *et al.*, 2010). Erfolgreich angewandte Therapiekonzepte beinhalten gegenwärtig eine Kombination verschiedener Maßnahmen. Hierzu gehören primär die Druckentlastung der Wundstelle sowie die Normalisierung des Blutglukose-Spiegels. Daneben ist Debridement ein zentraler Bestandteil bei der Behandlung diabetischer Wunden, um devitale Gewebeanteile aus der Wunde zu entfernen. Hierbei kann die topische Applikation von Enzymen förderlich sein (Vijaykumar *et al.*, 2011). Begleitend zu den oben beschriebenen Ansätzen werden geeignete Wundaufgaben eingesetzt, um den Heilungsprozess zu beschleunigen. Bei Keimbeseidung der Wunde kann je nach Infektionsgrad eine Antibiotikatherapie erforderlich sein (Klare und Eder, 2007). Als regenerative Therapieoptionen für die Behandlung chronischer Wunden stehen neben rekombinant-humanen Wachstumsfaktoren ebenfalls Zell- und Gewebe-basierte Produkte zur Verfügung (Andrews *et al.*, 2015; Basavaraj *et al.*, 2012).

1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit

Da eine *Diabetes*-Erkrankung häufig mit kutanen Veränderungen assoziiert ist (**siehe Einleitung**), soll in meiner Doktorarbeit die Charakterisierung von humanem diabetischem Hautgewebe und/oder daraus isolierten Keratinozyten/Fibroblasten bezüglich (1) der Barrierefunktion, (2) der Dermisstruktur und (3) der Wundheilungskapazität inklusive der Bedeutung von TJ- und GJ-Proteinen erfolgen.

Ad 1. Zur Analyse der Barrierefunktion wird der Fokus auf TJ-Proteine gelegt, da deren Rolle in diabetischer Haut noch vollkommen ungeklärt ist. Bezüglich der *Stratum corneum*-Barriere wird das Protein Filaggrin untersucht, dessen zentrale Bedeutung für die Hautbarriere in den letzten Jahren gezeigt werden konnte (**siehe Einleitung 1.1.2**). Es wird die immunhistochemische Expression und Lokalisation ausgewählter *Tight-Junction*-Proteine (Claudin-1, Claudin-4, Occludin und *Zonula-occludens*-Protein 1) sowie von Filaggrin in diabetischem Hautgewebe verglichen mit gesunden Kontrollen ermittelt. Daneben soll ebenfalls ihre Expression auf mRNA-Ebene untersucht werden. Weiterhin wird an Keratinozyten, die aus diabetischem und nicht-diabetischem Gewebe isoliert wurden, die Permeabilität für Ionen sowie für höher- und

hochmolekulare Substanzen bestimmt. Parallel zu diesen vergleichenden *In-vitro*-Analysen sollen die mRNA-Level der oben genannten Proteine ermittelt werden.

Ad 2. Unter Anwendung der Zwei-Photonen-Mikroskopie wird der Fragestellung nachgegangen, ob die räumliche Ausrichtung von Kollagen- und Elastinfasern in der Dermis von humanem diabetischem Gewebe verglichen mit gesunden Kontrollen Veränderungen aufweist. In der Absicht, ein Modell für die Analyse von Substanzen, die diese Veränderungen verhindern könnten (Präventionsmodell) zu etablieren, wird getestet, ob sich mögliche Unterschiede in porcinem Gewebe nachstellen lassen, das unter Normal- und Hochglukose-Bedingungen kultiviert wurde. Darüber hinaus wird ein Vergleich der mRNA-Level von Kollagen, Elastin und weiterer Proteine des Bindegewebes zwischen diabetischer und nicht-diabetischer humaner Haut angestrebt.

Ad 3. Bezüglich der Wundheilung werden diabetische und nicht-diabetische Keratinozyten in *Scratch-Assays* bezüglich ihrer Expression von TJ- und GJ-Proteinen untersucht. Darüber hinaus werden in diabetischen und nicht-diabetischen Geweben zusätzlich zu den oben bereits beschriebenen TJ-Proteinen GJ-Proteine untersucht. Für spätere Untersuchungen von wundheilungsfördernden Substanzen soll geklärt werden, inwieweit Zellen oder Gewebe, die unter Hochglukose-Bedingungen kultiviert wurden, diabetische Zellen/Gewebe widerspiegeln/ersetzen können. Exemplarisch soll dann die Wirkung des Triterpenextraktes (TE) und seiner Hauptkomponente Betulin, die bei akuter Wundheilung einen sehr guten Effekt zeigen (**siehe Einleitung 1.3.3.1**), auf die Wundheilung von diabetischen und Hochglukose-Zellen bzw. -Gewebe getestet werden.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerätename	Gerätetyp	Hersteller
Absaugsystem mit Vakuumpumpe	Vacusip	Integra Biosciences (Biebertal, DE)
Bandpassfilter	FF01-447/55-25 FF01-417/60-25	Semrock (Rochester, USA)
CO ₂ -Inkubatoren	MCO-17 AIC Heracell™ 150i	Sanyo (Moriguchi, Japan) Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Dichroitischer Spiegel	FF555-Di03-25x36	Semrock (Rochester, USA)
Digitalkameras	C-5050 (ZOOM) C 4742-95	Olympus Deutschland GmbH (Heidelberg, DE) Hamamatsu (Hamamatsu, Japan)
Drehschüttler	<i>Tiny Turner</i>	CTI (Idstein, DE)
Einfrier-Behälter für Zellen	<i>Mr. Frosty™ Freezing Container</i> <i>Cool Cell®</i>	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE) BioCision LLC (Larkspur, USA)
Einschweißgerät	Folio	Severin (Sundern, DE)
Entwicklungsgerät für Röntgenfilme	Curix 60	Agfa (Berlin, DE)
Feinwaage	ISO 9001	Sartorius (Hannover, DE)
Fluorometer	<i>Infinite M200</i>	Tecan (Crailsheim, DE)
Gerät zur Bestimmung der RNA-Integrität	<i>Bioanalyzer 2100</i>	Agilent (Santa Clara, USA)
Gerät zur Verwundung von konfluenten Zellrasen	<i>Woundmaker™</i>	Essen BioScience (Ann Arbor, USA)
Heizblock	Ori-Block 3 UNO-Thermoblock	Techne (Cambridge, UK) Biometra GmbH (Göttingen, DE)
Heizmagnetrührer	MR 3001	Heidolph (Schwabach, DE)
Homogenisator	<i>TissueLyser</i>	Qiagen (Hilden, DE)
Impedanzmessgerät	<i>cellZscope®</i>	nanoAnalytics GmbH (Münster, DE)
Kryostat	CM 3050	Leica (Wetzlar, DE)
Laser-Strahlanlage	TriMScope®	Lavision Biotec (Bielefeld, DE)
Materialien zur Herstellung von SDS-Gelen	<i>Mini-Protean® Tetra Handcast Systems</i>	Bio-Rad (München, DE)
Mikroskope	Axioplan 2 (Fluoreszenz) CH-2 (Licht-, invers, aufrecht) BX51WI DMIL (Licht-, invers) DMLS (Licht-, aufrecht) IncuCyte Zoom®	Zeiss (Göttingen, DE) Olympus (Hamburg, DE) Olympus (Hamburg, DE) Leica (Wetzlar, DE) Leica (Wetzlar, DE) Essen BioScience (Ann Arbor, USA)
Mikroskopkamera	EC3	Leica (Wetzlar, DE)
Netzgeräte	<i>Standard Power Pack P 25</i> <i>Power Supply Stage Controller</i>	Biometra (Göttingen, DE) Lavision Biotec (Bielefeld, DE)

<i>Notebook</i>	Latitude E5500	Dell (Round Rock, USA)
pH-Meter	766 Calimatic	Knick (Berlin, DE)
Photoelektronenvervielfacher	H6780-20-LV-1M	Hamamatsu (Hamamatsu, Japan)
Photometer	<i>Sunrise</i>	Tecan (Crailsheim, DE)
Pipetten (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10 bis 100 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl, 5000 µl)	<i>Research</i> [®]	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipettierhilfen	Macro Pipetus	Brand (Wertheim, DE) Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, DE)
<i>Real-Time PCR-Cycler</i>	<i>LightCycler</i> [®] 96 BioMark [™] -HD-System	Roche (Basel, Schweiz) Fluidigm (South San Francisco, USA)
Reinstwasseranlage	Astacus LS TI	Membrapure GmbH (Bodenheim, DE)
Rotationsschüttler	Roto-Shake Genie [®]	Scientific Industries (Bohemia, USA)
SDS-Gel-Gelektrophoresekammer	Mini-Protean [®] -Tetra-System	Bio-Rad (München, DE)
<i>Semidry-Blot-System</i>	Trans-Blot [®] Turbo [™]	Bio-Rad (München, DE)
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Schüttler	KS250	IKA [®] Werke (Staufen im Breisgau, DE)
Sterilwerkbank	Hera Safe 12	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
Titan:Saphir-Laser	Mai Tai	Spectra-Physics (Stahnsdorf, DE)
Voltohmeter	<i>Millicell</i> [®] ers REAXtop	Merck Millipore (Darmstadt, DE) Heidolph (Schwabach, DE)
Vortexer	VF2 Vortex-Genie 2	IKA [®] Werke (Staufen im Breisgau, DE) Scientific Industries(Bohemia, USA)
Wärmeschrank	T6030	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
Waage	BL3100	Sartorius (Hannover, DE)
Wippschüttler	<i>Silent Rocker</i>	CTI (Idstein, DE)
Zellzählgerät	<i>Countess</i>	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Zentrifugen	Laborfuge 400R	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
	Biofuge 13	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
	Biofuge fresco	Heraeus Instruments (Hanau, DE)

2.2 Chemikalien

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller
Aceton	Geyer Hamburg GmbH (Hamburg, DE)
Acrylamid	Serva (Heidelberg, DE)
Albumin-Standard	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva (Heidelberg, DE)
Bacitracin	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
β -Mercaptoethanol	Fluka (Taufkirchen, DE)
Bisacrylamid	Serva (Heidelberg, DE)
Bradford-Lösung	PanReac AppliChem (Darmstadt, DE)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck (Darmstadt, DE)
Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Coomassie Brilliant Blau G250	Fluka (Taufkirchen, DE)
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)	Roche (Basel, Schweiz)
D-Glucose-Lösung (10 %)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Di-Natriumhydrogensulfat-Dihydrat	Merck (Darmstadt, DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck (Darmstadt, DE)
EDTA Versen (zellkultur-getestet)	Biochrom (Berlin, DE)
EDTA	Merck (Darmstadt, DE)
Eosin G	Chroma-Gesellschaft (Münster, DE)
Essigsäure	Riedel-de Haen (Seelze, DE)
Ethanol (reinst)	Merck (Darmstadt, DE)
Ethanol (vergällt)	Walter CMP GmbH (Hamburg, DE)
Eukitt	Kindler GmbH (Freiburg, DE)
FITC-Dextran (4 und 40 kDa)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Fluoromount G	Southern Biotech (Eching, DE)
Fötales Kälberserum beim Passagieren von primären humanen Keratinozyten (Lot-Nr.049D)	Biochrom (Berlin, DE)
Fötales Kälberserum für die Kultivierung von porcinem Gewebe (Lot.-Nr. 434 H)	Biochrom (Berlin, DE)
FITC-Dextran (4 kDa)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
FITC-Dextran (40 kDa)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
Glycerin	Roth (Karlsruhe, DE)
Glycin	Roth (Karlsruhe, DE)
Hämalaunlösung nach Mayer	Merck (Darmstadt, DE)
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Igepal	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
I-OMe-Tyrphostin (AG 538)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Isopentan	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, DE)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, DE)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, DE)
Kochsalzlösung, isoton	Baxter Deutschland GmbH (Unterschleißheim, DE)
Kryoeinbettmedium	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe, DE)
Methanol	Mallinckrodt Baker (Deventer, Niederlande, DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Mallinckrodt Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumchlorid-Lösung (0,9 %)	B. Braun Melsungen (Melsungen, DE)
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
<i>Normal Goat Serum</i> (NGS)	Dianova (Hamburg, DE)
PBS, steril	Biochrom (Berlin, DE)
PDGF, human (1,2 μ g/ml)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin, DE)

Pepstatin	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Petroleumbenzin	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (100x)	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)
Phosphorsäure (88%)	Riedel-de Haen (Seelze, DE)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Protein-Größenstandard (<i>Spectra Multicolor Broad Range</i>)	Bio-Rad (München, DE)
RNaseZAP™	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Salzsäure (HCl)	Riedel-de Haen (Seelze, DE)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Bio-Rad (München, DE)
Sterilwasser	B. Braun Melsungen (Melsungen, DE)
Sterilium®	Hartmann (Heidenheim an der Brenz, DE)
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Fluka (Taufkirchen, DE)
Triiodothyronin	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Tris (Trizma Base)	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Trypanblau	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
Trypsin (2,5 %)	Biochrom (Berlin, DE)
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)	Biochrom (Berlin, DE)
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, DE)
Wasser, DEPC-behandelt	Eppendorf (Hamburg, DE)
Xylol	Mallinckrodt Baker (Deventer, Niederlande)

2.3 Galenische Formulierungen mit Triterpenextrakt-Anteil für Wundheilungsanalysen

Die Firma Birken AG gewinnt aus den Korkschichten der äußeren Rinde von weißen Birken (*Betula pendula*) einen Triterpenextrakt (TE), dessen Hauptbestandteil Betulin ist. Daneben sind Lupeol, Betulinsäure, Erythrodiol und Oleanolsäure als weitere Einzeltriterpene enthalten.

2.3.1 *In-vitro*-Wundheilungsanalysen

Für die *In-vitro*-Wundheilungsanalysen wurden der TE oder ein reiner Betulinextrakt in DMSO gelöst. Die prozentualen Anteile der TE- Einzeltriterpene sind **Tabelle 2.3** zu entnehmen.

Tabelle 2.3: Prozentuale Anteile der TE-Einzeltriterpene in DMSO

Einzeltriterpen	Prozentualer Anteil
Betulin	86,85
Lupeol	3,94
Betulinsäure	3,54
Erythrodiol	0,77
Oleanolsäure	0,62
Weitere noch undefinierte Bestandteile	4,28

2.3.2 Ex-vivo-Wundheilungsanalysen

Die Herstellung des Oleogels (Zusammensetzung siehe **Tabelle 2.4**) sowie der Wasser-in-Öl-Emulsionen (Zusammensetzung siehe **Tabelle 2.5**) mit TE-Anteil erfolgte durch Diplompharmakologin Anna Färber, die im Institut der Pharmazeutischen Technologie an der Universität Tübingen ihre Doktorarbeit durchführt. Die prozentuale Gewichtung der Einzeltriterpene im TE-Oleogel ist analog zu der in **Tabelle 2.3**.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des TE-Oleogels

Komponente	Prozentualer Anteil [Gew.-%]
Triterpentrockenextrakt der Birken AG	10
Sonnenblumenöl der Firma Caelo	90

Tabelle 2.5: Zusammensetzung der Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsionen

Zusammensetzung	Prozentualer Wasseranteil der W/O-Emulsion		
	60	30	5
PBS [in Vol.-%]	60	30	5
TE-Oleogel (10%) [Vol.-%]	40	70	95

2.4 Lösungen

Die verwendeten Lösungen und deren Zusammensetzung sind in **Kapitel 3** eingangs jeder Methode aufgeführt.

2.5 Kits

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Kits

Name	Verwendungszweck	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Bestimmung der Integrität von RNA	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Bestimmung der Proliferationskapazität von kultivierten Zellen	Roche (Basel, Schweiz)
Maxima First Strand cDNA Synthesis	Synthese von cDNA ausgehend von RNA	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Maxima Probe qPCR MasterMix (2x)	Quantitative Real-Time-PCR	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
RNeasy® Micro Mini Kit	RNA-Isolation aus Zellen	Qiagen (Hilden, DE)
RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit	RNA-Isolation aus Gewebe	Qiagen (Hilden, DE)
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Detektion der Immunreaktion beim Western-Blot	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)

2.6 Peptide

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Peptide

Name	Verwendungszweck	Hersteller
<i>Platelet-derived growth factor</i> (human)	Positivkontrolle bei der Analyse wundheilungsfördernder Substanzen unter diabetischen Bedingungen	Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE)
S961	Inhibition des Insulin-Rezeptors	Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, USA)

2.7 Antikörper

2.7.1 Antikörper für immunhistochemische Analysen

Tabelle 2.8: Übersicht der verwendeten Primärantikörper für die immunhistochemische Analyse von humanem kryokonserviertem Gewebe und ihre Anwendungsparameter

Primärantikörper (Klon/AK-Bezeichnung)	Fixierung des Gewebes	Block	Verdünnung	Inkubation	Hersteller
Kaninchen anti Claudin-1 (JAY.8)	Aceton	-	1:2000	über Nacht bei 4°C	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Maus anti Claudin-4 (3E2C1)	Aceton	Magermilch+ NGS + Triton	1:600	über Nacht bei 4°C	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Meerschweinchen anti Connexin-26 (polyklonal)	Aceton	-	1:2000	über Nacht bei 4°C	Eigene Herstellung (Brandner <i>et al.</i> , 2004)
Maus anti Connexin-43 (polyklonal)	Aceton	-	1:400	über Nacht bei 4°C	Transduction Laboratories (Heidelberg, DE)
Kaninchen anti Filaggrin (polyklonal)	Aceton	NGS	1:1000	über Nacht bei 4°C	BioLegend® (Fell, DE)
Maus anti Ki67 (MIB-1)	Aceton	-	1:80	über Nacht bei 4°C	Dako (Hamburg, DE)
Maus anti Occludin (OC3F10)	Ethanol	NGS + Triton	1:250	1 h bei RT	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Kaninchen anti <i>Zonula occludens</i> -1 (Z-R1)	Aceton	NGS + Triton	1:500	über Nacht bei 4°C	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)

Tabelle 2.9: Übersicht der verwendeten Antikörper-Isotypen als Negativkontrollen für die immunhistochemische Analyse von humanem kryokonserviertem Gewebe

Negativkontrolle	Hersteller
Kaninchen Ig-Fraktion	Dako (Hamburg)
Maus IgG1, Isotyp-Kontrolle	R&D Systems (Wiesbaden)
Meerschweinchen IgG	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

Die Verdünnung der Negativkontrolle richtet sich nach der Primärantikörper-Konzentration (zur Berechnung siehe **Formel 3.2** unter **Kapitel Methoden 3.3.5**).

Tabelle 2.10: Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper für die immunhistochemische Analyse von humanem kryokonserviertem Gewebe und ihre Verdünnung

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor® 488 F(ab') ₂	1:600	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Ziege anti Maus Alexa Fluor® 488 F(ab') ₂	1:600	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Ziege anti Meerschweinchen Alexa Fluor® 488 F(ab') ₂	1:500	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)

2.7.2 Antikörper für *Western-Blot*-Analysen

Tabelle 2.11: Übersicht der verwendeten Primärantikörper für *Western-Blot*-Analysen von humanen Proteinproben und ihre Anwendungsparameter

Primärantikörper	Klon	Verdünnung	Inkubation	Hersteller
Kaninchen anti Akt (pan)	C67E7	1:1000	über Nacht bei 4°C	Cell Signaling Technology® (Danvers und Boston, USA)
Maus anti β -Aktin	AC-15	1:20.000	1 h bei RT	Sigma-Aldrich® (Taufkirchen, DE)
Kaninchen anti Phospho-Akt (Ser473)	polyklonal	1:200	über Nacht bei 4°C	Cell Signaling Technology® (Danvers und Boston, USA)
Maus anti α -Tubulin	DM1A	1:8000	über Nacht bei 4°C	Calbiochem® (Bad Soden, DE)

Tabelle 2.12: Übersicht der verwendeten MRP-gekoppelten Sekundärantikörper für *Western-Blot*-Analysen von Proteinproben aus primären humanen Keratinozyten und ihre Verdünnungen

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti Kaninchen MRP	1:5000	Dako (Hamburg)
Ziege anti Maus MRP	1:5000	Dako (Hamburg)

2.8 DNA-Oligonukleotide

Tabelle 2.13: Übersicht der analysierten Gene mit Gensymbol, zugehörigem Gen- und Proteinnamen sowie Identifikationsnummer der verwendeten *TaqMan*[®]-Sonden

Gensymbol	Genname	Proteinname	Identifikationsnummer der <i>TaqMan</i> [®] -Sonde	Hersteller
<i>CLDN1</i>	Claudin 1 (human)	Claudin-1	Hs00221623_m1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>CLDN4</i>	Claudin 4 (human)	Claudin-4	Hs00533616_s1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>COL1A1</i>	<i>Collagen, type I, alpha 1</i> (human)	Kollagen I, $\alpha 1$	Hs00164004_m1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>COL5A2</i>	<i>Collagen, type V, alpha 2</i> (human)	Kollagen V, $\alpha 2$	Hs00893878_m1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>ELN</i>	Elastin (human)	Elastin	Hs00355783_m1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>FBN1</i>	Fibrillin 1 (human)	Fibrillin-1	Hs00171191_m1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>FLG</i>	Filaggrin (human)	Filaggrin	Hs00856927_g1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>FN1</i>	Fibronectin 1 (human)	Fibronektin	Hs00365052_m1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH	Hs02758991_g1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>GJA1</i>	<i>Gap junction protein, alpha 1, 43kDa</i> (human)	Connexin 43	Hs00748445_s1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>GJB2</i>	<i>Gap junction protein, beta 2, 26kDa</i> (human)	Connexin 26	Hs00269615_s1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>OCLN</i>	Occludin (human)	Occludin	Hs00170162_m1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>TJP1</i>	<i>Tight junction protein 1</i> (human)	<i>Zonula-occludens-Protein-1</i>	Hs01551861_m1	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)

2.9 Gewebe und Zellen

2.9.1 Hautgewebe

2.9.1.1 Porcines Gewebe

Der Effekt unterschiedlicher TE-Formulierungen (siehe **Tabelle 2.4** und **Tabelle 2.5**) wurde mithilfe des porcinen *Ex-vivo*-Wundheilungsmodells (WHM; Patent-Nummer DE10317400) getestet. Das hierzu verwendete Gewebe stammte von 6 Monate alten Hausschweinen (*Sus scrofa domestica*), die aus einer Kreuzung zwischen Yorkshire-Schwein und deutschem Edelschwein hervorgingen, und wurde von der Schlachtereier Hoose (22941 Hammoor) bezogen.

2.9.1.2 Humane Gewebe

Basierend auf der Ethik WF-029/12 wurde humanes Gewebe diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs aus verschiedenen Hamburger Kliniken erhalten. In **Tabelle 2.14** finden sich die von mir verwendeten Gewebe und die mit ihnen durchgeführten Analysen.

2.9.2 Zellen

2.9.2.1 Humane infantile Keratinozyten

Die Anzucht von humanen Keratinozyten aus infanten Vorhäuten (Alter der Spender < 5 Jahre), die in der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf operativ entfernt wurden, war durch die Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg autorisiert (WF-061/12). Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurden die Zellen von fünf unterschiedlichen Donoren verwendet.

2.9.2.2 Humane adulte Keratinozyten

Gemäß der Ethik PV4198 wurden humane Keratinozyten aus humanen Geweben adulter Diabetiker und gesunder Individuen isoliert und in Kultur gebracht (siehe **Tabelle 2.15**).

Tabelle 2.14: Übersicht der verwendeten humanen Gewebe diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs

Phänotyp	Untersuchte Gewebe				Verwendet für		
	Lokalisation	Geschlecht	Alter	Hb1Ac-Wert	immunhistochemische Analysen	Genexpressionsanalysen	Analysen zur Dermisstruktur
nicht-diabetisch	Fußrücken	weiblich	35 J.	n. a.	x ^{\$}	x ^{\$}	
	Fußsohle	männlich	72 J.	n. a.	x [#]		
	Wange	männlich	85 J.	n. a.	x ^{\$}	x [#]	x
	Unterschenkel	männlich	71 J.	n. a.	x [*]	x [*]	x
	Oberschenkel	männlich	68 J.	n. a.	x	x	x
	Oberschenkel	n. a.	n. a.	n. a.	x	x	x
diabetisch	Zehrücken	männlich	84 J.	n. a.	x ^{\$}		
	Zehunterseite	männlich	84 J.	n. a.	x [#]	x ^{\$}	
	Wange	männlich	84 J.	8,8	x ^{\$}	x [#]	x
	Unterschenkel	männlich	71 J.	7,0	x [*]	x [*]	x
	Oberschenkel	weiblich	62 J.	6,4	x	x	x

Die Symbole \$, #, § und * deuten jeweils Paarungen von einem nicht-diabetischen mit einem diabetischen Gewebe hinsichtlich der Kriterien Körperlokalisierung, Geschlecht, Alter und Hb1Ac-Wert (in %) an. Bei Nicht-Diabetikern wird der Hb1Ac-Wert nicht erhoben.

Tabelle 2.15: Übersicht der verwendeten humanen Keratinozyten aus dem Hautgewebe adulter Diabetiker und gesunder Individuen

Phänotyp	Gewebe, aus denen Zellen kultiviert wurden				Verwendet für				
	Körperareal	Geschlecht	Alter	Hb1Ac-Wert	Permeabilitätsanalysen	Genexpressionsanalysen	klassischen Scratch-Assay	Scratch-Assay (IncuCyte-Zoom®-System)	Proliferationsanalysen
nicht-diabetisch	n. a.	männlich	81 J.	n. a.	x				
	n. a.	männlich	70 J.	n. a.		x			
	n. a.	weiblich	32 J.	n. a.	x	x			
	n. a.	weiblich	76 J.	n. a.		x			
	Oberschenkel	männlich	88 J.	n. a.		x			
	Abdomen	n. a.	n. a.	n. a.	x		x		x
	Wange	weiblich	81 J.	n. a.				x	
	Wange	männlich	93 J.	n. a.		x		x	
	Abdomen	weiblich	36 J.	n. a.	x				x
	Wange	männlich	78 J.	n. a.				x	
	Rücken	weiblich	40 J.	n. a.	x				x
	Gesicht	männlich	66 J.	n. a.			x	x	
	Brust	männlich	66 J.	n. a.			x	x	
	Stirn	männlich	78 J.	n. a.			x		
	Stirn	weiblich	48 J.	n. a.	x				
Bein	weiblich	88 J.	n. a.					x	
Abdomen	weiblich	38 J.	n. a.					x	
diabetisch	Oberschenkel	männlich.	79 J.	7,8			x		
	Oberschenkel	männlich	86 J.	8,0			x	x	
	Oberschenkel	männlich	69 J.	6,5		x			
	Oberschenkel	männlich	45 J.	6,4		x			
	Zehoberseite	männlich	84 J.	n. a.	x				
	Oberschenkel	weiblich	62 J.	6,4		x	x		
	Wange	männlich	84 J.	8,8	x	x		x	
	Oberschenkel	männlich	59 J.	6,4				x	
	Unterschenkel	männlich	71 J.	7,0				x	
	Oberschenkel	männlich	59 J.	5,5	x			x	

2.10 Software

Tabelle 2.16: Übersicht der verwendeten *Software*-Programme und ihr Verwendungszweck

Name	Verwendungszweck	Hersteller
<i>CellZscope 2.22.2</i>	Messung des transepidermalen Widerstandes von primären humanen Keratinozyten	NanoAnalytics GmbH (Münster, DE)
<i>2100 Expert Software</i>	Bestimmung der RNA-Integrität	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
<i>ImageJ</i>	1. Densitometrische Auswertung der Intensität von <i>Western-Blot</i> -Banden 2. Bestimmung der Fluoreszenzintensität immunhistochemischer Färbungen	Wayne Rasband
<i>ImageJ-Plugin Directionality</i>	Bestimmung der Orientierung von Kollagen- und Elastinfasern	Jean-Yves Tinevez
IBM SPSS Statistics (Version 22)	Statistische Auswertung	International Business Machines (IBM) (Armonk, USA)
<i>i-control 1.5</i>	Messung der Fluoreszenzintensität von Lösungen	Tecan (Crailsheim, DE)
<i>Inspector 472 Pro</i>	Steuerung des Zweiphotonen-mikroskops und Einstellung der Parameter für die mikroskopischen Messungen mit dem Zweiphotonen-mikroskop	Lavision Biotec (Bielefeld, DE)
<i>IncuCyte™ Scratch Wound Cell Migration Software Module</i>	Steuerung des Mikroskops zur Lebendzellmikroskopie	Essen BioScience (Ann Arbor, USA)
LAS EZ 2.1.0	Fotografieren des Wundheilungsfortschritts während der klassischen <i>Scratch-Assay</i> -Analysen	Leica (Wetzlar, DE)
<i>LightCycler® 96 Systems 1.1</i>	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR	Roche (Basel, Schweiz)
Magellan™ 6	Extinktionsmessungen	Tecan (Crailsheim, DE)
Mai Tai Control 0454-8260 Rev E1	Überprüfung der Funktionalität des Lasers	Spectra-Physics (Stahnsdorf, DE)
<i>Microsoft Office</i> <i>Microsoft Word</i> <i>Microsoft Excel</i>	Verfassen der Doktorarbeit (Statistische) Auswertung (gepaarter und ungepaarter t-Test nach <i>Student</i>) und Darstellung der Ergebnisse meiner Doktorarbeit	Microsoft (Redmond, USA)
<i>NanoDrop 2000</i>	Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Ribonukleinsäure	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)
<i>OpenLab 5.0.2</i>	1. Fotografieren der immunhistochemischen Färbungen 2. Ausmessen der regenerierten Epidermis von porcinen <i>Ex-vivo</i> -Wundheilungsmodellen	Improvision (Forchheim, DE)
<i>TScratch</i>	Auswertung der Fotos, die den Wundheilungsfortschritt beim <i>Scratch-Assay</i> dokumentieren	Computational Science & Engineering Laboratory (Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Anzucht humaner Keratinozyten aus infanten Vorhäuten

DermaLife® Keratinocyte Medium [LifeLine Cell Technology (Frededrick, USA)]

Angesetzt in *DermaLife® Basal Medium*

Apo-Transferrin	5 µg/ml
Boviner Hypophysenextrakt	0,4 %
Calciumchlorid	0,05 mM
Extrakt P [®]	0,4 %
Epinephrin	1,0 µM
Hydrocortison-Hemisuccinat	100 ng/ml
L-Glutamin	6 mM

Die Vorhäute wurden zunächst intensiv in PBS gewaschen. Die anschließende Präparation des Gewebes erfolgte auf einem mit PBS befeuchteten Objektträger unter Verwendung eines Skalpell. Nachdem das subkutane Fett entfernt worden war, wurde das Gewebe zu ungefähr 1 mm² großen Fragmenten kleingeschnitten und in eine Petrischale (A = 9,6 cm²) mit 0,25 % Trypsin überführt. Schließlich wurde die Petrischale mit den Fragmenten über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C oder für zwei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am folgenden Tag beziehungsweise zwei Stunden später wurde die Epidermis der Gewebefragmente abgezogen und in 10 % FCS gegeben, um die Wirkung des Trypsins abzustoppen. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Suspension aus Epidermisfragmenten und FCS wurden die Zellen dann vereinzelt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 800 x g für 5 Minuten. Der resultierende Überstand wurde abgenommen und verworfen. Dann wurden die Zellen in *DermaLife® Keratinocyte Medium* resuspendiert, ausgezählt und in einer Konzentration von 1.000.000 Zellen/10 ml in Petrischalen mit A = 78,5 cm² ausgesät. Die Zellen wurden dann für mindestens fünf Tage im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert, bevor ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Bei einer Konfluenz von 70 % wurden die Keratinozyten subkultiviert (**siehe 3.1.3**) oder kryokonserviert (**siehe 3.1.5**).

3.1.2 Anzucht humaner Keratinozyten aus dem Hautgewebe adulter nicht-diabetischer und diabetischer und Spender

Die Anzucht von Keratinozyten aus humanem Gewebe, das von adulten Spendern stammte, entsprach bis einschließlich zur Zellaussaat der Vorgehensweise für die Anzucht von infanten Keratinozyten (**siehe 3.1.1**). Anschließend wurden adulte Keratinozyten im Unterschied zu infanten Keratinozyten jedoch 10 bis 14 Tage unberührt bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert, bevor das Medium gewechselt wurde. Wenn adulte Keratinozyten eine Konfluenz von 60-70 % erreicht hatten, wurden sie analog zu infanten Keratinozyten entweder subkultiviert (**siehe 3.1.3**) oder kryokonserviert (**siehe 3.1.5**).

3.1.3 Subkultivierung von primären humanen Keratinozyten

Keratinozytenmedien

DermaLife® Keratinocyte Medium [LifeLine Cell Technology (Frededrick, USA)]

Angesetzt in *DermaLife® Basal Medium*

Apo-Transferrin	5 µg/ml
Boviner Hypophysenextrakt	0,4 %
Calciumchlorid	0,05 mM
Extrakt P®	0,4 %
Epinephrin	1,0 µM
Hydrocortison-Hemisuccinat	100 ng/ml
L-Glutamin	6 mM
Penicillin/Streptomycin	100 Einheiten/ml
Rh Insulin	5 µg/ml
Rh TGF-α	0,5 ng/ml

EpiLife® Keratinocyte Medium (defined) [Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)]

Angesetzt in *EpiLife® Basal Medium*

Human Keratinocyte Growth

Supplement (HKGS)

Bovines Transferrin	5 µg/ml
Calciumchlorid	0,06 mM
Humaner EGF	0,2 ng/ml
Hydrocortison	0,18 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	100 Einheiten/ml
Rh IGF-I	1 µg/ml
Rinderhypophysenextrakt	0,2 % v/v

Keratinocyte-SFM (serum-free medium) [Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE)]

Angesetzt in *K-SFM Basal Medium*

Calciumchlorid	0,09 mM
Penicillin/Streptomycin	100 Einheiten/ml
Rh EGF	5 ng/ml
Rinderhypophysenextrakt	50 µg/ml

Keratinocyten-Trypsin-Lösung

Angesetzt in PBS

Trypsin	0,01 %
EDTA	0,02 %

Zur Subkultivierung der Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nachdem das PBS wieder abgenommen wurde, erfolgte die Zugabe von 0,01 %/0,02 % Trypsin/EDTA auf den Zellrasen. Die Petrischale wurde dann für 5 Minuten bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Ablösen der Zellen konnte mikroskopisch überprüft werden. Die Zellsuspension wurde mithilfe einer Pasteur-Pipette aufgenommen und mit ihr der Boden der Petrischale abgespült, um noch adhärenente Zellen zu lösen. Die enzymatische Aktivität von Trypsin wurde durch die Zugabe von 10 % FCS in PBS abgestoppt. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 800 x g. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, während das Zellpellet in einem geeigneten Volumen des Keratinocytenmediums resuspendiert wurde. Schließlich wurden die Zellen in der gewünschten Zahl für ein geplantes Experiment ausgesät, im Verhältnis 1:3 subkultiviert oder zur späteren Verwendung kryokonserviert.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl von primären humanen Keratinocyten

Die Zellzahlbestimmung erfolgte unter Verwendung des automatischen Zählgerätes *Countess*TM. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen, wurde eine Vitalfärbung mittels Trypanblau durchgeführt. Die Substanz färbt ausschließlich tote Zellen an, weil sie von lebenden Zellen mit intakter Zellmembran nicht aufgenommen wird. Daher erscheinen tote Zellen einheitlich blau, während lebende Zellen ein helles Zytoplasma aufweisen, das von einer dunklen Plasmamembran umgeben ist. Damit Zellfragmente und Zellaggregate nicht in die Betrachtung eingingen, wurde der zu berücksichtigende Zelldurchmesser auf einen Bereich von 6 bis 60 µm eingeschränkt. Für die Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension mit der Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Wegen der Zytotoxizität des Farbstoffs wurden unmittelbar 10 µl des Gemisches in die Zählkammer eines gerätespezifischen Objektträgers pipettiert und der Zählvorgang innerhalb von 3 Minuten gestartet. Das Gerät zählte anschließend alle Zellen, die auf dem Bildschirm angezeigt wurden. Dieser Ausschnitt entsprach einem Volumen von 4 µl und konnte beliebig über die gesamte Zählkammer verschoben werden. Die Ausgabe umfasste die Konzentration der Zellsuspension pro ml für alle gezählten Zellen sowie für alle lebenden und toten Zellen. Aus den zuvor genannten Parametern berechnete das Gerät ferner die Viabilität der Zellen.

3.1.5 Kryokonservierung von primären humanen Keratinozyten

Kryomedium

Angesetzt in *DermaLife*[®] *Keratinocyte Medium* oder *Keratinocyte-SFM*

FCS	20 %
DMSO	10 %

Bei einer Konfluenz von 70 % wurden primäre humane Keratinozyten gemäß des Protokolls zur Subkultivierung (siehe 3.1.3) vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst und herunterzentrifugiert. Zur Kryokonservierung der Zellen wurde das Zellpellet anschließend in einem geeigneten Volumen Kryomedium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 auf Kryogefäße (Thermo Fisher Scientific) à 1,8 ml verteilt. Die Kryopgefäße wurden danach aufrecht in einen Einfrier-Behälter (*Mr. Frosty*[™] *Freezing Container*, *Thermo Fisher Scientific*; *Cool Cell*[®], *BioCision LLC*) gestellt. Letztere ermöglichen der Zellsuspension, sich bei einer Rate von 1 °C/min auf -80 °C abzukühlen. Wenn diese Temperatur erreicht war, wurden die Zellen in Flüssigstickstoff überführt und darin dauerhaft kryokonserviert.

3.1.6 Auftauen von primären humanen Keratinozyten

Zunächst wurden die Kryogefäße mit Zellen aus dem Flüssigstickstoff herausgenommen und unmittelbar in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Nach einer Auftauzeit von ungefähr 3 Minuten wurden die Röhrchen desinfiziert und unter die Sterilwerkbank genommen. Dann wurde die Zellsuspension in 6 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 800 x g. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 3 ml *DermaLife*[®] *Keratinocyte Medium*, *EpiLife*[®] *Keratinocyte Medium (defined)* oder *Keratinocyte-SFM* resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension in ein Zellkulturgefäß pipettiert, in das bereits ein geeignetes Volumen des Mediums vorgelegt wurde. Zur Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit wurden die Petrischalen schließlich in den Brutschrank gestellt.

3.1.7 Scratch-Assay

Um das Schließen einer *In-vitro*-Wunde durch primäre humane Keratinozyten zu untersuchen, wurde der *Scratch-Assay* verwendet. Für die Analyse standen zwei Varianten der Methode zur Verfügung.

3.1.7.1 Klassischer *Scratch-Assay*

Beim klassischen *Scratch-Assay* wurden die Zellen abhängig vom Alter der Gewebespende entweder in einer Konzentration von 200.000 (infante Keratinozyten) oder 225.000 (adulte Keratinozyten) pro 1,5 ml Keratinozytenmedium in 12-Well-Platten ausgesät. Die Aussaatdichte wurde jeweils derart gewählt, dass die Zellen nach 48-stündiger Kultivierung vollständige Konfluenz erreichten. Anschließend wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze (10 bis 100 μ l) in der Mitte jeder Vertiefung von oben nach unten eine Kratzspur durch den konfluenten Zellrasen gezogen und so die Zellen in diesem Bereich entfernt („*Scratch-Wunde*“). Danach wurde das Medium abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend frisches Medium in die *Wells* pipettiert. Im Folgenden wurden zu definierten Zeitabständen über einen Zeitraum von insgesamt 36 Stunden mindestens drei Fotos pro *Well* (oben, Mitte, unten) manuell aufgenommen, um das Schließen der *Scratch-Wunde* nachvollziehen zu können. Hierzu musste die *Well-Platte* aus dem Brutschrank genommen werden. Durch drei am Boden der *Well-Platte* eingezeichnete Striche waren die zu fotografierenden Positionen festgelegt (**Abbildung 3.1**). Nachdem alle *Wells* fotografiert worden waren, wurde die *Well-Platte* zur Inkubation wieder zurück in den Brutschrank gestellt. Ein Mediumwechsel wurde alle 12 Stunden nach Verwendung des *Monolayers* durchgeführt und erfolgte grundsätzlich vor der Aufnahme der Bilder.

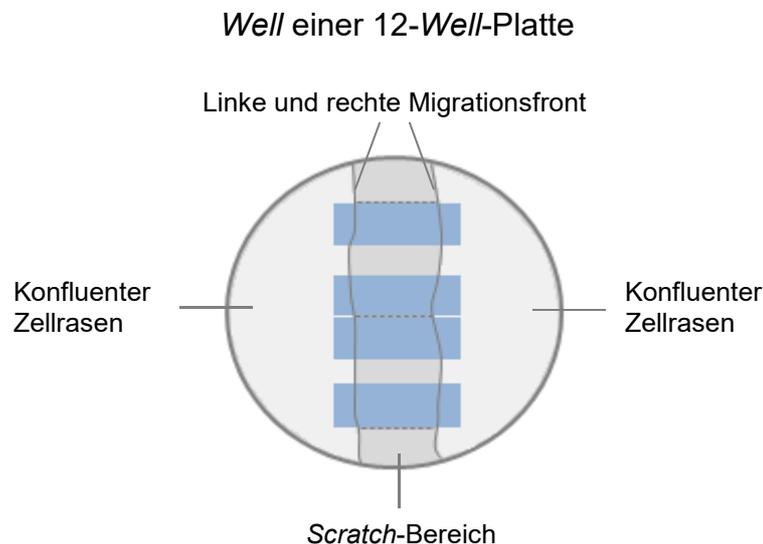


Abbildung 3.1: Fotografierte *Well*-Areale beim klassischen *Scratch-Assay*. Die gestrichelten Linien stellen jeweils die obere und beziehungsweise oder untere Grenze des fotografierten Bereiches (blaue Rechtecke) dar.

3.1.7.2 *IncuCyte-Zoom*[®]-System in Kombination mit dem *Woundmaker*[™]

Eine Alternative zum klassischen *Scratch-Assay* wurde unter Anwendung des *IncuCyte-Zoom*[®]-Systems (*Essen BioScience*) in Kombination mit dem *Woundmaker*[™] (*Essen BioScience*) realisiert. Bei dieser Variante des *Scratch-Assays* wurden adulte humane Keratinozyten in einer Konzentration von 25.000 Zellen/100 µl K-SFM in 96-Well-Platten (*ImageLock 96-well Plates*, *Essen BioScience*) ausgesät. Die Aussaatdichte wurde derart gewählt, dass die Zellen nach 48-stündiger Kultivierung mit einem Mediumwechsel nach 24 Stunden vollständige Konfluenz erreichten. Anschließend wurden die *Monolayer* aller 96 *Wells* mithilfe des *Woundmaker*[™] gleichzeitig durch einen *Scratch* von links nach rechts in der Mitte der *Wells* verwundet. Danach folgten ein Waschschrift mit PBS und die Zugabe von frischem Medium. Um den sukzessiven Verschluss der *Scratch*-Wunde zu verfolgen, wurde die *Well*-Platte in das *IncuCyte-Zoom*[®]-System gestellt. Hierbei handelt es sich um eine Vorrichtung, die die Mikroskopie von lebenden Zellen unter Kultivierungsbedingungen ermöglicht. Einzig für den Mediumwechsel 24 Stunden nach Verwundung musste die *Well*-Platte aus dem Brutschrank genommen werden. Die Steuerung von *IncuCyte-Zoom*[®] erfolgte über einen angeschlossenen Computer. Mithilfe der zum System gehörenden Software konnten die Versuchsparameter eingestellt werden. Der Wundheilungsfortschritt wurde über einen Zeitraum von 36 Stunden durch automatisierte Bildaufnahmen stündlich dokumentiert. Hierbei wurde pro *Well* eine durch den Hersteller fest definierte Position fotografiert, die zentral lokalisiert und für alle *Wells* der Platte identisch war.

3.1.7.3 Auswertung der *Scratch-Assays*

Die Auswertung der Bilder erfolgte bei beiden *Scratch-Assay*-Varianten unter Verwendung der Software *TScratch* (siehe Gebäck *et al.*, 2009 für nähere Informationen zur *Software*). Mithilfe dieser wurden Bereiche eines Gesichtsfeldes, die mit Zellen bewachsen waren, markiert, während das zellfreie Areal (*Scratch*-Fläche) ausgespart wurde. Auf der Grundlage dieser Einteilung berechnete die Software den prozentualen Anteil der *Scratch*-Fläche pro Gesichtsfeld.

Um beim klassischen *Scratch-Assay* die Größe der Wundfläche in mm² angeben zu können, wurde ein Längenmaßstab in der gleichen Auflösung fotografiert wie die *Scratch-Assay*-Bilder (1024 x 768 Pixel). Mithilfe eines Werkzeugs zur Längenmessung (*Software ImageJ*) konnte ermittelt werden, wie viele Pixel einem Millimeter entsprechen (1 mm = 372 Pixel). Da die Fläche eines Gesichtsfeldes mit 1024 x 768 Pixel bekannt war, konnte seine Größe in mm² berechnet werden (2,75 mm x 2,06 mm = 5,683 mm²). Über den prozentualen Anteil der *Scratch*-Größe am Gesichtsfeld, war es möglich, die Fläche der Wunde in mm² zu ermitteln. Aus den drei beziehungsweise vier fotografierten Gesichtsfeldern pro *Well* wurde ein Mittelwert

berechnet. Bei *Wells* mit gleicher Behandlung wurde wiederum ein Mittelwert aus den *Well*-Mittelwerten gebildet.

Beim *IncuCyte-Zoom*[®]-System betrug die Gesamtfläche eines Gesichtsfeldes gemäß der Angabe des Herstellers 4,424 mm² (2,34 mm x 1,92 mm). Analog zum klassischen *Scratch-Assay* wurde über den prozentualen Anteil der *Scratch*-Wunde am Gesichtsfeld seine Größe in mm² berechnet. Verschiedene Behandlungen wurden bei dieser *Scratch-Assay*-Variante in Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus den Einzelwerten wurde ein Mittelwert gebildet.

In der vorliegenden Arbeit werden die *Scratch-Assay*-Ergebnisse für beide Varianten zu jedem Detektionszeitpunkt als verheilte Wundfläche (in mm²) pro Gesichtsfeld angegeben.

3.1.8 Bestimmung der Proliferation humaner adulter Keratinozyten

Die Proliferation von adulten humanen Keratinozyten wurde unter Verwendung eines aus sechs Komponenten bestehenden ELISA-Kits der Firma *Roche* untersucht. Dieser *Assay* basiert auf dem kolorimetrischen Nachweis des Nukleosids Bromdesoxyuridin (BrdU), das anstelle von Desoxythymidin (dT) während der Synthese-Phase der Mitose in den DNA-Strang eingebaut wird.

Zunächst wurden die Zellen in einer Konzentration von 5000/100 µl K-SFM in 96-*Well*-Platten ausgebracht. Die mitotische Aktivität wurde zu 48, 54, 72 und 96 Stunden nach Zellaussaat bestimmt. Hierzu wurden 10 µl der BrdU-Lösung (Komponente 1, 1:100 in Medium) zu den 100 µl Medium in den *Wells* pipettiert. Eine zuvor definierte Auswahl von *Kontrollwells* wurde von diesem Schritt ausgenommen. Im Folgenden wurden die Zellen zusammen mit BrdU-Molekülen für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mithilfe des Absaugsystems *VACUSIP (Integra Biosciences)* abgenommen. Anschließend wurden 200 µl *FixDenat* (Komponente 2) pro *Well* hinzugegeben, um die Zellen zu fixieren und zu denaturieren. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgesaugt. Dann folgte die Herstellung einer Lösung mit Peroxidase-gekoppelten F(ab)-Fragmenten (Komponente 3) (1:100 in Komponente 4), die gegen BrdU gerichtet waren. Die *Well*-Platte wurde dann für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung abgenommen und die *Wells* dreimal mit 200 µl Waschpuffer (Komponente 5, 1:10 in *Aqua dest.*) gewaschen. Schließlich wurden 100 µl der Substratlösung (Komponente 6) hinzugegeben und für 7,5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 1 M H₂SO₄ abgestoppt. Innerhalb von 5 Minuten wurde die Extinktion bei 450 nm gegen einen Referenzfilter bei 650 nm gemessen. Der gemittelte Extinktionswert für das verwendete Keratinozytenmedium (Leerkontrolle) wurde von allen

übrigen Extinktionswerten subtrahiert. In einem zweiten Schritt wurde der Extinktionswert für *Wells*, auf die das *ELISA-Kit* vollständig angewendet wurde, um den Mittelwert der *Kontrollwells* (Assay-Durchführung ohne Zugabe von Komponente 1) bereinigt.

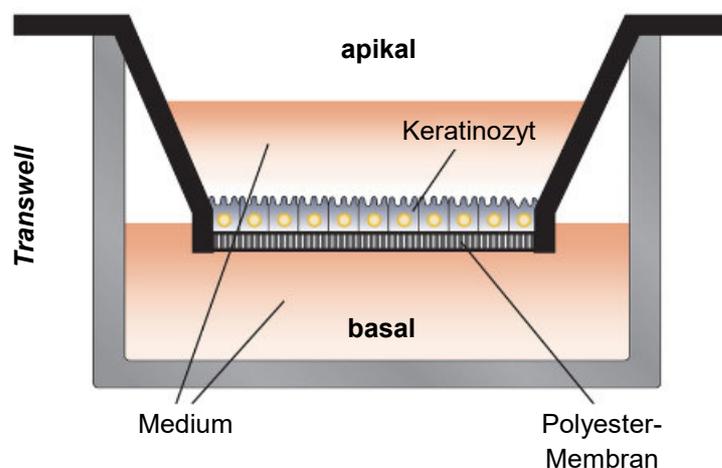
Um die Wirkung von TE und Betulin auf die Proliferation von humanen adulten Keratinozyten unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen zu analysieren, wurden die Zellen zunächst für 48 Stunden in Keratinozytenmedium mit normaler und erhöhter Glukosekonzentration präinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit TE und Betulin in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen für 6, 24 und 48 Stunden. Unmittelbar vor Stimulationsbeginn sowie jeweils nach Stimulationsende wurde die mitotische Aktivität der Zellen bestimmt.

3.1.9 Permeabilitätsanalysen an kultivierten humanen adulten Keratinozyten

3.1.9.1 Vorbereitung der Keratinozyten in *Transwells*

Um die Permeabilität von humanen adulten Keratinozyten zu untersuchen, wurden 70.000 Zellen in 200 μ l K-SFM-Medium auf die Polyester-Membran von *Transwell*[®]-Membraneinsätzen (Wachstumsfläche 0,33 cm², Porengröße 0,4 μ m) der Firma *Corning* ausgesät. Die Einsätze wurden in eine 24-*Well*-Platte eingehängt, deren Vertiefungen 1 ml des Keratinozytenmediums enthielten. Das resultierende *Transwell* besaß damit ein apikales und ein basales Kompartiment (**Abbildung 3.2**).

Abbildung 3.2: Schematische Darstellung eines *Transwells* mit Keratinozyten



Anschließend erfolgte eine 48-stündige Inkubation der Zellen bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Wenn die Keratinozyten vollständige Konfluenz erreicht hatten, wurde die Calcium-Konzentration des Mediums von 0,09 mM auf 1,8 mM erhöht (*Calcium-Switch*), um die Ausbildung von *Tight Junctions* zu induzieren (Pummi *et al.*, 2001; Brandner *et al.*, 2002, Kirschner *et al.*, 2013).

3.1.9.2 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER)

Die Messung des TER in Ω konnte entweder manuell oder automatisiert durchgeführt werden. In beiden Versuchsvarianten wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Manuelle TER-Messung mit Voltohmmeter der Firma Merck Millipore

Die manuelle Variante erfolgte ohne Veränderung des unter 3.1.9.1 beschriebenen Systems in 24-Well-Platten. Hierbei wurde der TER einmal täglich mit einem Volt-Ohmmeter bestimmt. Die Messelektrode wurde vor der Verwendung für 5 Minuten in 70 % Ethanol desinfiziert, kurz an der Luft getrocknet und anschließend für 5 Minuten in PBS äquilibriert. Zur Messung des TER wurde die 24-Well-Platte aus dem Brutschrank genommen und sofort mit der Messung begonnen. Der kurze Schenkel der Messelektrode wurde ohne Berührung der *Zellen* innerhalb des apikalen Kompartimentes platziert, während der lange Schenkel bis auf den Boden der Well-Platte im basalen Kompartiment reichte. Ein *Transwell* ohne Zellen und Medium wurde als Leerkontrolle mitgeführt. Sein TER-Wert wurde von den Werten der übrigen *Transwells* subtrahiert. Um den TER in Abhängigkeit von der mit Zellen bewachsenen Filterfläche angeben zu können, musste der gemessene Wert in Ω mit 0,33 cm² multipliziert werden.

Automatische TER-Messung mit dem *CellZscope*[®]-System der Firma *NanoAnalytics*

Für die automatisierte Messung des TER wurden die *Transwell*-Einsätze in das *CellZscope*[®]-System (*NanoAnalytics*) überführt. Das Volumen des Kulturmediums in den Vertiefungen des Zellmoduls betrug 810 μ l, auf die Filter des *Transwell*-Einsatzes wurden 260 μ l K-SFM gegeben. Die automatische Messung des TER erfolgte für jedes der *Transwells* alle 2 Stunden über einen Frequenzbereich von 3 mHz bis 3 kHz. Einmalig für die Analyse bei gleichzeitiger Inhibition von Insulin- und IGF-*I*-Rezeptor wurde ein veränderter Frequenzbereich von 1 Hz bis 100 kHz gewählt, um eine stündliche TER-Messung gewährleisten zu können. Für den Mediumwechsel wurde das Zellmodul vom externen *Controller* getrennt, aus dem Brutschrank genommen und unter die sterile Werkbank gebracht. Die Berechnung des gemessenen TER-Wertes in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ erfolgte automatisch durch die Software des *CellZscope*[®]-System.

Unabhängig von der Versuchsvariante wurde das Medium täglich gewechselt. Einzig bei der Analyse zu den Auswirkungen von hyperglykämischen Bedingungen auf den TER von adulten, nicht-diabetischen Keratinozyten erfolgte von Tag 1 bis Tag 6 nach *Calcium-Switch* täglich ein Mediumwechsel, anschließend wurde dann dazu übergegangen, nur noch alle zwei Tage das Medium zu wechseln.

3.1.9.3 Bestimmung der Permeabilität von FD-4 und FD-40 an Primärkulturen von humanen adulten Keratinozyten

Die Analyse zur Permeation von FD-4 und FD-40 humaner adulter Keratinozyten wurde einmal täglich bis einschließlich Tag 8 nach dem *Calcium-Switch* durchgeführt. Hierzu wurden den 200 µl Medium im apikalen Bereich des *Transwells* 10 µl einer FD-4- oder einer FD-40-Stocklösung (25 mg/ml in *Aqua dest.*) zugesetzt und durch leichtes Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % wurde das basale Medium jeder Vertiefung in ein separates 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das apikale Medium hingegen wurde verworfen. Sowohl der apikale als auch der basale Bereich des *Transwells* mussten danach mit PBS gewaschen werden, um Rückstände von FITC-Dextranen zu entfernen. Im Anschluss wurde frisches Medium in den apikalen (200 µl) und basalen Bereich (1 ml) des *Transwells* pipettiert. Die Zellen wurden schließlich zurück in den CO₂-Inkubator gestellt. Bis zur Messung der Fluoreszenzintensität wurde das täglich gesammelte Medium bei -20 °C im Dunkeln gelagert.

Für die Messung der Fluoreszenzintensität wurden jeweils 100 µl des basalen Mediums in die Vertiefung einer schwarzen 96-Well-Platte mit flachem Boden (*Thermo Fisher Scientific*) überführt. Um die Konzentration der FITC-Dextran-Moleküle berechnen zu können, wurden auf jeder 96-Well-Platte die Verdünnungen einer Standardreihe pipettiert. Die höchste Konzentration dieser Standardreihe (25 µg/ml) wurde durch 1:1000-Verdünnung der FD-4- und FD-40-Stocklösungen (25 mg/ml) hergestellt. Alle weiteren sechs Verdünnungen waren 1:2-Verdünnungen der jeweils vorhergehenden. Weiterhin wurde FD-freies Medium als Leerkontrolle berücksichtigt. Die Analyse der gesammelten Proben, der Standardverdünnungen und des Leerwertes erfolgte in Dreifachbestimmung. Die Messung der Fluoreszenzintensität mithilfe des Fluorometers *Infinite M200* der Firma *Tecan* wurde bei den in **Tabelle 3.1** aufgeführten Parametereinstellungen durchgeführt.

Tabelle 3.1: Parametereinstellungen zur Messung der Fluoreszenzintensität von FD-4 und FD-40

Parameter	Parametereinstellung
Exzitationswellenlänge	485 nm
Emissionswellenlänge	535 nm
Verstärkung	50 Manuell
Anzahl der Blitze	4
Integrationszeit	20 µs
Messmodus	Oben
Label	1

Aus den Messwerten für die Verdünnungen der Standardreihe wurde eine Regressionsgerade ermittelt, deren Gleichung zur Errechnung der Konzentration von FD-4 und FD-40 in µg/ml in den analysierten Proben dient. Der Permeabilitätskoeffizient (P) zur Beurteilung der Durchlässigkeit humaner Keratinozyten für die untersuchten FITC-Dextran-Moleküle wurde schließlich mithilfe der unten stehenden **Formel 3.1** bestimmt. Je größer der Wert für P, desto durchlässiger sind die Zellen für die permeierende Substanz.

$$P (10^{-6} \text{ cm s}^{-1}) = \frac{\text{Permeationsfluss des FD-Moleküls } \left[\frac{\text{nmol}}{\text{h} \cdot \text{s}^2} \right]}{\text{Ausgangskonzentration des FD-Moleküls } [\text{kDa}] \cdot 3,6} \quad (3.1)$$

$$P (10^{-6} \text{ cm s}^{-1}) = \frac{\left(\frac{\text{Probenkonzentration } \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right]}{\text{Größe des Tracermoleküls } [\text{kDa}]} \div 2 \text{ h} \right) \div \text{Insertfläche } [\text{cm}^2]}{\text{Ausgangskonzentration des FD-Moleküls } \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] \cdot 3,6} \quad (3.1)$$

3.2 Gewebekultur

3.2.1 Herstellung und Kultivierung von porcinen *Ex-vivo*-Modellen

Kulturmedium

angesetzt in DMEM

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

Vor der Präparation des Schweineohrs wurden die Vertiefungen einer 12-Well-Platte mit 1 cm² großen Fragmenten steriler Mullbinde ausgelegt. Anschließend wurde ein geeignetes Volumen des Kulturmediums hinzugegeben, so dass die Fragmente Mullbinde exakt bedeckt waren. Bis

zur weiteren Verwendung wurde die 12-Well-Platte zum Aufwärmen in den CO₂-Inkubator bei 37 °C gestellt.

Das Schweineohr wurde zunächst unter fließendem Wasser gewaschen. Danach wurden mit einer Schere die Haare entfernt. Dann erfolgte die Desinfektion des Ohres durch Aufsprühen von *Sterilium*[®]. Das Schweineohr wurde danach in eine Metallnierenschale überführt und seine Innenfläche mit steriler doppellagiger Mullbinde ausgelegt. Letztere wurde daraufhin mit *Sterilium*[®] getränkt. Daran schloss sich eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur an. Danach wurde das Schweineohr mit steriler isotonischer Kochsalzlösung abgespült. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Im Folgenden wurden Biopsien mit einem Durchmesser von 6 mm entlang der *Plicae* des Ohres entnommen. Hierzu wurde die Stanze zunächst in das Hautgewebe hineingedreht. Die Biopsie wurde danach mit einer Pinzette hochgezogen, im oberen Bereich des subkutanen Fettes abgetrennt und zunächst in eine mit Kulturmedium befüllte Petrischale überführt. Die weitere Präparation der Stanzbiopsien erfolgte auf sterilen Objektträgern, indem noch verbliebenes subkutanes Fett entfernt sowie die Haare weiter gekürzt wurden. Schließlich wurde das unverwundete *Ex-vivo*-Modell in die 12-Well-Platte mittig auf die Mullbinde gesetzt, so dass die Dermis mit Medium umspült wurde, die Epidermis hingegen der Luft exponiert war. Diese Art der Kultivierung wird als *Air-Liquid Interface* (ALI) bezeichnet und dient der Simulation einer normalen Hautumgebung. Anschließend wurden die *Ex-vivo*-Modelle zur Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in den Brutschrank gestellt.

3.2.2 Verwundung der *Ex-vivo*-Modelle

Für die Verwundung der *Ex-vivo*-Modelle wurde eine 3-mm-Stanze auf die 6-mm-Biopsie aufgesetzt, letztere mithilfe einer Pinzette fixiert und die 3-mm-Stanze vorsichtig bis in die obere Dermis hineingedreht. Der ausgestanzte Bereich wurde dann unter Verwendung eines sterilen Skalpell entfernt. Danach wurde das Wundheilungsmodell wie die unverwundete *Ex-vivo*-Biopsie in einer 12-Well-Platte bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.2.3 Das diabetische *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell

Die porcinen Hautstanzen wurden gemäß 3.2.1 aus einem Schweineohr gewonnen und präpariert. Ihre Verwundung erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben. Die Inkubation der Stanzbiopsien wurde in DMEM unter euglykämischen im Vergleich zu hyperglykämischen und hyperosmolaren Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Schließlich wurden die Stanzen bis zur weiteren Bearbeitung kryokonserviert (**siehe 3.2.5**).

3.2.4 Applikation von Substanzen in die Wunde der *Ex-vivo*-Modelle

Das *Ex-vivo*-Modell wurde verwendet, um die Auswirkungen von Substanzen auf die Wundheilung zu untersuchen. Die Applikation der Substanzen erfolgte hierbei unmittelbar nach Verwundung der Modelle direkt in die Wunde. Sowohl für Oleogele und Wasser-in-Öl-Emulsionen als auch für gelöste Stoffe wurde ein Volumen von 5 µl dazugegeben. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % gesättigter Luftfeuchtigkeit wurde die Wundheilung durch Schockfrieren der Modelle abgestoppt (**siehe 3.2.5**). Anschließend wurden nach **3.3.1** Kryoschnitte aus der Mitte der Wunde angefertigt. Die Schnitte wurden dann HE-gefärbt (**siehe 3.3.3**) und schließlich gemäß **3.2.6** ausgewertet.

3.2.5 Kryokonservierung von porcinem und humanem Hautgewebe

Zunächst wurde ein kleines Plastikgefäß zur Hälfte mit Isopentan befüllt, das anschließend in Flüssigstickstoff abgekühlt wurde. Eine Stanzbiopsie wurde anschließend in das kalte Isopentan überführt, unabhängig davon, ob sie zuvor kultiviert oder unmittelbar einem Hautgewebe entnommen wurde. Danach wurde das Plastikgefäß mit der Biopsie erneut im Flüssigstickstoff abgekühlt. Das schockgefrorene Gewebe wurde schließlich in ein vorbereitetes Kryogefäß gegeben. Die Lagerung des Gewebes erfolgte bei -80 °C.

3.2.6 Auswertung der *Ex-vivo*-Wundheilungsmodelle

Als Maßstab für die Bewertung der Wundheilungsmodelle wurde die Länge der regenerierenden Epidermis herangezogen. Hämatoxylin/Eosin-gefärbte Kryoschnitte wurden zunächst mit dem Lichtmikroskop betrachtet. Da pro *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell mehrere Kryoschnitte auf einem Objektträger vorhanden waren, wurde zur Auswertung ein geeigneter Schnitt ausgewählt, bei dem die regenerierten Wundzungen eindeutig auszumessen waren. Eine längere Epidermis entsprach hierbei einer größeren Wundheilungskapazität und umgekehrt. Mithilfe der *Software Openlab 5.0.2* wurde die linke und rechte regenerierte Wundzunge eines Wundheilungsmodells in µm ausgemessen (**Abbildung 3.3**). Unter der Voraussetzung, dass beide Wundzungen für die Auswertung berücksichtigt werden konnten, wurde der Mittelwert berechnet. Wenn sich in der Nähe des Wundrandes oder am Wundrand ein Haarfollikel befand, ging die regenerierte Wundzunge auf der betroffenen Seite nicht in die Auswertung ein, da nachgewiesen wurde, dass Haarfollikel die Wundheilung beeinflussen (Ito und Cotsarelis, 2008). War ein Haarfollikel in der Wundregion lokalisiert, wurden beide Wundzungen von der Auswertung ausgenommen. Damit konnten für einzelne

Wundheilungsmodelle entweder zwei, eine oder keine Wundzunge berücksichtigt werden. Bei Doppel- oder Mehrfachbestimmungen wurde aus den Mittelwerten aller Modelle mit derselben Behandlung wiederum ein Mittelwert gebildet.

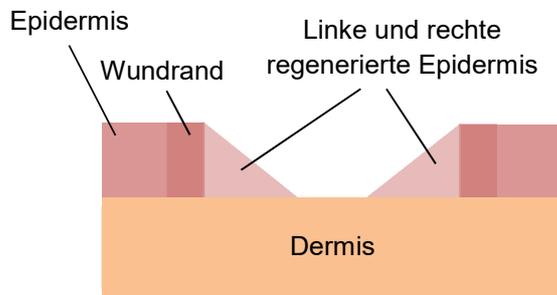


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung eines *Ex-vivo*-Wundheilungsmodells mit Dermis, regenerierter Epidermis, Wundrand und der dahinter liegenden Epidermis.

3.2.7 Kryokonservierung von humanem und porcinem Gewebe zur Analyse mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop

Stanzbiopsien mit einem Durchmesser von 6 mm wurden unmittelbar nach ihrer Entnahme aus dem Hautgewebe zügig von sukutanem Fett und oberflächlichen Haaren befreit. Danach wurde die Biopsie in einen Kryostaten eingebracht, der eine Kammertemperatur von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufwies. In diesem wurde die Biopsie mit der Epidermis nach oben gerichtet auf einen vorgekühlten Objektträger zwischen zwei Parafilmblättern gestellt. Dann wurde das hängende Gewicht eines Metallstempels, der ebenfalls bereits die Temperatur der Kryostatkammer besaß, auf die Biopsie aufgesetzt und für 3 Minuten damit beschwert und so die Biopsie plan gemacht. Anschließend wurde das Gewicht angehoben und die plane Biopsie unmittelbar in ein Plastikgefäß mit kaltem Isopentan gegeben. Das Plastikgefäß mit der Biopsie wurde danach in Flüssigstickstoff weiter heruntergekühlt. Schließlich wurde die Biopsie in ein vorbereitetes *Cryoprotect*-Röhrchen überführt, das dann in ein *Dewar*-Gefäß mit Flüssigstickstoff gegeben wurde. Die Lagerung des Gewebes erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Histologische Methoden

3.3.1 Anfertigung von vertikalen Kryoschnitten

Die Anfertigung von Kryoschnitten erfolgte unter Verwendung des Kryostaten *CM 3050* von *Leica*. Für Hautgewebe eignete sich eine Objektstichtemperatur von $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Schnittdicke wurde auf $6\text{ }\mu\text{m}$ festgelegt. Die Biopsie wurde in Gefriereinbettmedium auf die Objektplatte gesetzt und ausgerichtet. Um Vertikalschnitte des Gewebes generieren zu können, musste das Gewebe auf der Seite liegend aufgelegt werden. Die Objektplatte wurde in eine Bohrung der Schnellgefrierleiste eingesetzt und die Biopsie vollständig mit Gefriereinbettmedium bedeckt. Die Schnitte wurden direkt mit einem Superfrost/Plus-Objektträger aufgenommen. Danach wurden die Kryoschnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die getrockneten Gewebeschnitte wurden schließlich entweder HE-gefärbt (**siehe 3.3.3**) oder zur Durchführung einer immunhistochemischen Färbung in Aceton oder Ethanol fixiert (**siehe 3.3.4**). Um die Schnittebene beziehungsweise die Qualität des Schnittes zu überprüfen, wurde eine Methylenblaufärbung durchgeführt. Hierfür wurden unbeschichtete Objektträger mit probeweise aufgenommenen Kryoschnitten zunächst 10 s in eine Methylenblaulösung und anschließend zum Abspülen überschüssiger Farbe zweimal in *Aqua dest.* eingetaucht. Schließlich erfolgte die Betrachtung unter dem Lichtmikroskop.

3.3.2 Anfertigung von horizontalen Kryoschnitten für die Analyse mit dem 2-Photonen-Mikroskop

Die Anfertigung von Kryoschnitten für die Analyse mit dem 2-Photonen-Mikroskop wurde analog zu **3.3.1** unter Verwendung des Kryostaten *CM 3050* von *Leica* durchgeführt. Allerdings wurde die Schnittdicke auf den Maximalwert von $60\text{ }\mu\text{m}$ festgelegt. Darüber hinaus war die Schnittebene im Gegensatz zu **3.3.1** nicht vertikal sondern horizontal, das heißt parallel zur Hautoberfläche. Der auf einen Objektträger aufgenommene Schnitt wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in Aceton fixiert (**siehe 3.3.4**), in *Fluoromount-GTM* eingebettet und schließlich dauerhaft bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3.3 HE-Färbung (Hämalaun nach Mayer/Eosin)

Zu Beginn der Färbung wurden die Objektträger für 8 Minuten in eine filtrierte Hämatoxylinlösung überführt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gewaschen (Bläuen). Nachdem das Trägergestell mit den Objektträgern dreimal in eine Küvette mit *Aqua dest.* getaucht wurde, erfolgte die Färbung in

0,5 % Eosin + Eisessig (10 µl) für 30 Sekunden. Danach wurde das Trägergestell wiederum dreimal in *Aqua dest.* getaucht. Zur Dehydrierung der Gewebeschnitte fand eine aufsteigende Ethanolreihe Verwendung. Dabei wurden die Objektträger sukzessive in 70 %, 80 %, 96 % und 99 % Ethanol (1 % vergällt) dreimal kurz eingetaucht. Die Entwässerung endete mit einer 5-minütigen Inkubation in vergälltem 99 % Ethanol. Danach wurde den Gewebeschnitten das Ethanol durch zweimalige Inkubation in Xylol für jeweils 10 Minuten wieder entzogen. Schließlich wurde auf ein Deckglas etwas Eukitt® gegeben und dieses umgekehrt auf den gefärbten Schnitt luftblasenfrei aufgebracht. Bis zum Durchhärten des Eukitt® wurden die Objektträger trocknen gelassen.

3.3.4 Fixierung von Gewebeschnitten

Die immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten (**siehe 3.3.5**) erforderte in Abhängigkeit von dem verwendeten Primärantikörper unterschiedliche Fixierungen der Kryoschnitte. Zum einen wurden Kryoschnitte in -20 °C kaltem Aceton für 10 Minuten fixiert. Die alternative Fixierung erfolgte für 30 Minuten in Ethanol bei 4 °C mit anschließender Inkubation für 1 Minute in Aceton bei Raumtemperatur. Nach der Fixierung wurden die Objektträger mindestens fünf Minuten trocknen gelassen und schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C verpackt gelagert.

3.3.5 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von kryokonserviertem Gewebe

PBS-Puffer, pH 7,4

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM

Einstellen des pH-Wertes mit 1 M HCl

Der Objektträger mit fixierten Kryoschnitten wurde dem -80 °C-Gefrierschrank entnommen und zum Auftauen der Kryoschnitte in eine feuchte Kammer gelegt. Im Folgenden wurden die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger mit einem *Pap Pen* umrandet, um eine wasserabweisende Barriere zu schaffen. Anschließend erfolgte die Blockierung freier unspezifischer Bindungsstellen auf dem Kryoschnitt. Für jeden Antikörper (AK) wurde hierzu ein spezifisches Protokoll (**siehe Kapitel 2: Tabelle 2.8**) angewandt. Dann wurde die Primärantikörperlösung durch individuelle Verdünnung (**siehe Kapitel 2: Tabelle 2.8**) des jeweiligen

Antikörpers in PBS hergestellt. Die Verdünnungen waren in Vorversuchen so austitriert worden, dass sich die Färbung nicht im Sättigungsbereich befand. Parallel dazu wurde für jeden Primärantikörper eine Negativkontrolle (NK) durchgeführt. Bei der Negativkontrolle handelte es sich um einen Isotyp-Antikörper, der die gleiche Antikörperklasse wie der Primärantikörper aufwies, jedoch Antigen-unspezifisch war. Die Verdünnung der Negativkontrolle (NK) wurde gemäß der **Formel 3.2** berechnet und ebenfalls in PBS verdünnt.

$$\text{Verdünnung}_{\text{NK}} = \frac{\text{Konzentration}_{\text{NK}} \cdot \text{Verdünnung}_{\text{Primär-AK}}}{\text{Konzentration}_{\text{Primär-AK}}} \quad (3.2)$$

Sowohl die Primärantikörperlösung als auch die der Negativkontrolle wurden vor Verwendung für 1 Minute bei 15.115 x g zentrifugiert. Anschließend wurde jeweils nur der Überstand auf die Schnitte aufgetragen. In Abhängigkeit von der Größe des Kryoschnittes wurden 30 bis 80 µl der Antikörperlösungen auf den Kryoschnitt aufgetragen. Schließlich wurde in abgedeckter Färbeschale, deren Boden mit *Aqua dest.* befüllt worden war, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Antikörperlösungen vom Objektträger abgeklopft und die Kryoschnitte in PBS gespült – zunächst einmal für 5 Minuten und danach zweimal für 10 Minuten. Zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Reaktion fanden Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper Verwendung. Letztere wurden derart gewählt, dass sie gegen die Spezies gerichtet waren, in der der Primärantikörper generiert worden war. Sekundärantikörper, die an Primärantikörper aus den Spezies Kaninchen und Maus banden, wurden 1:5000 in PBS verdünnt. Für solche, die gegen die Spezies Ziege gerichtet waren, wurde eine Verdünnung von 1:2500 angesetzt. Die Sekundärantikörperlösung wurde vor Verwendung für 1 Minute bei 15.115 x g zentrifugiert. Anschließend wurde jeweils nur der Überstand auf die Schnitte aufgetragen. Das auf den Kryoschnitt pipettierte Volumen der Sekundärantikörperlösung entsprach jenem der aufgetragenen Primärantikörperlösung bzw. der Isotypantikörperlösung. Die Inkubation des Sekundärantikörpers wurde in abgedeckter Kammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Dann wurden die Antikörperlösungen vom Objektträger abgeklopft und die Kryoschnitte einmal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Anfärbung der Zellkerne, indem die Kryoschnitte für 1 Minute in abgedunkelter DAPI-Färbelösung (1:5000 in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Im Folgenden wurden die Kryoschnitte zuerst zweimal für 5 Minuten in PBS, danach zweimal für 3 Minuten in *Aqua dest.* gewaschen. Schließlich wurden die Kryoschnitte in *Fluoromount-GTM* eingebettet. Anschließend wurden die immunhistochemischen Färbungen unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops mikroskopiert und mit einer Hamamatsu-Kamera fotografiert.

3.3.5.1 Auswertung der Intensität und Lokalisation der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung von kryokonserviertem Gewebe

Die Proteinexpression und -lokalisierung der ausgewählten TJ-Komponenten bzw. Filaggrin in humaner Haut wurde mithilfe immunhistochemischer Färbungen an Kryoschnitten von 6 µm Dicke untersucht. Unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops *Axioplan 2* der Firma *Zeiss* konnten die markierten Strukturen visualisiert werden. Anschließend wurden für jede Färbung repräsentative Ausschnitte fotografiert, die die Fluoreszenzintensität über den gesamten Gewebeschnitt hinweg widerspiegeln. Pro Gewebeschnitt wurden mindestens drei Bereiche fotografiert, im Allgemeinen ergab sich die Anzahl aber aus der Größe der Biopsie. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erfolgte unter Verwendung der *Software ImageJ*. Hierzu wurden gemäß **Abbildung 3.4** in jedes der aufgenommenen Bilder jeweils fünf rechteckige *regions of interest* (ROIs) definierter Größe gleichmäßig im *Stratum granulosum* und - falls das jeweilige Protein dort exprimiert wurde - auch im oberen und unteren *Stratum spinosum* sowie im *Stratum basale* verteilt. Der Mittelwert der ROIs lieferte für die jeweilige Epidermisschicht Informationen über die Immunintensität der Proteine in der gesamten Zelle, das heißt im Zytoplasma und in der Plasmamembran. In Anbetracht der Lokalisation funktionaler *Tight Junctions* an den Zell-Zell-Grenzen war der Umfang ihrer Expression in der Plasmamembran von besonderem Interesse. Daher wurden zusätzlich fünf quadratische ROIs eingefügt, deren Fläche nur den zytoplasmatischen Bereich eines Keratinozyten umfasste. Ihr Mittelwert wurde danach von der Fluoreszenzintensität der Gesamtzelle subtrahiert, um das Ergebnis für die Expression der TJ-Proteine in der Plasmamembran zu erhalten. Hierbei entsprachen die quadratischen ROIs im oberen Bereich der Epidermis der Immunintensität zytoplasmatischer TJ-Proteine im *Stratum granulosum* und im oberen *Stratum spinosum*, während die unteren quadratischen ROIs den Umfang der TJ-Proteine im Zytoplasma epidermaler Basalzellen und von Keratinozyten des unteren *Stratum spinosum* wiedergaben. Zwei weitere ROIs außerhalb des Gewebes dienten zur Bestimmung des allgemeinen Bildhintergrundes.

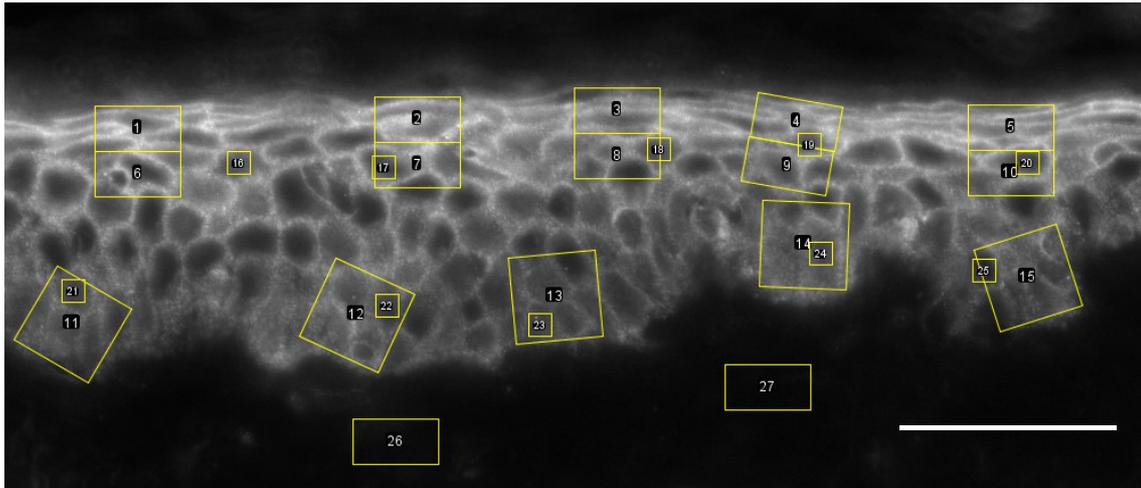


Abbildung 3.4: Verteilung der *regions of interest* (ROIs) in humaner Epidermis. ROIs zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität für die Gesamtzelle im *Stratum granulosum* (1-5), im oberen *Stratum spinosum* (6-10) mit einer Fläche von jeweils $19,94 \times 10,64 \mu\text{m}$ sowie im unteren *Stratum spinosum* und *Stratum basale* (11-15) mit einer Fläche von $19,94 \times 19,94 \mu\text{m}$. Die kleinen ROIs ($5,32 \times 5,32 \mu\text{m}$) dienen zur Berechnung der zytoplasmatischen Fluoreszenzintensität im *Stratum granulosum* und im oberen *Stratum spinosum* (16-20) sowie im unteren *Stratum spinosum* und im *Stratum basale* (21-25). Zwei ROIs mit einer Fläche von $19,94 \times 10,64 \mu\text{m}$ dienen zur Bestimmung des Bildhintergrundes. Längsbalken = $50 \mu\text{m}$.

3.3.6 Zwei-Photonen-Mikroskopie

3.3.6.1 Das Prinzip der Zwei-Photonen-Mikroskopie

Bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie erfolgt die Anregung des Fluorophors durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen, die im Gegensatz zu einem anregenden Photon bei der Einzelphotonen-Mikroskopie die halbe Energie beziehungsweise die doppelte Wellenlänge aufweisen (**Abbildung 3.5**).



Abbildung 3.5: Jablonski-Diagramme. Energieniveaus eines Fluorophors bei Einzelphotonen-Anregung (links) und Zwei-Photonen-Anregung (rechts). Die Farben der Pfeile entsprechen den absorbierten und emittierten Wellenlängen. S_0 , energetischer Grundzustand des Fluorophors, S_1 , angeregter Zustand des Fluorophors.

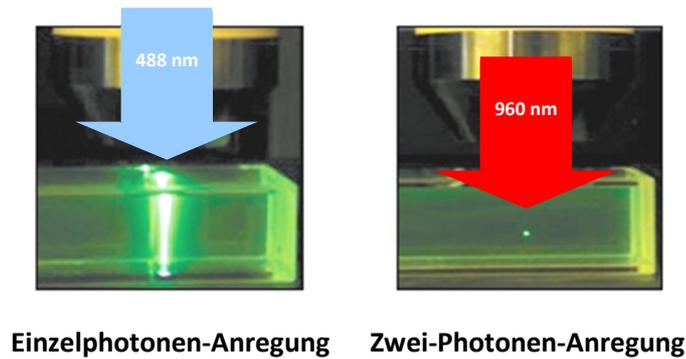


Abbildung 3.6 Lokalisierung der Fluoreszenzanregung bei der Einzel- gegenüber der Zwei-Photonen-Anregung. Mit der konventionellen Einzelphotonen-Anregung erfolgt die Fluoreszenzanregung durch den kompletten Strahlengang. Dies resultiert in der Fluoreszenzemission ober- und unterhalb der Fokusebene. Bei der Zwei-Photonen-Anregung beschränkt sich die Emission auf den Brennpunkt (Abbildung modifiziert nach Stutzmann und Parker, 2005).

Für die Produktion der Photonen kommt meist ein Titan:Saphir-Laser zur Anwendung, der in der Lage ist, Anregungswellenlängen zwischen 670–1070 nm zu generieren. Nachdem Photonen mit der gewünschten Wellenlänge durch den Laser erzeugt worden sind, durchlaufen sie zunächst einen Prisma-basierten *pre-chirp compensator*, um die Laserpulslänge von ungefähr 100 fs in der Objektebene zu halten. Anschließend wurden sie über ein Objektiv auf die zu messende Probe fokussiert. Im Gegensatz zur Einzelphotonen-Mikroskopie erfolgt die Fluoreszenzanregung bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie ausschließlich im Brennpunkt (**Abbildung 3.6**). Dies ist auf die quadratische Beziehung zwischen Anregungsintensität und Fluoreszenzemission zurückzuführen.

Um die erforderlichen hohen Lichtintensitäten bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie zu ermöglichen, werden die Photonen in Form extrem kurzer Pulse (100 fs) bei hoher Repetitionsrate (typischerweise ~80 MHz) erzeugt (**Abbildung 3.7**). Auf diese Weise wird eine sehr hohe augenblickliche Energie, aber eine geringe Durchschnittsenergie bereitgestellt. Die Anregungsphotonen werden nach Interaktion mit dem Probenmaterial von diesem emittiert und durchlaufen anschließend austauschbare (Silber-)Spiegel und Bandpassfilter, bevor sie von Photoelektronenvervielfachern entweder in Vorwärts- und/oder in Rückwärtsrichtung detektiert werden.

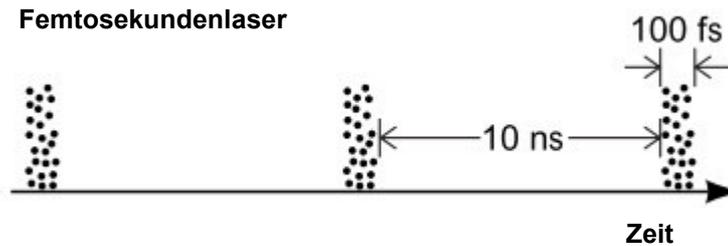


Abbildung 3.7 Zeitliche Kompression von Photonen während der Femtosekunden-Pulse. Die zeitliche Kompression von Photonen in 100-fs-Pakete ermöglicht die hohe augenblickliche Energie, die für die Multiphotonen-Anregung benötigt wird (Abbildung nach Stutzmann und Parker, 2005).

3.3.6.2 Messung des *Second-Harmonic-Generation* (SHG)-Signals von Kollagenfasern und der Autofluoreszenz von Elastinfasern in der Dermis humaner und porciner Haut

Die Zweiphotonenmikroskopie wurde verwendet, um Kollagen- und Elastinfasern in humaner und porciner Haut zu visualisieren. Kollagenfasern können mithilfe von Kurzpulslasern hochauflösend dargestellt werden, da sie aufgrund ihrer nicht-zentrosymmetrischen Struktur zur Erzeugung eines *Second-Harmonic-Generation* (SHG)-Signals fähig sind. Im Fall von Elastinfasern wird die Fähigkeit zur Emission von Fluoreszenzlicht nach Anregung mit Laserlicht ausgenutzt.

Von den zu analysierenden, plan eingefrorenen Hautstanzen (Durchmesser: 6 mm) wurden 60 μm dicke Horizontalschnitte ausgehend von der Hautoberfläche angefertigt, die bis in die tiefe Dermis reichten. Nachdem die Schnitte luftgetrocknet und in Aceton fixiert worden waren, wurden sie in Fluoromount-GTM eingebettet und mit einem Deckgläschen versiegelt. Die mikroskopische Untersuchung wurde für alle Schnitttiefen durchgeführt. Die Parameter für die mikroskopische Messung konnten mithilfe der *Software Inspector 472 Pro* gesteuert werden. Zunächst wurde durch lichtmikroskopische Untersuchung ein Areal ausgewählt, das möglichst wenig Haarfollikel, Drüsen und Blutgefäße enthielt. Ohne die Position des Areals zu verändern, zog man acht weitere Felder der gleichen Fläche um das Ausgangsquadrat (150 x 150 μm) herum und generierte damit ein Mosaikfeld bestehend aus 3 x 3 gleichen Einzelfeldern (**Abbildung 3.8**). Die Überlappung der einzelnen Felder betrug 5%. Darüber hinaus wurden bezüglich der z-Achse der Start- und Endpunkt der Messung, die durch die Dicke der Kryoschnitte vorgegeben waren, sowie die Schrittweite auf 1,5 μm festgelegt. Schließlich wurden die Parameter zur Bestimmung der *dwell time* eingestellt.

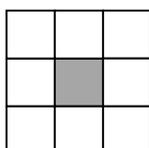


Abbildung 3.8 Mosaikfeld bestehend aus neun gleich großen Einzelfeldern mit dem Ausgangsquadrat in grau.

Die mikroskopische Messung des SHG-Signals von Kollagenfasern erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 840 nm. Für die Detektion in Vorwärtsrichtung durchliefen die von der Probe emittierten Photonen zunächst einen dichroitischen Filter, der Wellenlängen unterhalb von 555 nm in Richtung auf den folgenden Bandpassfilter ablenkte. Letzterer ließ ausschließlich Wellenlängen zwischen 387 und 447 nm hindurch. Das den Bandpassfilter passierende Licht wurde von zwei Photoelektronenvervielfachern detektiert.

Die Detektion des SHG-Signals wurde darüber hinaus in Rückwärtsrichtung durchgeführt, um zusätzliche Informationen über die Kollagenfasern in dem jeweiligen Kryoschnitt zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde dem Bandpassfilter zunächst ein Silberspiegel vorgeschaltet, der die von der Probe gestreuten Photonen vollständig durchließ und auf den folgenden Bandpassfilter umleitete. Dieser besaß ein Passband von 419,5 nm bis 474,5 nm; das heißt, dass keine Wellenlängen ober- und unterhalb dieses Spektralbereichs durchgelassen wurden, um nicht von den sich anschließenden Photoelektronenvervielfachern detektiert zu werden.

Die mikroskopische Messung der Autofluoreszenz von Elastinfasern erforderte eine Anregungswellenlänge von 770 nm. Die Detektion der emittierten Photonen erfolgte in Rückwärtsrichtung unter Verwendung des gleichen Silberspiegels und des gleichen Bandpassfilters wie für das SHG-Signal der Kollagenfasern.

Nach der mikroskopischen Messung wurden die jeweils neun Bilderstapel mithilfe der *Software ImageJ* mosaikartig zu einem zusammengefügt. Die Auswertung des humanen Gewebes umfasste drei Schnitttiefen, die vom oberen bis ins mittlere *Stratum reticulare* reichten. Als oberste Schnitttiefe wurde diejenige gewählt, bei der keine epidermalen Reteleisten-Strukturen mehr vorhanden waren. Ausgehend von dieser Schnitttiefe wurden ebenfalls die beiden nachfolgenden ausgewertet. Für porcine Biopsien wurde ausschließlich eine Schnitttiefe von 240 bis 300 μm ausgewertet, da hier die Anzahl der getesteten Individuen deutlich höher war. Die Auswertung der Bilderstapel erfolgte unter Anwendung des *ImageJ*-Erweiterungs-*Plugins Directionality*. Hierbei wurden verschiedene Orientierungen von Kollagen- und Elastinfasern jeweils einem Winkel zugeordnet (exemplarisch dargestellt in **Abbildung 3.9 B**) und als relative Anteile über einen Bereich -90° bis 88° (in Zweierschritten) angegeben. Anschließend wurden gleichwertige positive und negative Winkel zusammengefasst, weil diese durch Drehung der Stenzen ineinander überführt werden können (**Abbildung 3.9 C**). Die Winkel 0° und 90° mussten von der Betrachtung ausgenommen werden, da hier jeweils nur ein Wert vorlag.

Eine alternative Darstellung der Ergebnisse (**Abbildung 3.9 D**) wurde in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet, um die Variabilität der Orientierungen von Kollagen- und Elastinfasern in humaner diabetischer Haut mit der in gesundem Kontrollgewebe vergleichen zu können. Hierzu wurden die Ergebnisse aller mikroskopierten Schnittebenen von humanen diabetischen und nicht-diabetischen Hautbiopsien (**siehe Kapitel 2: Tabelle 2.14**) analog zu **Abbildung 3.9 D** aufbereitet. Für die sich ergebenden Kurvenverläufe wurden jeweils die AUCs (*areas under the*

curve) berechnet, die als Datengrundlage für den statistischen Test auf Homogenität der Varianzen nach *Levene* dienen.

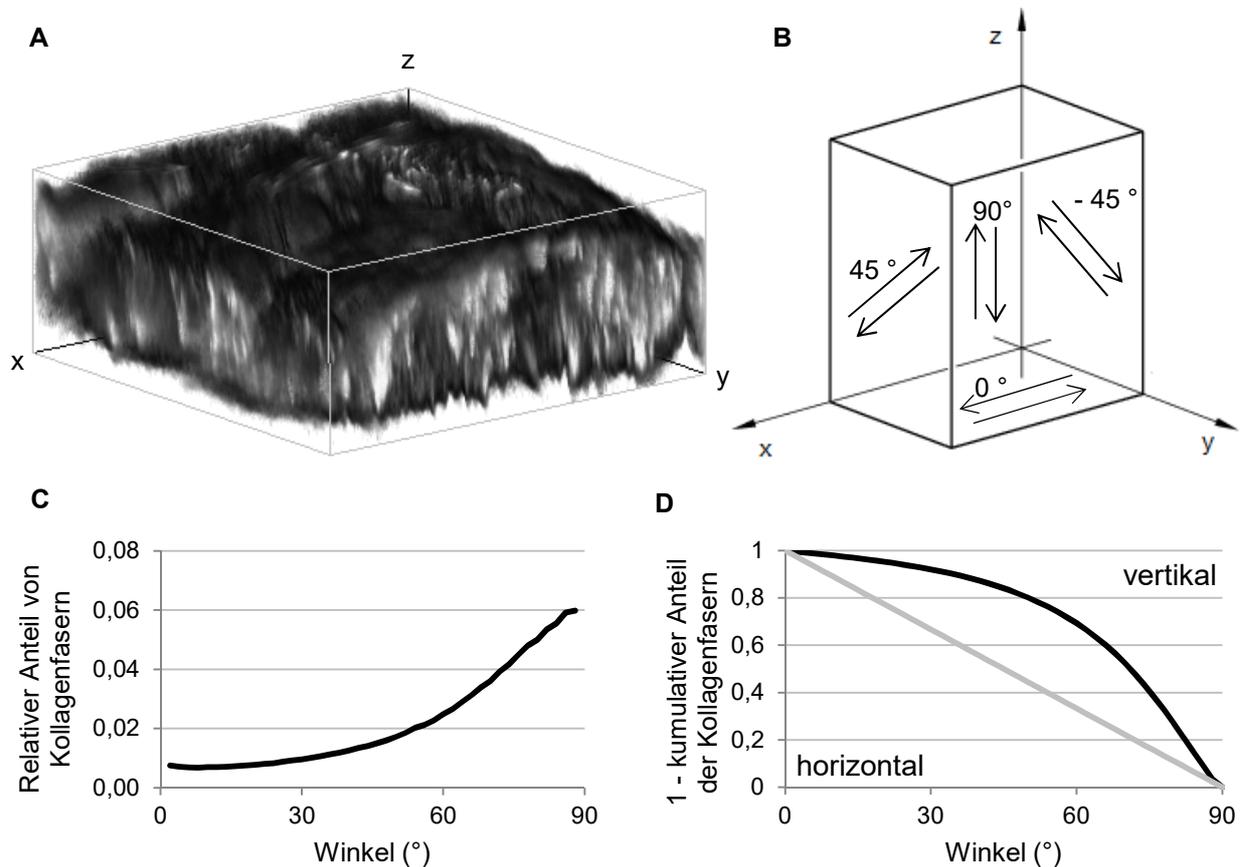


Abbildung 3.9: Auswertung der mikroskopischen Messdaten mithilfe der Software *Directionality*. Abbildung **A** zeigt exemplarisch die mikroskopische Aufnahme der räumlichen Anordnung von Kollagenfasern in humaner Dermis. (**B**) In Abhängigkeit von ihrer Orientierung in z-Richtung wird Kollagenfasern ein bestimmter Winkel zugeordnet. (**C**) Auf dieser Grundlage wurden die relativen Anteile der Kollagenfasern für jeden zweiten Winkel zwischen 2 und 88° berechnet. Wurden die relativen Anteile der Kollagenfasern - beginnend bei 2° - sukzessive mit dem jeweils nächst größeren Winkel zu einem kumulativen Anteil aufsummiert, der von 1 subtrahiert wurde, erhielt man die Darstellung in Abbildung **D**. Die graue Diagonale entspricht dem Fall, wenn alle Orientierungen zu gleichen Anteilen vorhanden sind. Dominieren horizontal ausgerichtete Fasern in einer Gewebeprobe, so liegt die resultierende Kurve unterhalb der grauen Diagonalen, bei einem Übergewicht von vertikal orientierten Fasern oberhalb der Diagonalen.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Proteine

3.4.1.1 Proteinisolation aus adhärennten Kulturzellen

RIPA-Puffer

Angesetzt in PBS

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

Proteaseinhibitormix (100 x)

Angesetzt in PBS

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

Zur Homogenisierung von adhärennt gewachsenen Keratinozyten wurde zunächst das Kulturmedium komplett abgenommen. Danach folgten zwei Waschschrirte mit jeweils 2 ml kaltem PBS. Anschließend wurde ein in Abhängigkeit von der *Well*-Größe geeignetes Volumen RIPA-Puffer (inkl. Proteaseinhibitormix 1x und Phosphataseinhibitormix 1x) hinzugegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Unter Verwendung eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden der *Well*-Platte abgelöst. Danach wurde die Suspension aus RIPA-Puffer, Zellinhalt und Plasmamembranfragmenten in ein vorbereitetes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Gewinnung der Zellproteine wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß mit den lysierten Zellen dreimal kurz gevortext und danach für 15 Minuten bei 15.115 x g und 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend auf Eis gelagert, um eine Bestimmung der Proteinkonzentration (**siehe 3.4.1.2**) durchzuführen. Schließlich wurden die Proteinproben bei -80 °C dauerhaft gelagert.

3.4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach *Bradford*

Bradford-Farbreagenz

Angesetzt in PBS

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

Die Konzentration von Proteinen wurde mithilfe des *Bradford*-Tests photometrisch bestimmt. Bei dieser Methode wird der Umstand ausgenutzt, dass sich das Absorptionsmaximum des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliantblau von 470 nm in ungebundener Form auf 595 nm verschiebt, wenn dieser in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration war die Erstellung einer Standard-Eichkurve notwendig. Ausgehend von einer BSA-Stammlösung mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml wurden Verdünnungen mithilfe von *Aqua dest.* angefertigt. Die geringste Verdünnung des Standards betrug 400 µg/ml. Die Konzentrationen aller sieben weiteren Verdünnungen waren jeweils um 50 µg/ml niedriger als die vorherige. Zusätzlich wurde ein Leerwert pipettiert. Schließlich wurden die Proteinproben hinzugefügt. Die Volumina der einzelnen Komponenten für die Ansätze des Proteinstandards, des Leerwertes sowie der Proben sind **Tabelle 3.2** zu entnehmen. Jeder Ansatz wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tabelle 3.2: Pipettierschema für die Ansätze zur Proteinbestimmung

Ansatz	RIPA-Puffer [µl]	BSA-Lösung [µl]	H ₂ O [µl]	Probe [µl]	Bradford-Reagenz [µl]
Standard	1	19	-	-	180
Leerwert	1	-	19	-	180
Proteinproben	-	-	19	1	180

Nach der Zugabe des *Bradford*-Reagenzes in die 96-Well-Platte wurde unter Verwendung des Photometers *SunriseTM* der Firma *Tecan* unmittelbar die Extinktion bei 595 nm gemessen. Mithilfe der zugehörigen Software *MagellanTM 6* wurden die um den Leerwert korrigierten Extinktionswerte gegenüber der Konzentration der jeweiligen Standard-Verdünnung aufgetragen. Hierbei wurden die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen zugrunde gelegt. Aus der erhaltenen Standardkurve konnte schließlich die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden.

3.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamid-Lösung

Angesetzt in *Aqua bidest.*

Acrylamid	30 %
Bisacrylamid	0,8 %

Trenngel-Puffer, pH 8,8

Angesetzt in *Aqua bidest.*

Tris	1,5 M
SDS	0,4 %

Sammel-Puffer, pH 6,8

Angesetzt in *Aqua bidest.*

Tris	0,5 M
SDS	0,4 %

Elektrophorese-Puffer (5x)

Angesetzt in *Aqua bidest.*

Glycin	0,19 mM
Tris	25 mM
SDS	0,2 %

SDS-Proben-Puffer (2x)

Angesetzt in *Aqua bidest.*

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

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde ein diskontinuierliches System verwendet bestehend aus einem Trenngel, über das ein Sammelgel geschichtet war (Laemmli, 1970). Die Pipettiervorschrift zur Herstellung der Gele ist **Tabelle 3.3** zu entnehmen. Zudem wurde die SDS-PAGE unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden die Proben zunächst 1:2 in SDS-Proben-Puffer (2x) verdünnt und anschließend für 3 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dann nur noch in Abhängigkeit ihrer Größe.

Nachdem das SDS-Gel in die Laufkammer eingesetzt worden war, wurde letztere mit Elektrophoresepuffer (1x) befüllt. Für die Proben wurde jeweils ein Äquivalent von 10 μ g Protein in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Um die zu untersuchenden Proteine später anhand ihres Molekulargewichtes identifizieren zu können, wurde ebenfalls ein Proteinstandard aufgetragen. Anschließend wurde die elektrophoretische Auftrennung der Proteine gestartet. Zunächst wurden 80 Volt für 15 Minuten angelegt, danach wurde die Spannung auf 145 Volt erhöht. Wenn die Lauffront das Gel verließ, wurde die SDS-PAGE beendet.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Trenn- und des Sammelgels

Lösungen	Trenngel 12 %	Sammelgel 4 %
Acrylamidlösung	12 ml	1,3 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,5 ml
H ₂ O	10,2 ml	5,9 ml
Ammoniumpersulfat	300 µl	300 µl
TEMED	10 µl	10 µl

3.4.1.4 Transfer von Proteinen auf eine Membran

Transfer-Puffer

Angesetzt in *Aqua bidest.*

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

Der Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte unter Verwendung des *TransBlot® Turbo™ Transfer System* der Firma *Bio-Rad*. Hierbei handelt es sich um eine *Semi-Dry-Variante* des *Western Blot*. Zur Vorbereitung des Proteintransfers wurde zunächst das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Das verbliebene Trenngel wurde für 15 Minuten leicht in Transfer-Puffer geschwenkt, um SDS und Salze zu entfernen. Daneben wurden ebenfalls zwei Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran in Transferpuffer äquilibriert. In einer *Blotting-Kammer* wurde anschließend die Nitrozellulosemembran auf ein Filterpapier geschichtet. Danach legte man das SDS-Gel passend auf die Membran und bedeckte den Stapel mit dem zweiten Filterpapier. Nachdem die Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen ausgestrichen worden waren, wurde die Kammer verschlossen und in das Transfer-System gesteckt. Der Proteinübertrag wurde schließlich für 30 Minuten bei einer Stromstärke von 1 Ampere durchgeführt. Die Spannung war hierbei auf einen Wert von 25 Volt festgelegt. Um im Anschluss den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen, wurden die Membran für 5 Minuten mit 20 ml *Ponceau S* auf dem Schüttler angefärbt. Zur Sichtbarmachung der Banden wurde kurz mit Leitungswasser gewaschen. Bevor die Antikörpermarkierung von Proteinen erfolgte, wurde die Membran dreimal mit TBST für jeweils 5 Minuten vollständig entfärbt.

3.4.1.5 Anfärbung von Proteinbanden im SDS-Gel

Coomassie-Blau-Lösung

Angesetzt in *Aqua bidest.*

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

Entfärbe-Lösung

Angesetzt in *Aqua bidest.*

Methanol	40 %
Essigsäure	5 %

Konservierungs-Lösung

Angesetzt in *Aqua bidest.*

Essigsäure	7,5 %
------------	-------

Um das Ausmaß des Proteintransfers auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen, wurden die auf dem SDS-Gel verbliebenen Proteinbanden angefärbt. Zu diesem Zweck wurde der Triphenylmethanfarbstoff *Coomassie-Brilliantblau* verwendet, welcher unspezifisch an basische Seitenketten von Proteinen bindet.

Das SDS-Gel wurde hierzu in *Coomassie-Blau-Lösung* überführt. Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Im Anschluss daran wurde die Färbelösung abgenommen und *Entfärbe-Lösung* hinzugegeben. Nach ungefähr einstündiger Inkubation konnten je nach Stärke der verbliebenen Proteinbanden Rückschlüsse auf das *Blot*-Ergebnis gezogen werden. Um das Gel zu erhalten, wurde es mit *Konservierungs-Lösung* in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

3.4.1.6 Proteindetektion mittels Antikörperreaktion

TBST-Puffer, pH 7,4

Angesetzt in *Aqua bidest.*

Tris	40 %
NaCl	5 %
Tween	0,05 %
Bromphenolblau	0,5 %

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für 1 Stunde in 5 %iger Magermilch-Lösung (in TBST) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Proteinmarkierung unter Verwendung spezifischer Antikörper. Hierzu wurde der Primärantikörper in gewünschter Weise (**siehe Tabelle 2.11**) mit der Magermilch-Lösung verdünnt. Die Nitrozellulosemembran wurde dann zusammen mit der Primärantikörperlösung in

eine kleine Plastiktasche eingeschweißt. Die anschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in Rotation. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal à 5 Minuten mit TBST gewaschen. Danach wurde die Membran in einer Lösung mit MRP-gekoppeltem Sekundärantikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper musste gegen die Spezies gerichtet sein, in der der Primärantikörper gebildet wurde. Nach beendeter Inkubation wurde die Membran dreimal in TBST à 5 Minuten gewaschen. Die Visualisierung der markierten Proteinbanden erfolgte schließlich über eine MRP-katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion (**Abbildung 3.10**). Hierzu wurden die zwei Lösungen des *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (*Thermo Fisher Scientific*) zu gleichen Anteilen zusammengegeben und für 3 Minuten mit der Membran inkubiert. Die dabei entstandene Lumineszenz wurde umgehend durch Auflegen eines Films detektiert, der anschließend entwickelt wurde.

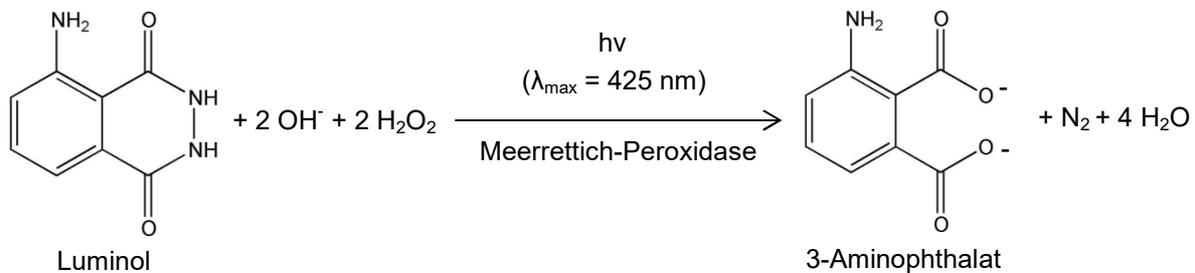


Abbildung 3.10: Darstellung der Chemilumineszenzreaktion. Die MRP-katalysierte Umsetzung von Luminol zu 3-Aminophthalat erfolgt unter Emission von Licht.

Um Unterschiede in der Proteinbeladung des SDS-Gels zu relativieren, wurde die Expression der untersuchten Proteine zu der von Haushaltsgenen in Beziehung gesetzt. Diesbezüglich mussten die an der Nitrozellulosemembran gebundenen Antikörper zunächst durch Strippen (**siehe 3.4.1.7**) entfernt werden, um anschließend das oben beschriebene Vorgehen zur Proteindetektion für β -Aktin oder α -Tubulin durchführen zu können.

3.4.1.7 Strippen von Nitrozellulosemembranen

Zur Entfernung von gebundenen Antikörpern musste die Nitrozellulosemembran für 1 Stunde in *Ponceau S* bei Raumtemperatur inkubiert werden. Anschließend wurde die Membran dreimal à 5 Minuten in TBST gewaschen. Wenn die Membran vollständig entfärbt war, wurden die unspezifischen freien Bindungsstellen bei einstündiger Inkubation in 5 %iger Magermilch (in TBST) blockiert. Anschließend konnte die Immundetektion eines weiteren Proteins gemäß **3.4.1.6** erfolgen.

3.4.2 Nukleinsäuren

3.4.2.1 Isolierung von RNA aus Gewebe und kultivierten Zellen

3.4.2.1.1 Vorbereitung von kryokonserviertem humanem Gewebe

Mithilfe eines Kryostaten wurden zunächst die zu analysierenden Gewebe in Epidermis und Dermis unterteilt, um die RNA getrennt voneinander isolieren zu können. Aufgrund der Tatsache, dass die Epidermis und die Dermis strukturell ineinander verzahnt sind, war unvermeidlich, dass vor allem die epidermale Fraktion RNA dermalen Zellen des *Stratum papillare* enthält, während die dermale Fraktion nahezu frei von epidermaler RNA ist.

Ausgehend von der Hautoberfläche wurden Horizontalschnitte mit 10 µm Dicke sukzessive abgenommen und unmittelbar in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit 350 µl RLT-Puffer (inkl. 1 % β-Mercaptoethanol) überführt. In regelmäßigen Abständen wurden Schnitte von 1 µm generiert, um unter dem Lichtmikroskop zu überprüfen, in welcher Hautschicht man sich befand. Wenn der Anteil epidermaler Strukturen nur noch minimal war, wurde dazu übergegangen, die dermale Fraktion bis zum Erreichen der Subkutis – falls vorhanden – abzunehmen und in einem separaten 2 ml-Reaktionsgefäß mit 350 µl RLT-Puffer zu sammeln. Nachdem das Gewebe auf Eis vollständig aufgetaut worden war, wurde in jedes Reaktionsgefäß eine sterile Mahlkugel hinzugefügt. Dann wurden die Gewebeproben unter Verwendung des *Qiagen TissueLyser* für 3 Minuten bei 30 Hz homogenisiert.

3.4.2.1.2 Vorbereitung der kultivierten Zellen

Adulte, nicht-diabetische und diabetische humane Keratinozyten wurden unter euglykämischen Bedingungen in einer Konzentration von 200.000 Zellen/1,5 ml in 12-Well-Platten ausgesät und für 48 Stunden bis zur Ausbildung konfluenter *Monolayer* kultiviert. Anschließend wurde die RNA aufgereinigt (Zeitpunkt $t = 0$ Stunden, der unverwundeten Bedingungen entspricht). Parallel dazu wurden *Monolayer* derselben Keratinozyten gemäß **Abbildung 3.11** mithilfe einer sterilen Pipettenspitze (10 bis 100 µl) beschädigt. Auf diese Weise wurde innerhalb eines *Wells* eine große Anzahl von Zellen generiert, die sich unter simulierten Wundheilungsbedingungen befanden. Die Isolation ihrer RNA wurde jeweils 6 und 24 Stunden nach Verwundung der *Monolayer* durchgeführt. Um die Veränderungen der mRNA-Expression für die analysierten TJ-Proteine im Rahmen der *In-vitro*-Wundheilung zu ermitteln, wurden die mRNA-Level nach 6 und 24 Stunden jeweils zu denen unter unverwundeten Bedingungen in Beziehung gesetzt.

Vertiefung einer 12-Well-Platte

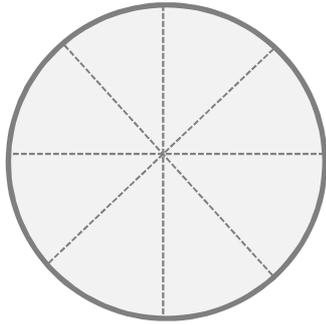


Abbildung 3.11: Verwendung des *Monolayers* humaner diabetischer und nicht-diabetischer Keratinozyten. Die gestrichelten Linien deuten die Kratzspuren durch den Zellrasen an.

3.4.2.1.3 Aufreinigung von RNA

3.4.2.1.3.1 Gewebe

Zu den homogenisierten Gewebeproben wurden 1,67 %ige Proteinase K des *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Quiagen) in 600 µl RNase-freiem Wasser pipettiert. Nachdem die Reaktionsgefäße gevortext und anzentrifugiert wurden, erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 55 °C im Wasserbad. Im Anschluss wurde für 3 Minuten bei 8944 x g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die RNA befand, wurde in ein neues 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 450 µl Ethanol absolut reinst hinzugegeben. Nach gründlichem Durchmischen durch Auf- und Abpipettieren wurde die RNA-Suspension zur Aufreinigung auf die *RNeasy*-Säule gegeben (**siehe unten**).

3.4.2.1.3.2 Adhärenente Keratinozyten in Kultur

Zur Aufreinigung von Ribonukleinsäuren aus adhärenente Keratinozyten in Kultur wurde das *RNeasy[®] Mini Kit* der Firma *Qiagen* angewendet. Zu Beginn wurde das Medium der adhärenent gewachsenen humanen Keratinozyten vollständig abgenommen. Dann wurde der Zellrasen zweimal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin mit 350 µl RLT-Puffer (inkl. 1 % β-Mercaptoethanol) lysiert und nach kurzer Inkubationszeit unter Verwendung eines Zellschabers abgelöst. Die Suspension wurde danach in das vorbeschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, mit dem Vortexer gemischt und auf die *QIAshredder*-Säule pipettiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 2 Minuten bei 15.115 x g. Daraufhin wurden dem Durchfluss 350 µl 70 % Ethanol hinzugefügt.

Sowohl die Gewebepräparate als auch die Zellpräparationen wurden dann auf die *RNeasy*-Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 8.944 x g zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Auffanggefäß gesetzt. Im Folgenden entsalzte man die Silica-Membran der Säule mit 350 µl RW1-Puffer. Hierzu wurde für 15 Sekunden bei 8.944 x g zentrifugiert. Um die DNA zu verdauen, pipettierte man 80 µl DNase-Verdauungslösung (10 µl DNase I-Stammlösung + 70 µl RDD-Puffer) direkt auf die Membran und inkubierte für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran durch 15-sekündige Zentrifugation bei 8.944 x g mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Nachdem das Auffanggefäß erneut gewechselt wurde, erfolgten zwei Waschschriffe mit RPE-Puffer. Zunächst wurden 500 µl auf die Säule pipettiert und für 15 Sekunden bei 8.944 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurde durch 2-minütige Zentrifugation bei 8.944 x g mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Dann wurde die Säule 15115 x g trocken zentrifugiert. Schließlich wurde die Säule auf ein frisches Eppendorfgefäß (1,5 ml) gesteckt. Nach Zugabe von 30 µl RNase-freiem H₂O wurde die RNA durch einminütige Zentrifugation bei 8.944 x g eluiert.

3.4.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und der RNA-Reinheit

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und der RNA-Reinheit wurde das *NanoDrop*TM-Spektrophotometer (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet. Zunächst wurde mit einem Volumen von 2 µl RNase-freiem Wasser der Leerwert festgesetzt. Im Folgenden wurden mit jeweils 2 µl Probenvolumen die RNA-Konzentration gemessen, welche automatisch von der *NanoDrop*TM-Software ausgegeben wurde. Die Reinheit der RNA-Präparationen wurde zum einen durch das Absorptionsverhältnis bei 260 nm gegenüber 280 nm beurteilt. Es zeigt an, in welchem Umfang die Probe mit Proteinen verunreinigt ist. Sein Wert sollte idealerweise bei 2,0 liegen. Zum anderen wurde das Absorptionsverhältnis bei 260 nm gegenüber 230 nm als Bewertungskriterium der Reinheit herangezogen. Sollte dieser Wert kleiner als 2,0 sein, kann die Probe mit Kohlenhydraten, Salzen oder organischen Lösungsmitteln verunreinigt sein. Wenn bereits für eines der beiden Absorptionsverhältnisse größere Abweichungen vom Idealwert beobachtet wurden, erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt über die *RNeasy*-Säule gemäß 3.4.2.1.3.2.

3.4.2.3 Überprüfung der RNA-Integrität

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde das *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (*Agilent Technologies*) verwendet. Die Vorbereitung des RNA-Chips erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Hierzu wurde das Gemisch aus Gelmatrix und Farbstoff in die dafür vorgesehenen

Wells des RNA-Chips pipettiert. Danach wurde der *RNA 6000 Nano marker* in alle 12 Proben-*Wells* sowie in das *Well* der RNA-Leiter gegeben. Anschließend wurde der *Chip* mit den RNA-Proben und der RNA-Leiter beladen. Danach wurde der *Chip* auf dem IKA MS 3-Vortexer für 1 Minute bei 2400 rpm horizontal geschüttelt. Schließlich wurde der *Chip* in den *Agilent 2100 Bioanalyzer* eingesetzt und die Untersuchung gestartet. In **Abbildung 3.12** ist der erfolgreiche Lauf für die RNA-Leiter sowie für die Analyse von Gesamt-RNA exemplarisch für eukaryotische Zellen dargestellt. Das Elektropherogramm der RNA-Leiter wies einen *Peak* für den *RNA 6000 Nano marker* sowie sechs RNA-*Peaks* für die unterschiedlichen Fragmente der Leiter auf (**Abbildung 3.12 A**). Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen zeigte neben dem *Peak* für den *RNA 6000 Nano marker* die zwei charakteristischen *Peaks* für die 18S- und 28S rRNA beobachtet (**Abbildung 3.12 B**).

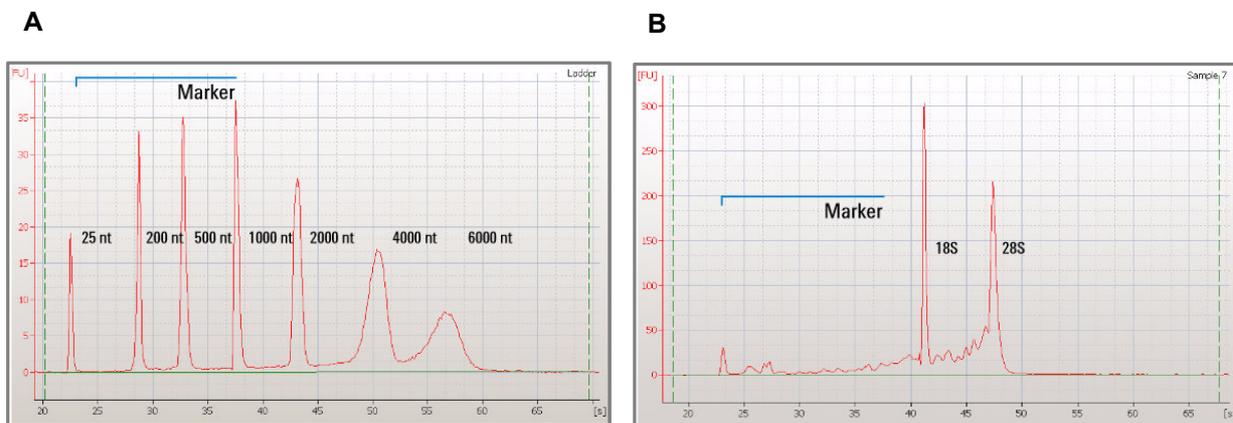


Abbildung 3.12: Überprüfung der RNA-Integrität. Elektropherogramme für (A) die RNA-Leiter und (B) Gesamt-RNA aus einer eukaryotischen Zelle (Abbildung modifiziert nach www.agilent.com).

3.4.2.4 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Für die Synthese von komplementärer DNA ausgehend von der isolierten RNA wurde das *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma *Thermo Fisher Scientific* verwendet. Dieses beinhaltet RNA-freies Wasser, einen Reaktions- sowie einen Enzym-Mix. Das Pipettierschema für den Reaktionsansatz ist nachstehend aufgeführt (**Tabelle 3.4**). Beim Ansetzen eines *Master-Mixes* aus Reaktions- und Enzym-Mix multiplizierte sich ihr Volumen entsprechend der Probenanzahl. Hierbei musste eine Negativkontrolle berücksichtigt werden, die RNase-freies Wasser anstelle von RNA enthielt.

Tabelle 3.4: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription von 3 µg RNA in cDNA

Reaktionskomponente	Volumen [µl]
Reaktions-Mix	12
Enzym-Mix	6
RNA	3 µg/cDNA [µg/µl]
RNase-freies Wasser	42 µl - 3 µg/cDNA [µg/µl]

Eine Inkubation für 10 Minuten bei 25 °C verlängerte die *Random Primer* vor der eigentlichen cDNA-Synthese. Ohne diesen Inkubationsschritt können die *Primer* vom RNA-Matrizenstrang dissoziieren, wenn die Temperatur erhöht wird. Der Reaktionszyklus setzte sich mit der Reversen Transkription für 15 Minuten bei 50 °C fort. Zuletzt wurde die Temperatur für 5 Minuten auf 85 °C gesteigert, was zur Hitzeinaktivierung der Transkriptase führte. Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

3.4.2.5 Quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) mittels *TaqMan*[®]-Sonden

Die quantitative *Real-Time*-PCR ist eine Variante der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der parallel zur DNA-Amplifikation die Quantifizierung der PCR-Produkte ermöglicht wird. Hierzu werden *TaqMan*[®]-Sonden verwendet, die an ihrem 3'-Ende mit einem *Quencher*-Molekül, an ihrem 5'-Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM[™] assoziiert sind. Wenn die hitzestabile Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymerase-Aktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der DNA-Synthese vom 5'-Ende her abbaut, entfernen sich dadurch Fluorophor und *Quencher*-Molekül voneinander. Die Reporter-Fluoreszenz wird nicht länger durch das *Quencher*-Molekül absorbiert und kann nun detektiert werden (**Abbildung 3.13**). Mit der steigenden Anzahl von PCR-Produkten nimmt auch das Fluoreszenzsignal zu. Zur Quantifizierung wird ein geeigneter Schwellenwert festgelegt, an dem das gemessene Fluoreszenzsignal die Hintergrund-Fluoreszenz deutlich übersteigt. Dieser Schwellenwert wird in Abhängigkeit von der anfänglich vorhandenen cDNA-Menge für jede Probe nach einer individuellen Anzahl von Zyklen erreicht, die dem C_t-Wert entspricht.

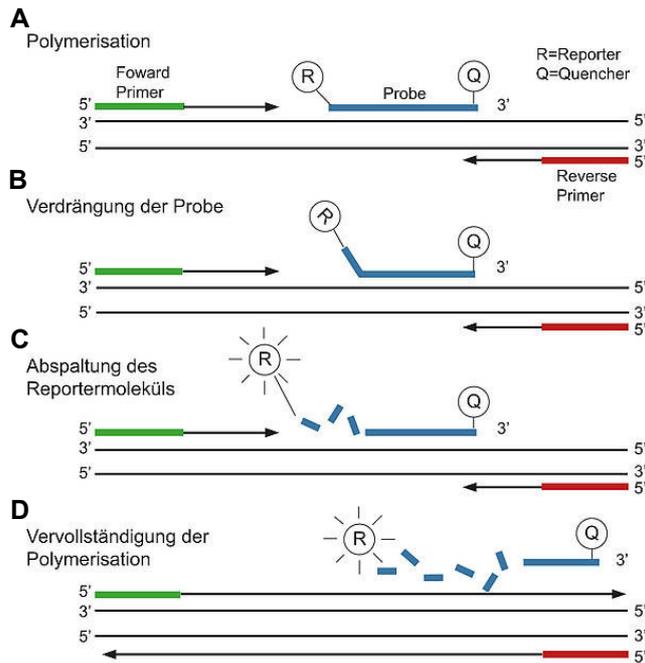


Abbildung 3.13: Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR mit TaqMan®-Sonden. (A) Nachdem die Primer und die TaqMan®-Sonde sequenzspezifisch an den DNA-Matrizenstrang gebunden haben, beginnt die Polymerisation. (B) Die Verdrängung der TaqMan®-Sonde durch den neu synthetisierten DNA-Strang und (C) ihr Abbau in 5'-3'-Richtung führen zur Abspaltung des Reporter-moleküls. Das Fluoreszenzsignal wird jetzt nicht mehr durch das Quencher-Molekül absorbiert. (D) Der neue DNA-Strang wird durch Polymerisation vervollständigt (Abbildung modifiziert nach (<http://www.medizinische-genetik.de>)).

Für die quantitative Real-Time-PCR fand der *iMaxima™ Probe qPCR Master Mix* der Firma *Fermentas* Verwendung. Dieser enthielt die *Maxima® Hot Start Taq DNA polymerase* und Desoxynukleotide in einem optimierten PCR-Puffer. Zunächst wurde ein *Master-Mix* bestehend aus *iMaxima™ Probe qPCR Master Mix* und dem Primer-Paar mit TaqMan®-Sonde hergestellt (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des Master-Mixes

Reaktionskomponente	Volumen (µl) pro Reaktionsansatz
<i>iMaxima™ Probe qPCR Master Mix</i>	5 µl <i>iMaxima™ Master Mix</i>
Primer-Paar mit TaqMan®-Sonde	0,5 µl TaqMan®-Sonde

Durch Hinzufügen der synthetisierten cDNA wurden schließlich die individuellen PCR-Reaktionsansätze zusammenpipettiert (Tabelle 3.6), die jeweils zu gleichen Anteilen auf drei *Wells* einer 96-Well-Platte verteilt wurden. Zur Durchführung der qPCR wurde ferner ein *Master-Mix* mit GAPDH-Primer-Paar und -TaqMan®-Sonde erstellt, weil die Expression des Zielgens gegen die Expression eines Haushaltsgenes normiert wurde.

Tabelle 3.6: PCR-Reaktionsansatz

Reaktionskomponente	Volumen (µl)
<i>Master-Mix</i> (siehe Tabelle 3.5)	5,5
cDNA (Verdünnung in RNase-freiem Wasser von 1:25)	4,5

Der anschließende PCR-Lauf setzte sich aus 45 Zyklen zusammen, die alle dem folgenden Dreischritt entsprachen. Zunächst wurde die DNA für 10 Sekunden bei 95 °C denaturiert. Nach Bindung der *Primer* (*annealing*) für 5 Sekunden bei 60 °C erfolgte die 10-sekündige Elongationsphase bei 72 °C, in der die *Primer* verlängert werden.

3.4.2.6 Relative RNA-Quantifizierung

Die relative Quantifizierung der Ausgangs-RNA erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Zunächst wurde die Expression des Zielgens (C_t -Zielgen) gegen die eines internen Referenzgens (C_t -Referenzgen) normalisiert.

$$\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\text{Referenzgen}) \quad (3.3)$$

In einem zweiten Schritt wurde der $\Delta\Delta C_t$ -Wert erhalten, wenn der normalisierte Expressionsunterschied des Kontrollansatzes von dem des Probenansatzes subtrahiert wurde.

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Probe}) - \Delta C_t (\text{Kontrollansatz}) \quad (3.4)$$

In der vorliegenden Arbeit entsprach der Kontrollansatz grundsätzlich dem Mittelwert der ΔC_t -Werte von nicht-diabetischen Ansätzen. Der Begriff Probe steht hier stellvertretend für diabetische Ansätze, von denen jeweils der gemittelte ΔC_t -Wert der nicht-diabetischen Ansätze subtrahiert wurde.

Der relative Expressionsunterschied (R) des untersuchten Zielgens berechnet sich schließlich nach der Formel:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (3.5)$$

Die $\Delta\Delta C_t$ -Methode setzt hierbei eine konstante Verdoppelung der DNA-Menge in jedem *Real-Time*-PCR-Zyklus voraus. Man legt somit eine ideale PCR-Effizienz in allen Proben ($E = 2$) zugrunde.

3.4.2.7 Alternative Analyse der Genexpression

Um Kandidatengene zu identifizieren, deren Expression sich in diabetischem im Vergleich zu gesundem Gewebe sowie in diabetischen verglichen mit nicht-diabetischen Keratinozyten unter unverwundeten und verwundeten Bedingungen unterscheidet, wurde eine große Auswahl von Genen gleichzeitig mit einer Hochdurchsatzvariante zur quantitativen Analyse der Genexpression getestet (*BioMarkTM-HD-System* der Firma Fluidigm). Sowohl die cDNA-Synthese (siehe 3.4.2.7.1) als auch die anschließende Genexpressionsanalyse (siehe 3.4.2.7.2) wurden im Labor von Dr. Maria Thomas im Dr. Magarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie am Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart durchgeführt.

3.4.2.7.1 Synthese von komplementärer DNA

Ausgehend von der isolierten RNA wurde unter Verwendung eines Kits zur Reversen Transkription (*TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents*, Roche) cDNA hergestellt. Der Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese umfasste ein Volumen von 10 µl. Hierzu wurde zunächst ein *Master-Mix* gemäß **Tabelle 3.7** angesetzt. Anschließend wurden in einem Reaktionsgefäß 2 µl RNA (50 ng/µl) vorgelegt. Zur Vervollständigung des Reaktionsansatzes (**Tabelle 3.8**) wurden dann 8 µl des *Master-Mixes* hinzupipettiert.

Tabelle 3.7: Master-Mix für die Reverse Transkription

Reaktionskomponente	Volumen [µl]	Endkonzentration im Reaktionsansatz
<i>TaqMan[®]</i> -RT-Puffer (10x)	1	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	2,2	5,5 mM
dNTP-Mix (2,5 nM)	2	500 µM
<i>Random</i> Hexamer-Oligonukleotide (50 µM)	0,5	2,5 µM
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,2	0,4 U/µl
<i>MultiScribeTM</i> Reverse Transcriptase (50 U/µl)	0,25	1,25 U/µl
RNase-freies Wasser	1,85	

Tabelle 3.8: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription von 100 ng RNA in cDNA

Reaktionskomponente	Volumen [µl]
cDNA (50 ng/µl)	2
<i>Master-Mix</i>	8

Nachdem die Reaktionsansätze durch Auf- und Abpipettieren gemischt und kurz herunterzentrifugiert worden waren, wurde die cDNA-Synthese gestartet, die aus folgenden Schritten bestand. Zunächst erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 25 °C. Danach folgte die

Elongationsphase für 30 Minuten bei 48 °C. Die Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase wurde für 5 Minuten bei 95 °C durchgeführt. Die cDNA-Proben wurden schließlich bei -20 °C gelagert.

3.4.2.7.2 High Throughput Real Time quantitative PCR mittels TaqMan®-Sonden

Unter Verwendung des *BioMark™ 48.48 Dynamic Array „Integrated Fluidic Circuit“* der Firma *Fluidigm®* bestand die Möglichkeit, bis zu 47 Proben parallel hinsichtlich der Expression einer großen Anzahl (47) verschiedener Gene zu untersuchen (Spurgeon *et al.*, 2008). Dieses Hochdurchsatz-Screening basierte analog zu der unter 3.4.2.5 beschriebenen Genexpressionsanalyse auf einer quantitativen *Real-Time-PCR* mittels *TaqMan®*-Sonden. Das verwendete *Array* wies 48 *Sample-Inlets* und 48 *Detector-Inlets* auf, die vor dem Start des PCR-Laufs beladen wurden.

Zur Vorbereitung der Genexpressionsanalyse wurde zunächst ein *Master-Mix* aus dem *TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)* und dem *GE Sample Loading Reagent (20x)* hergestellt. Das *Kit TaqMan® Universal PCR Master Mix* enthielt die *AmpliTaq Gold-DNA-Polymerase*, die *AmpErase-Uracil-N-Glycosylase*, dNTPs mit dUTP, einer passiven Referenz und einem optimierten PCR-Puffer (**Tabelle 3.9**). In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde anschließend für jede cDNA ein Proben-Mix (**Tabelle 3.10**) angesetzt, von dem 5 µl in jeweils ein *Sample-Inlet* des *Arrays* pipettiert wurden.

Tabelle 3.9: Master-Mix

Reaktionskomponente	Volumen pro Inlet [µl]
<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)</i>	3,0
20 x <i>GE Sample Loading Reagent (20x)</i>	0,3

Tabelle 3.10: Proben-Mix

Reaktionskomponente	Volumen pro Inlet [µl]
<i>Master-Mix</i>	3,3
cDNA	2,7

Daneben wurde ein weiterer *Master-Mix* bestehend aus dem *TaqMan® Gene Expression Assay (20x)* mit *Primern* und *TaqMan®-Sonden* sowie dem *Assay Loading Reagent (2x)* hergestellt (**Tabelle 3.11**). Pro *Primer-Paar* mit *TaqMan®-Sonde* wurden anschließend 5 µl in ein *Detector-Inlet* gegeben.

Tabelle 3.11: Mix aus *Primern* und *TaqMan*[®]-Sonden (10x Assays)

Reaktionskomponente	Volumen pro <i>Inlet</i> [μl]
<i>TaqMan</i> [®] Gene Expression Assay (20x)	3,0
Assay Loading Reagent (2x)	3,0

Unter Verwendung des *BioMark*TM-*HD*-Systems von *Fluidigm* wurde schließlich die quantitative *Real-Time*-PCR durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (siehe 3.5.6).

3.5 Statistische Auswertungen

Die ausgewerteten Daten der TER- und Permeationsversuche, der immunhistochemischen Färbungen, der *Western-Blot*- und Genexpressions-Untersuchungen sowie der Extinktionsmessungen wurden unter Anwendung des gepaarten und ungepaarten t-Tests nach *Student* mit anschließender *Bonferroni*-Korrektur für Mehrfachvergleiche auf statistische Signifikanz überprüft.

Die statistische Auswertung der Analysen zur *In-vitro*-Wundheilung erfolgte mithilfe eines *random intercept model*, bei dem der Zelldonor, das technische Replikat und die ROI-Position als zufällige Effekte definiert wurden, während Medien, die Glukosekonzentration des Mediums, der Zellstatus (diabetisch oder nicht-diabetisch), die *Scratch-Assay*-Variante (klassischer *Scratch-Assay* oder *IncuCyteZoom*[®]-System), die Zeit nach Verwundung der *Monolayer*, die Anfangswundgröße und Interaktionen zwischen ihnen als feste Faktoren gewählt wurden. Für jede Versuchsreihe musste zunächst eine Reduktion auf die signifikanten Interaktionen zwischen den festen Variablen vorgenommen werden, bevor der statistische Test mit der *Software* SPSS unter Berücksichtigung der *Bonferroni*-Anpassung für Mehrfachvergleiche ausgeführt wurde.

Die Ergebnisse der *Ex-vivo*-Wundheilungsanalysen wurden unter Verwendung eines linearen gemischten Modells mit anschließender *Bonferroni*-Anpassung für Mehrfachvergleiche in SPSS ausgewertet.

Für die statistische Auswertung der Untersuchungen zur räumlichen Ausrichtung von Kollagen- und Elastinfasern wurde der *Levene*-Test angewendet, mit dem auf Homogenität der Varianzen von diabetischem im Vergleich zu nicht-diabetischem Gewebe geprüft wurde.

Bei allen durchgeführten Tests lag dann statistische Signifikanz vor, wenn die Bedingung $p < 0,05$ erfüllt war.

4 Ergebnisse

4.1 Hautbarriere und *Diabetes mellitus*

Die Charakterisierung der physikalischen Barriere in diabetischer und gesunder Haut umfasste vergleichende Untersuchungen zu TJ-Proteinen sowie zu Filaggrin als Parameter für das *Stratum corneum*. Darüber hinaus erfolgten Permeabilitätsanalysen an humanen Keratinozyten diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs.

4.1.1 *Tight-Junction*-Proteine in diabetischer und nicht-diabetischer humaner Haut

Zur Untersuchung von *Tight Junctions* in humaner diabetischer Haut im Vergleich zu gesunden Kontrollen (**siehe Kapitel 2: Tabelle 2.14**) wurde auf Proteinebene die Lokalisation und Immunintensität von Claudin-1, Claudin-4, Occludin und ZO-1 unter Durchführung immunhistochemischer Färbungen mit spezifischen Antikörpern analysiert sowie ihre Expression auf mRNA-Ebene mit Hilfe von qRT-PCR bestimmt. Die Auswahl der TJ-Proteine beruhte auf der Beobachtung, dass jedes an der Ausbildung einer funktionalen TJ-Barriere beteiligt ist (Kirschner *et al.*, 2013). Die Analyse erfolgte zum einen anhand von humanen Geweben. Weiterhin wurden Keratinozyten verwendet, die aus diabetischen und gesunden Hautbiopsien isoliert wurden (**siehe Kapitel 2: Tabelle 2.15**). Da bekannt ist, dass die Immunlokalisation von TJ-Proteinen auch beispielsweise durch UV-Exposition oder Alter beeinflusst ist (Rachow *et al.*, 2013; D'Souza *et al.*, 2009), wurde versucht, gesunde und diabetische Spender bezüglich Körperregion, Alter und, wenn möglich, auch nach Geschlecht zu paaren.

4.1.1.1 Immunintensität und Lokalisation von TJ-Proteinen in Hautgewebe von Diabetikern im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollen

Für den Vergleich von diabetischer und nicht-diabetischer humaner Haut wurden hinsichtlich der immunhistochemischen Intensität von TJ-Proteinen deutliche Unterschiede beobachtet,

während sich die Lokalisation nicht veränderte. Das TJ-Protein Claudin-1 wurde sowohl in gesunder als auch in diabetischer Haut ausgehend vom *Stratum basale* bis zum *Stratum granulosum* durchgehend exprimiert gefunden (**Abbildung 4.1 A**). Bei Betrachtung der Gesamtzelle zeigte sich im *Stratum granulosum* von diabetischer Haut aber eine signifikant verminderte Claudin-1-Immunintensität verglichen mit gesunden Kontrollen. Im oberen *Stratum spinosum* war Claudin-1 noch tendenziell geringer vorhanden, während im unteren *Stratum spinosum* und im *Stratum basale* kein Unterschied zwischen diabetischem und gesundem Gewebe beobachtet wurde. Wenn die Betrachtung der Claudin-1-Immunintensität auf die Plasmamembran beschränkt wurde, dann wies diabetische Haut im *Stratum granulosum* einen signifikant verminderten Umfang des Proteins auf. Für das obere *Stratum spinosum* und das *Stratum basale* war in diabetischem Gewebe verglichen mit nicht-diabetischen Kontrollen hingegen kein Unterschied in der Immunintensität von Claudin-1 erkennbar (**Abbildung 4.1 B**).

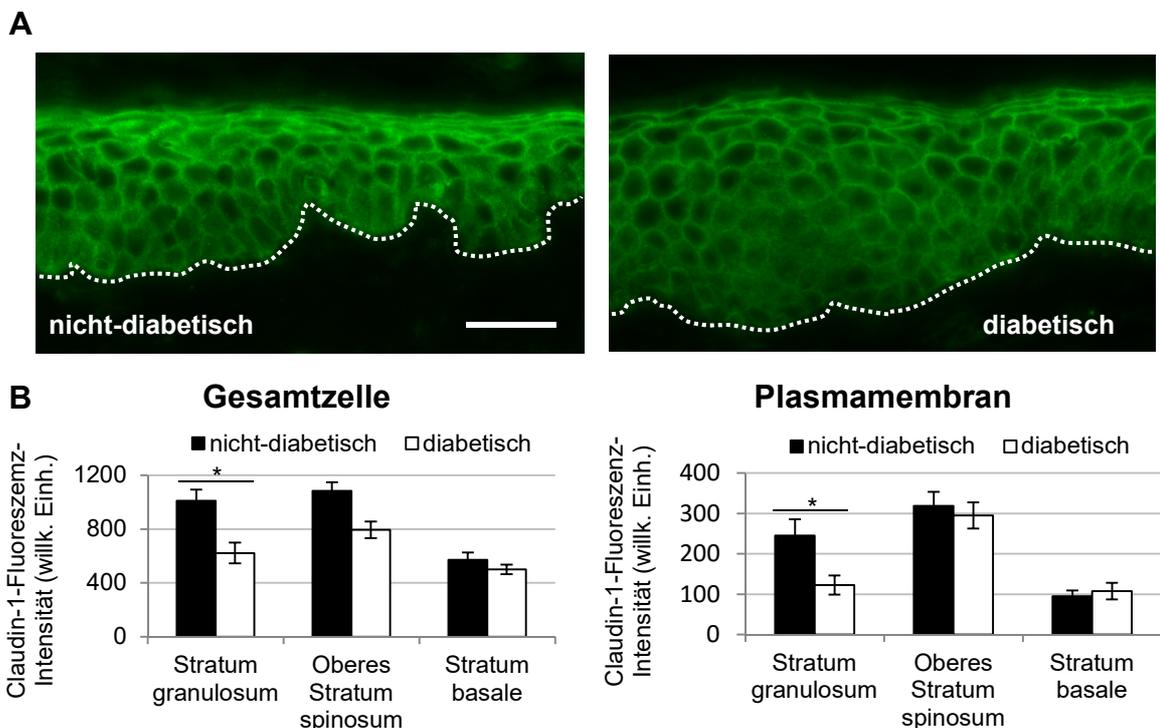


Abbildung 4.1: Immunlokalisation und -intensität von Claudin-1 in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Claudin-1 in der Haut von nicht-diabetischen und diabetischen Spendern. Die weißen gepunkteten Linien deuten die Grenze zwischen Epidermis und Dermis an. Längsbalken = 50 μm . (B) Auswertung der Fluoreszenzintensität von Claudin-1 in den verschiedenen Schichten für die gesamte Zelle und selektiv für die Plasmamembran ($n = 5$ für nicht-diabetisches Gewebe und $n = 4$ für diabetisches Gewebe (jeweils in Dreifachbestimmung); Mittelwert \pm Standardfehler; statistisch signifikant mit *: $p < 0,05$ gemäß gepaartem t-Test nach Student).

Claudin-4 wurde im Gegensatz zu Claudin-1 ausschließlich im *Stratum granulosum* und im oberen *Stratum spinosum* lokalisiert gefunden. Diese Beobachtung traf auf diabetisches und gesundes Gewebe gleichermaßen zu (**Abbildung 4.2 A**). Im *Stratum granulosum* wies diabetisches Gewebe verglichen mit gesunden Kontrollen eine deutliche Tendenz zu einer verminderten Immunintensität von Claudin-4 auf, während im oberen *Stratum spinosum* kein Unterschied detektiert wurde. Unabhängig davon, ob die Claudin-4-Immunintensität für die Gesamtzelle oder nur für die Plasmamembran ausgewertet wurde, erhielt man das gleiche Ergebnis (**Abbildung 4.2 B**).

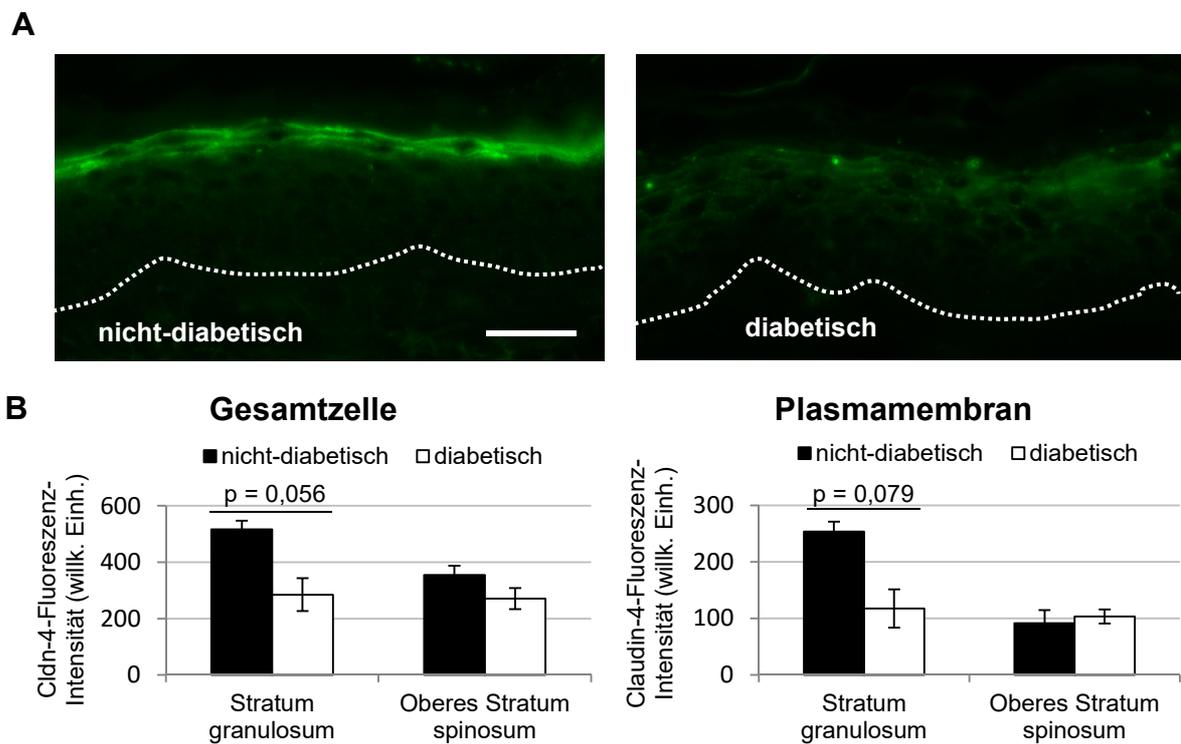


Abbildung 4.2: Immunlokalisation und -intensität von Claudin-4 in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Claudin-4 in der Haut von nicht-diabetischen und diabetischen Spendern. Die weißen gepunkteten Linien deuten die Grenze zwischen Epidermis und Dermis an. Längensbalken = 50 µm. (B) Auswertung der Fluoreszenzintensität von Claudin-4 im *Stratum granulosum* und im oberen *Stratum spinosum* für die Gesamtzelle und selektiv für die Plasmamembran (n = 5 für nicht-diabetisches Gewebe und n = 4 für diabetisches Gewebe (jeweils in Dreifachbestimmung); Mittelwert ± Standardfehler; p-Werte gemäß gepaartem t-Test nach *Student*).

Die Lokalisation von Occludin war in diabetischer und gesunder Haut auf das *Stratum granulosum* beschränkt (**Abbildung 4.3 A**). Für die Analyse seiner Immunintensität im Zytoplasma und in der Plasmamembran zusammen war Occludin in diabetischem Gewebe tendenziell vermindert vorhanden. Bei selektiver Betrachtung der Plasmamembran wies diabetische verglichen mit gesunder Haut sogar eine signifikant geringere Occludin-Immunintensität auf (**Abbildung 4.3 B**).

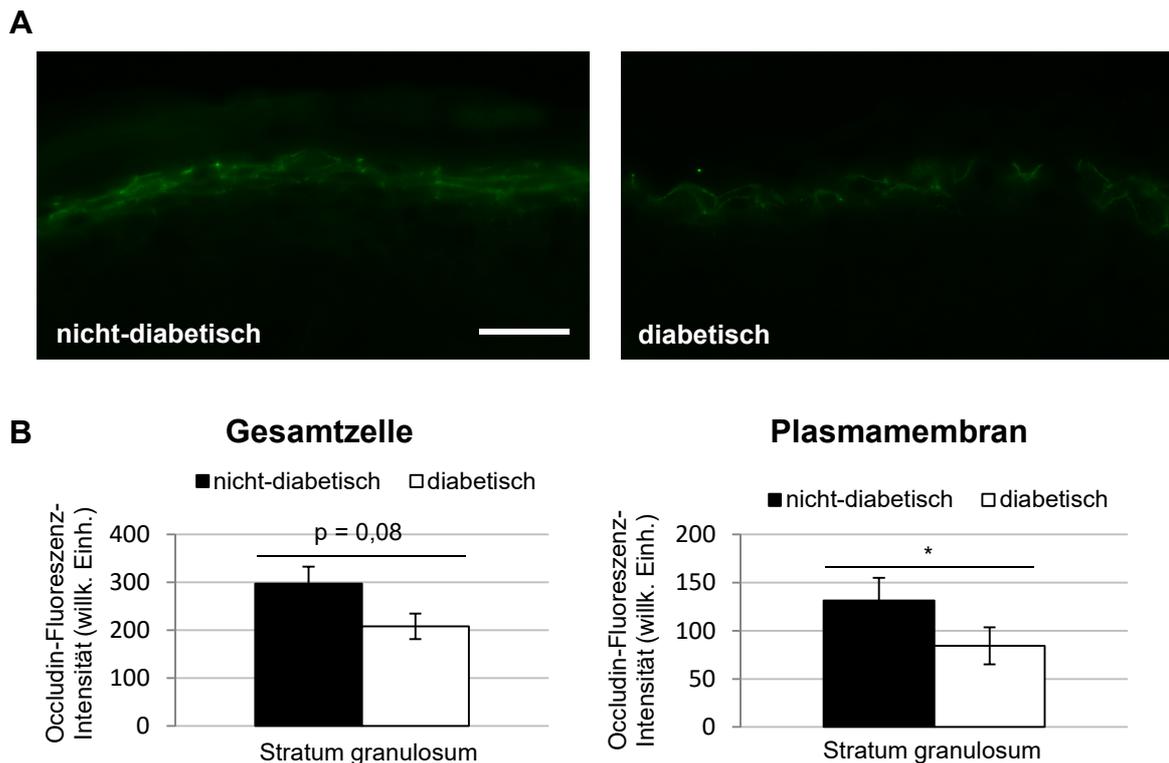


Abbildung 4.3: Immunlokalisation und -intensität von Occludin in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Occludin in der Haut von nicht-diabetischen und diabetischen Spendern. Längenbalken = 50 μm . (B) Auswertung der Fluoreszenzintensität von Occludin im *Stratum granulosum* für die Gesamtzelle und selektiv für die Plasmamembran (n = 5 für nicht-diabetisches Gewebe und n = 4 für diabetisches Gewebe (jeweils in Dreifachbestimmung); Mittelwert \pm Standardfehler; statistisch signifikant mit *: p < 0,05 gemäß gepaartem t-Test nach *Student*).

ZO-1 wurde sowohl in nicht-diabetischer als auch in diabetischer Haut im *Stratum granulosum* und oberen *Stratum spinosum* lokalisiert gefunden (**Abbildung 4.4 A**). Diabetische Haut wies in beiden Schichten eine tendenziell leicht geringere ZO-1-Intensität als in gesunden Kontrollen auf. Im *Stratum granulosum* traf dieses Ergebnis auf die ZO-1-Immunintensität in der Gesamtzelle und in der Plasmamembran allein zu (**Abbildung 5.4 B**). Das obere *Stratum spinosum* war nur für die Gesamtzelle auswertbar. Auch hier wurde ZO-1 tendenziell weniger gefunden.

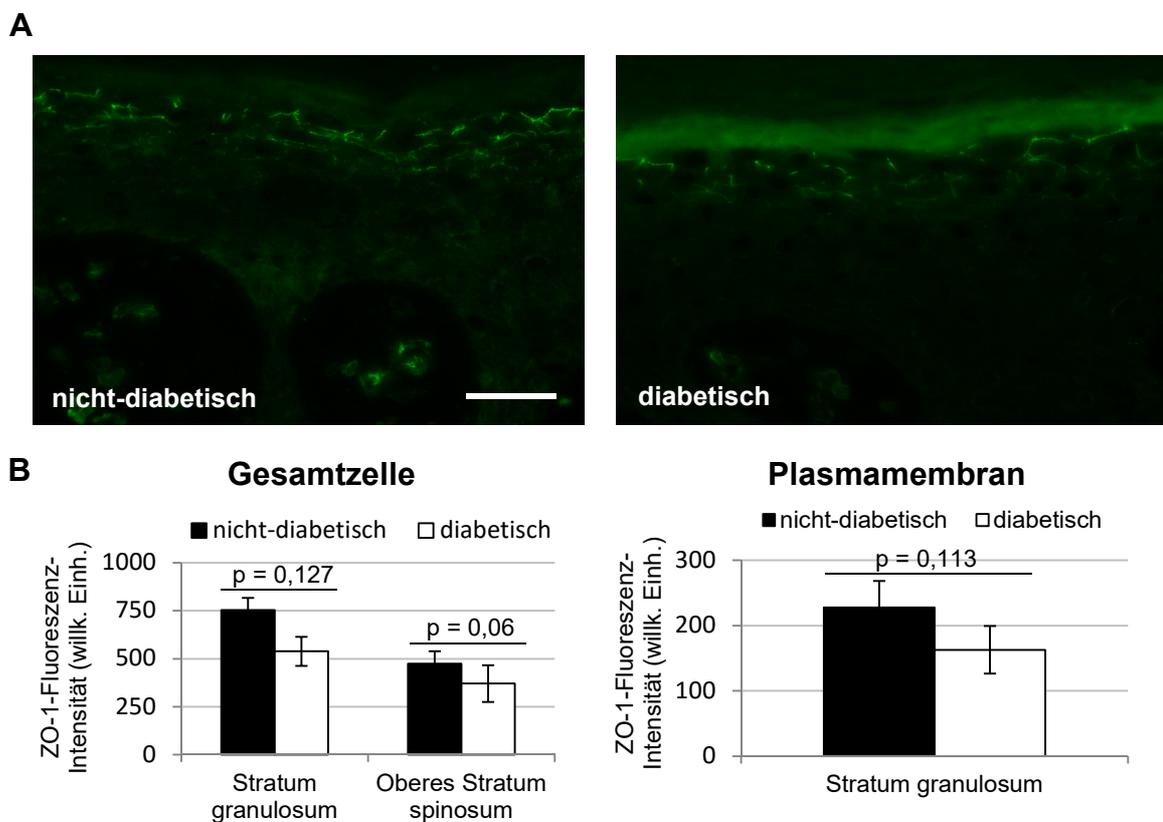


Abbildung 4.4: Immunlokalisierung und -intensität von ZO-1 in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von ZO-1 in der Haut von nicht-diabetischen und diabetischen Spendern. Längsbalken = 50 µm. (B) Auswertung der Fluoreszenzintensität von ZO-1 im *Stratum granulosum* für die Expression für die gesamte Zelle und selektiv für die Plasmamembran (n = 5 für nicht-diabetisches Gewebe und n = 4 für diabetisches Gewebe (jeweils in Dreifachbestimmung); Mittelwert ± Standardfehler; p-Werte gemäß gepaartem t-Test nach *Student*).

4.1.2 Genexpression von TJ-Proteinen in humanem Gewebe und in daraus isolierten Keratinozyten

Die TJ-Proteine Claudin-1, Claudin-4, Occludin und ZO-1 zeigten in diabetischer humaner Epidermis verglichen mit gesundem Kontrollgewebe eine signifikant oder tendenziell geringere Immunintensität. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde anschließend getestet, ob ein vergleichbarer Unterschied auch auf mRNA-Ebene beobachtet werden konnte. Darüber hinaus erfolgten analoge Untersuchungen an Primärkulturen von humanen Keratinozyten, die zum Teil aus denselben diabetischen und gesunden Geweben isoliert wurden, zum Teil aber auch weitere Gewebe umfassten. Claudin-1-mRNA war in diabetischem verglichen mit gesundem Gewebe auf $60\% \pm 13\%$ vermindert ($p = 0,098$). Diese geringere Expression von Claudin-1-mRNA blieb in kultivierten diabetischen Keratinozyten erhalten ($68\% \pm 8\%$; $p = 0,064$). Für Claudin-4 wies diabetische Haut verglichen mit gesunden Kontrollen eine signifikant verminderte mRNA-Expression auf $56\% \pm 7\%$. Gleiches zeigte sich für den Vergleich von diabetischen zu nicht-diabetischen Keratinozyten in Kultur ($62\% \pm 8\%$). Die Occludin-mRNA war in diabetischen Hautbiopsien signifikant herabreguliert verglichen mit gesunden Kontrollen ($63\% \pm 8\%$), während zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Keratinozyten kein Unterschied bestand. Für ZO-1-mRNA zeigte sich in diabetischem Gewebe und gesunden Kontrollen ein vergleichbares *Expressionslevel*. Diese Beobachtung traf auch auf diabetische und nicht-diabetische Keratinozyten zu (**Abbildung 4.5**).

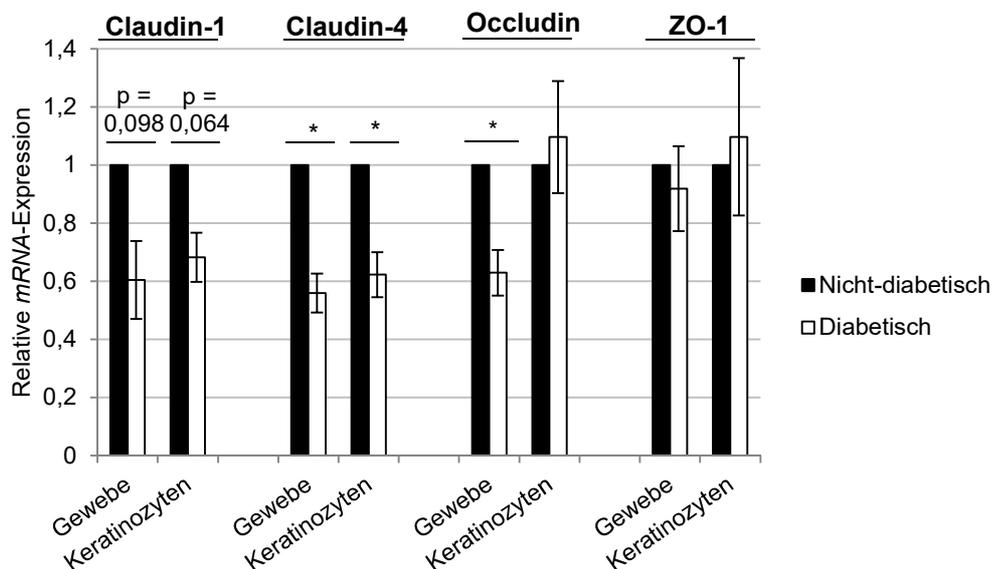


Abbildung 4.5: Genexpression von TJ-Proteinen in humanen Keratinozyten. Relative mRNA-Expression der TJ-Proteine Claudin-1, Claudin-4, Occludin und ZO-1 in humaner diabetischer und gesunder Haut sowie in diabetischen und nicht-diabetischen humanen Keratinozyten ($n = 4$ für nicht-diabetische Gewebe und $n = 3$ für diabetische Gewebe (jeweils in Dreifachbestimmung), $n = 3$ für diabetische und nicht-diabetische Keratinozyten (jeweils in Dreifachbestimmung); Mittelwert \pm Standardfehler; statistisch signifikant mit *: $p < 0,05$ gemäß gepaartem t-Test nach Student).

4.1.3 Die Immunlokalisation und -intensität sowie die Genexpression von Filaggrin in Hautgewebe von Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen

Das *Stratum corneum* als äußerste Schicht der Epidermis ist für die Barrierefunktion der Haut von zentraler Bedeutung. In diesem Zusammenhang spielt das Protein Filaggrin eine entscheidende Rolle. Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten unter Verwendung eines Antikörpers, der sowohl gegen Filaggrin-Vorläufer als auch gegen monomeres Filaggrin gerichtet war (**Abbildung 4.6 A**). Filaggrin war in nicht-diabetischen und in diabetischen Hautbiopsien vorwiegend im *Stratum granulosum* lokalisiert, zum Teil aber auch im oberen *Stratum spinosum*. Die Quantifizierung der Filaggrin-Fluoreszenz im *Stratum granulosum* zeigte keinen Unterschied zwischen Geweben verschiedenen Ursprungs. Im oberen *Stratum spinosum* hingegen wies Haut diabetischen Ursprungs eine tendenziell erhöhte Filaggrin-Immunintensität auf, wobei generell eine hohe Variabilität zwischen den Proben zu beobachten war. (**Abbildung 4.6 B**). Gleichmaßen war auch für das mRNA-Level von Filaggrin in diabetischer Epidermis ein tendenzieller Anstieg erkennbar (**Abbildung 4.6 C**).

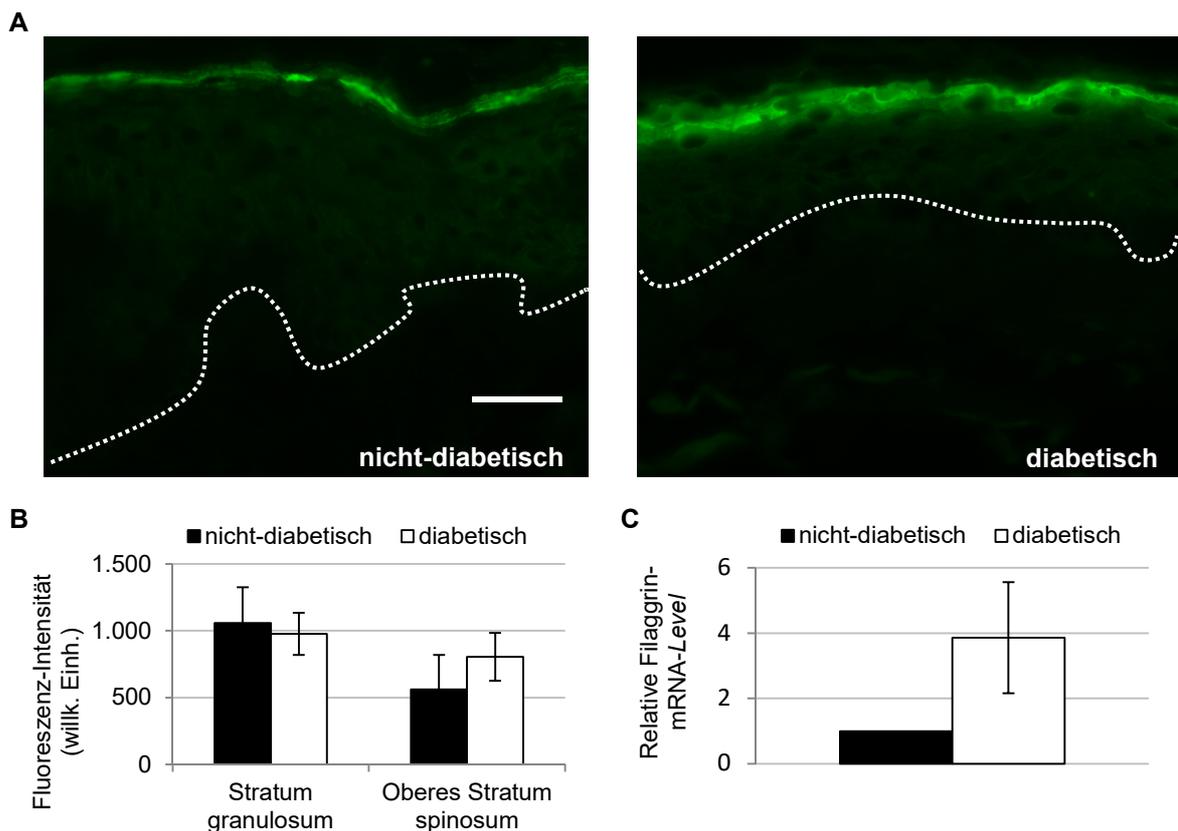


Abbildung 4.6: Immunlokalisation und -intensität sowie die Genexpression von Filaggrin in nicht-diabetischem und diabetischem humanem Gewebe. (A) Exemplarische immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von Filaggrin in nicht-diabetischem und diabetischem humanem Gewebe. Die weißen gepunkteten Linien deuten die Grenze zwischen Epidermis und Dermis an. Längensbalken: 50 µm. (B) Quantifizierung der Fluoreszenzintensität und (C) der mRNA-Level von Filaggrin in diabetischer und nicht-diabetischer Haut (n = 5 für nicht-diabetisches Gewebe, n = 4 für diabetisches Gewebe jeweils mindestens in Doppelbestimmung; Mittelwert ± Standardfehler).

4.1.4 Einfluss des diabetischen Phänotyps auf die physikalische Barriere von humanen Keratinozyten für Ionen sowie für höher- und hochmolekulare Substanzen

Für Haut diabetischen Ursprungs wurden tendenziell bzw. signifikant verminderte mRNA-Level von Claudin-1, Claudin-4 und Occludin sowie eine tendenzielle Erhöhung für Filaggrin im Vergleich zu nicht-diabetischen Geweben beobachtet. Außerdem konnte bei vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass ein siRNA-vermittelter Claudin-1, Claudin-4 oder Occludin-*Knockdown* zu einer eingeschränkten TJ-Barriere in Keratinozyten-Kulturen führte (Kirschner *et al.*, 2013). Darüber hinaus führt der Verlust von Claudin-1 in muriner Haut zur Beeinträchtigung der Hautbarriere (Furuse *et al.*, 2002). Auch die Bedeutung von Filaggrin für die Hautbarriere wurde in der Literatur beschrieben (Sandilands *et al.*, 2009). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde der Fragestellung nachgegangen, ob diabetische im Vergleich zu nicht-diabetischen Keratinozyten Defekte in der Ausbildung einer effektiven Barriere für Ionen und ungeladene Moleküle verschiedener Größe aufweisen.

Die Permeabilität von Keratinozyten für Ionen wurde über die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) bestimmt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zuvor zeigen, dass dieser Widerstand zu frühen Zeitpunkten nach Calcium-*Switch* (bis Tag 4) vor allem die parazelluläre Barriere der *Tight Junctions* widerspiegelt (Kirschner *et al.*, 2013). Zu späteren Zeitpunkten kommt der Beitrag eines präliminären *Stratum corneum* hinzu (Zorn-Kruppa *et al.*, 2015). Parallel dazu wurden Untersuchungen zur Permeation von FITC-assoziierten Dextranen (4 kDa und 40 kDa) durchgeführt, die als Maß für die Durchlässigkeit höher- und hochmolekularer Stoffe herangezogen wurden (Kirschner *et al.*, 2013). Auch ihre Durchlässigkeit ist zu frühen Detektionszeitpunkten ausschließlich durch die TJ-Barriere bedingt, während zu späteren Zeitpunkten der Barriereeffekt des präliminären SC hinzukommt. Die Detektion des TER unmittelbar vor dem Calcium-*Switch* (Tag 0) zeigte keinen relevanten Unterschied zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Keratinozyten. Am ersten Tag nach Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration, die zur Induktion der TJ-Bildung führt, wurde für diabetische Keratinozyten ein signifikant höherer TER im Vergleich zu nicht-diabetischen Keratinozyten beobachtet. Von Tag 3 an bis zum Versuchsende (Tag 8) kehrte sich das Ergebnis um. Für diesen Zeitraum wiesen diabetische verglichen mit nicht-diabetischen Keratinozyten einen signifikant verminderten TER auf. Während diabetische Keratinozyten ihren maximalen TER bereits an Tag 2 erreichten, stieg der TER von nicht-diabetischen Keratinozyten bis zu Tag 6 nach Calcium-*Switch* an und begann erst dann abzufallen (**Abbildung 4.7 A**). Die Analyse zur Permeabilität von FD-4 und FD-40 ergab vor dem Calcium-*Switch* (Tag 0) und einen Tag nach dem Calcium-*Switch* eine erhöhte Permeabilität für beide Moleküle durch Kulturen von nicht-diabetischen im Vergleich zu

diabetischen Keratinozyten. An Tag 2 und 3 nach dem Calcium-Switch war kein Unterschied für FD-4 und FD-40 zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Keratinozyten zu beobachten. Von Tag 4 an bis zum Versuchsende wurde eine signifikant gesteigerte Permeabilität für beide FITC-Dextranmoleküle diabetische Keratinozyten detektiert (**Abbildung 4.7 B, C**).

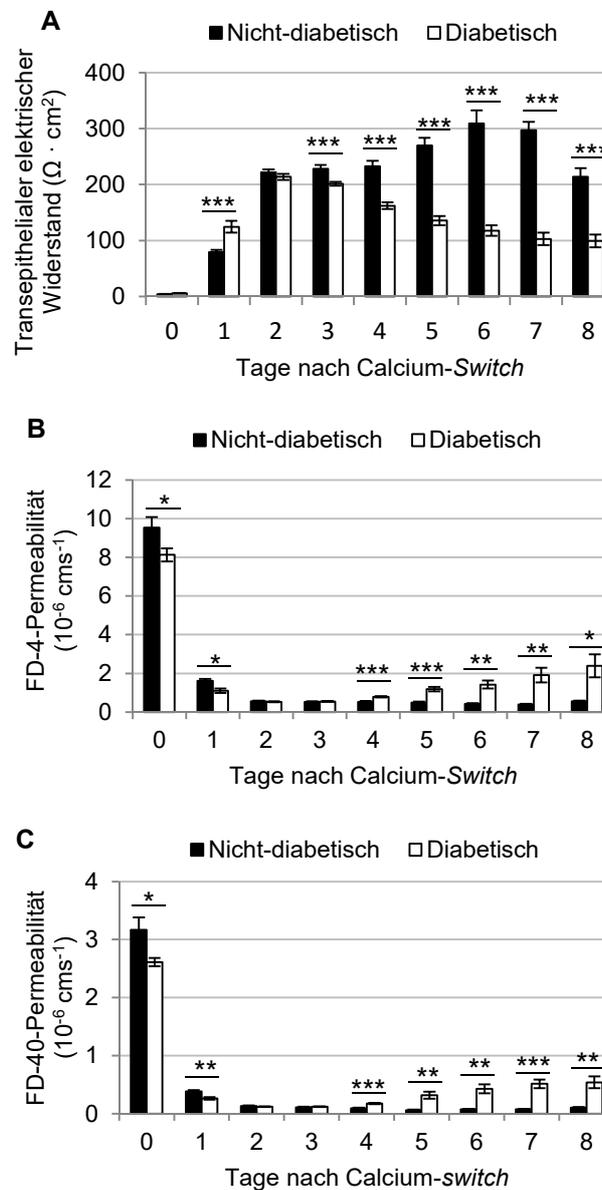


Abbildung 4.7: Permeabilität von Keratinozyten diabetischen Ursprungs für Ionen und für größere Moleküle im Vergleich zu Keratinozyten nicht-diabetischen Ursprungs. (A) Transepithelialer elektrischer Widerstand ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) von Kulturen nicht-diabetischer und diabetischer Keratinozyten zu den angegebenen Zeitpunkten nach Calcium-Switch ($n = 4$ für nicht-diabetische Keratinozyten und $n = 3$ für diabetische Keratinozyten (jeweils in Sechsfachbestimmung); Mittelwert \pm Standardfehler; statistisch signifikant mit *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$). (B, C) Permeabilität ($10^{-6} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$) von Primärkulturen nicht-diabetischer und diabetischer Keratinozyten für (B) FD-4 und (C) FD-40 zu den angegebenen Zeitpunkten nach Calcium-Switch ($n = 4$ für nicht-diabetische Keratinozyten, $n = 3$ für diabetische Keratinozyten jeweils in Dreifachbestimmung; Mittelwert \pm Standardfehler; statistisch signifikant mit *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ gemäß ungepaartem t-Test nach Student).

4.1.5 Auswirkungen von Hyperglykämie und Insulinresistenz auf die Ionenpermeabilität von primären humanen Keratinozyten

Primärkulturen von humanen diabetischen Keratinozyten zeigten ab dem zweiten Tag nach Calcium-*Switch* einen signifikant verminderten TER verglichen mit nicht-diabetischen Keratinozyten. Um mögliche Ursachen für diesen Unterschied aufzuklären, wurden diabetische Bedingungen *in vitro* simuliert. Zu den Charakteristika des Typ-2-Diabetes gehören Hyperglykämie und die Resistenz der Körperzellen gegenüber dem Hormon Insulin. Im Folgenden wurden die Auswirkungen beider Bedingungen jeweils auf den TER adulter, nicht-diabetischer Keratinozyten analysiert.

4.1.5.1 Auswirkungen hyperglykämischer Bedingungen auf die Ionenpermeabilität von Keratinozyten nicht-diabetischen Ursprungs

Um die Auswirkungen einer Hyperglykämie auf den TER humaner, nicht-diabetischer Keratinozyten zu untersuchen, wurden die Zellen unter Normalglukose (6 mM)- und Hochglukose (25 mM)-Bedingungen ausgesät. Nach 48-stündiger Inkubation wurde die Calcium-Konzentration des Kulturmediums erhöht und zeitgleich die Messung des TER gestartet. Die Zellen zeigten an Tag 1 nach dem Calcium-*Switch* einen tendenziell erhöhten TER, wenn sie unter Hochglukose im Vergleich zu Normalglukose kultiviert wurden. An den folgenden vier Tagen wurde kein Unterschied zwischen den zwei Kulturbedingungen beobachtet. Sechs und sieben Tage nach dem Calcium-*Switch* wiesen die Zellen unter hyperglykämischen Bedingungen einen signifikant verminderten TER auf. Auch am letzten Detektionszeitpunkt wiesen die Keratinozyten noch einen tendenziell geringeren TER auf, wenn sie einer erhöhten Glukosekonzentration ausgesetzt waren.

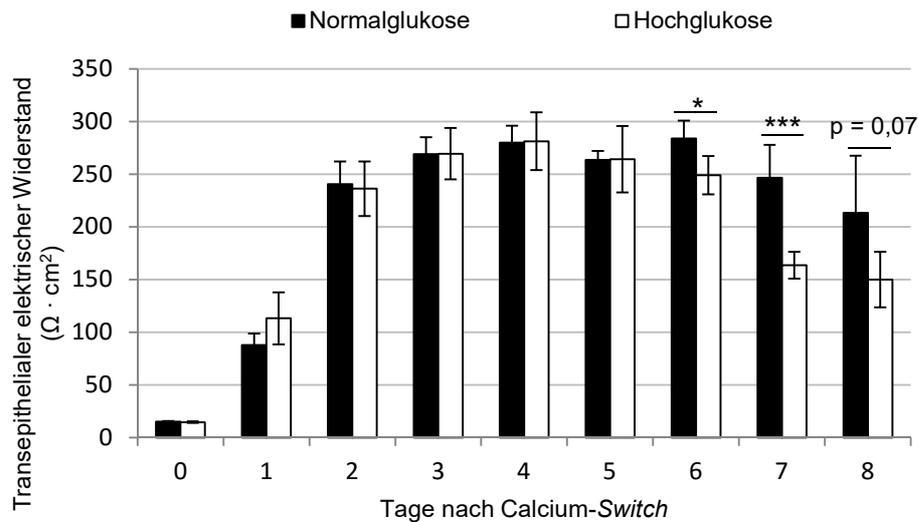


Abbildung 4.8 Einfluss von Hyperglykämie auf den TER von adulten, nicht-diabetischen Keratinozyten. Transepithelialer elektrischer Widerstand von humanen, nicht-diabetischen Keratinozyten, die unter Normalglukose (6 mM) und Hochglukose (25 mM) für 8 Tage kultiviert wurden (n = 4 in Dreifachbestimmung; Mittelwert ± Standardfehler; statistisch signifikant mit *: p < 0,05, ***: p < 0,001 gemäß gepaartem t-Test nach *Student*).

4.1.5.2 Auswirkungen einer in Zellkultur induzierten Insulinresistenz auf die Ionenpermeabilität von Keratinozyten nicht-diabetischen Ursprungs

Eine diabetische Insulinresistenz liegt dann vor, wenn die Zellen des Körpers nicht mehr adäquat auf Insulin ansprechen. Das Hormon vermittelt seine Wirkung über die Bindung an den Insulin-Rezeptor und den *Insulin-like growth factor 1* (IGF-I)-Rezeptor. Zur Nachstellung der Insulinresistenz in Zellkultur musste also die Rezeptorbindung des Hormons verhindert werden. Hierzu wurden rezeptorspezifische Antagonisten verwendet, deren Wirksamkeit über das Protein-Level von aktivierter, d. h. phosphorylierter, Akt bestimmt wurde.

4.1.5.2.1 Antagonisierung des Insulin-Rezeptors

Zur Hemmung der Signaltransduktion über den Insulinrezeptor wurde der spezifische Antagonist S961 der Firma *Phoenix Pharmaceuticals* in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt, die bei *In-vivo*-Versuchen an Ratten typische Charakteristika des *Diabetes mellitus* Typ 2 induzierte (Vikram und Jena, 2010).

Zur Bestimmung des Einflusses von S961 auf den TER wurde parallel zur Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration 48 Stunden nach der Zellaussaat auch die Behandlung

mit dem Insulinrezeptor-Antagonisten begonnen. Daneben wurden Lösungsmittelkontrollen sowie unbehandelte Zellen mitgeführt. Der Antagonist wurde beim täglichen Mediumwechsel erneut zugesetzt, die Messung des TER erfolgte für insgesamt acht Tage nach dem Calcium-Switch. S961-behandelte Zellen zeigten im Vergleich zu beiden Kontrollen über die gesamte Versuchsdauer keinen Unterschied in der Höhe des TER (**Abbildung 4.9**).

Parallel dazu wurde seine Wirksamkeit auf Proteinebene überprüft. Hierbei zeigten die Versuchszellen nach Behandlung mit S961 einen tendenziell verminderten Umfang von phosphoryliertem Akt im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (**Abbildung 4.10**). Dies kann als Blockade der insulinvermittelten Signaltransduktion gewertet werden. Auch die Gesamtprotein-Level aus phosphorylierter und unphosphorylierter Form der zwei Proteinkinasen waren signifikant bzw. tendenziell herunterreguliert.

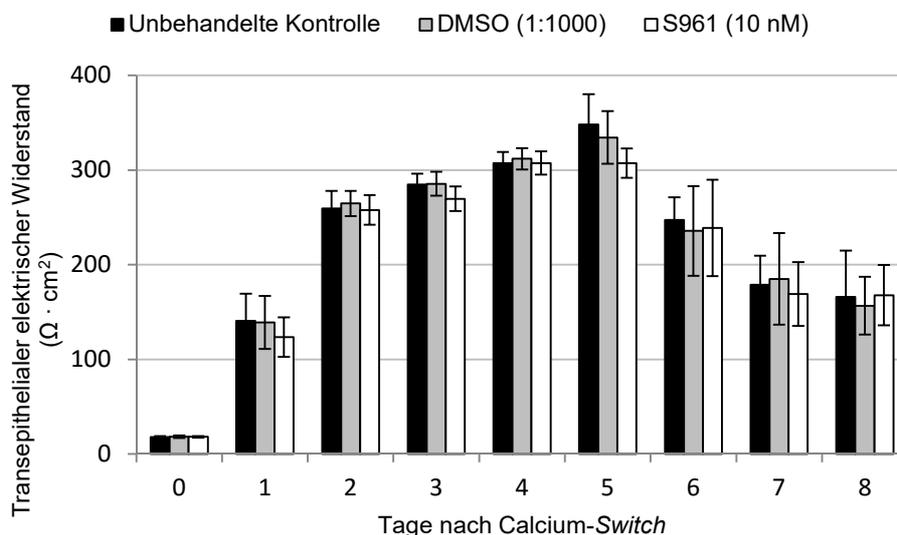


Abbildung 4.9: Auswirkungen der Antagonisierung des Insulin-Rezeptors auf den TER von humanen Keratinozyten mittels S961. Transepithelialer elektrischer Widerstand als Maß für die Ionenpermeabilität von humanen, nicht-diabetischen Keratinozyten, die mit S961 (10 nM mit DMSO 1:1000 in Medium) und mit DMSO (1:1000 in Medium) behandelt wurden, zu den angegebenen Zeitpunkten nach Calcium-Switch. Eine unbehandelte Kontrolle wurde zusätzlich berücksichtigt (n = 3 jeweils mindestens in Doppelbestimmung; Mittelwert ± Standardfehler).

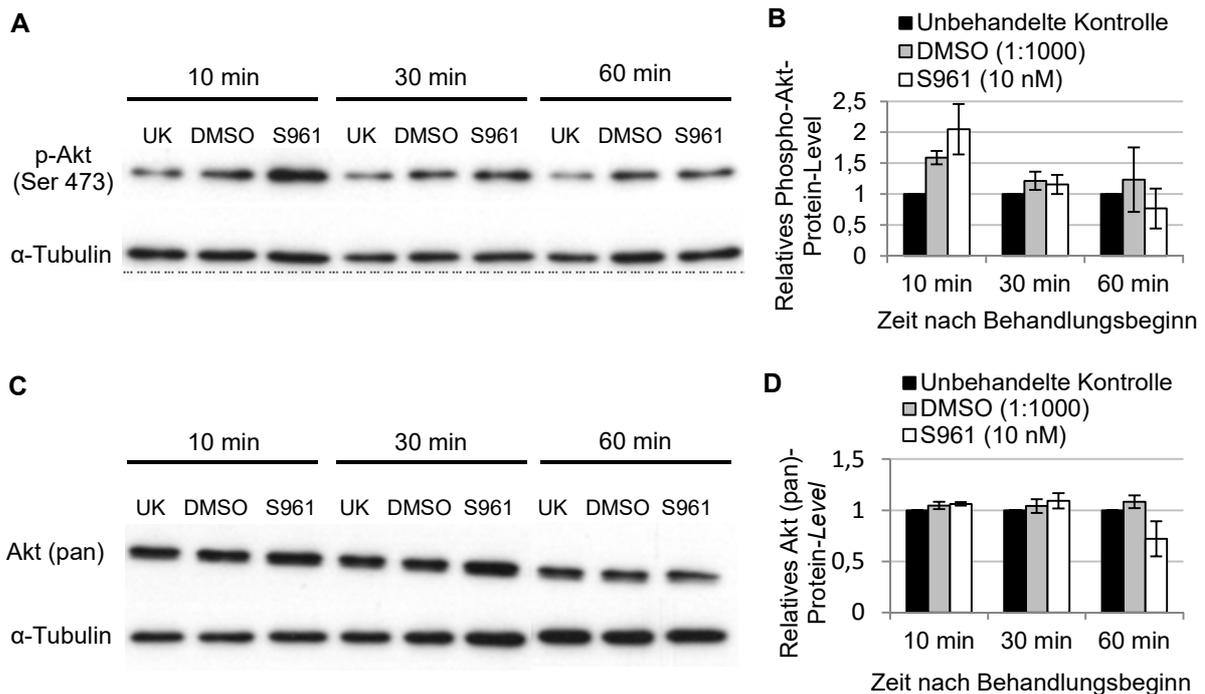


Abbildung 4.10: Auswirkungen der Antagonisierung des Insulin-Rezeptors mittels S961 auf die intrazelluläre Signaltransduktion von primären humanen Keratinozyten. (A-D) Exemplarische *Western Blots* für die Protein-Level von (A) p-Akt und (C) Akt (pan) in humanen Keratinozyten, die für 10 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten mit S961 und DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt wurden. Eine unbehandelte Kontrolle wurde jeweils berücksichtigt. Als Ladungskontrolle wurde α -Tubulin verwendet. UK = Unbehandelte Kontrolle. (B, D) Densitometrische Auswertung der *Western-Blot*-Analysen mit Zellen von verschiedenen Spendern. Die Zielproteine (B) p-Akt (Ser 473) und (D) Akt (pan) wurde gegen α -Tubulin normalisiert. Die Protein-Level von unbehandelten Zellen wurden zu jedem Zeitpunkt auf 100 % gesetzt (n = 3; Mittelwerte \pm Standardfehler; statistisch signifikant mit *: p < 0,05 gemäß gepaartem t-Test nach *Student* mit anschließender *Bonferroni*-Korrektur für Mehrfachvergleiche).

4.1.5.2.2 Gleichzeitige Antagonisierung des Insulin-Rezeptors und des IGF-1-Rezeptors

Insulin vermittelt seine Wirkung nicht nur über den Insulin-Rezeptor, sondern auch über den IGF-1-Rezeptor, wenn auch die Bindung an letzteren mit 1000-fach geringerer Affinität erfolgt (Kurtzhals *et al.*, 2000). Für die Untersuchung der Insulinresistenz ist somit auch die Blockierung des IGF-1-Rezeptors von Interesse. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des IGF-1-Rezeptors durch den Insulin-Rezeptor kompensiert wird (Buck *et al.*, 2010; Weinstein *et al.*, 2014). Deshalb wurde von einer Analyse des transepithelialen elektrischen Widerstandes abgesehen, bei der ausschließlich der IGF-1-Rezeptor blockiert ist. Stattdessen wurden die Auswirkungen einer gleichzeitigen Inhibition des Insulin-Rezeptors und des IGF-1-Rezeptors auf den TER von adulten, nicht-diabetischen Keratinozyten untersucht. Gemäß Blum *et al.* wurde hierzu der kompetitive

Inhibitor Tyrphostin AG 538 der Firma Merck Millipore in einer Konzentration von 25 μM eingesetzt (Blum *et al.*, 2000).

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen nach Calcium-Switch. Parallel zur Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration wurde ebenfalls die Behandlung mit Tyrphostin AG 538 gestartet. Die gleichzeitige Inhibition beider Rezeptoren führte ab Tag 1 bis zum Versuchsende an Tag 5 nach Calcium-Switch zu einem signifikant verminderten TER im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) sowie zur unbehandelten Kontrolle (**Abbildung 4.11**). Auf Proteinebene äußerte sich der Effekt von 25 μM Tyrphostin AG 538 in einer reduzierten Expression von Akt (pan) sowie der phosphorylierten Form Phospho-Akt (Ser 473) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (**Abbildung 4.12**).

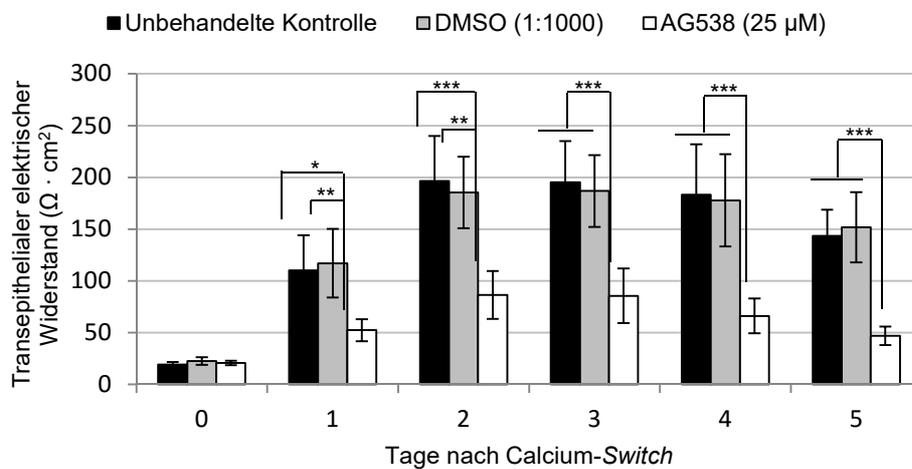


Abbildung 4.11: Auswirkungen der gleichzeitigen Antagonisierung des Insulinrezeptors und des IGF-1-Rezeptors auf den TER von humanen Keratinozyten mittels AG538. Transepithelialer elektrischer Widerstand humaner, nicht-diabetischer Keratinozyten, die mit AG538 (25 μM mit DMSO 1:1000 in Medium) und DMSO (1:1000 in Medium) behandelt wurden, zu den angegebenen Zeitpunkten nach Calcium-Switch. Eine unbehandelte Kontrolle wurde zusätzlich berücksichtigt ($n = 3$ jeweils mindestens in Doppelbestimmung; Mittelwert \pm Standardfehler; statistisch signifikant mit *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ gemäß gepaartem t-Test nach Student mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche).

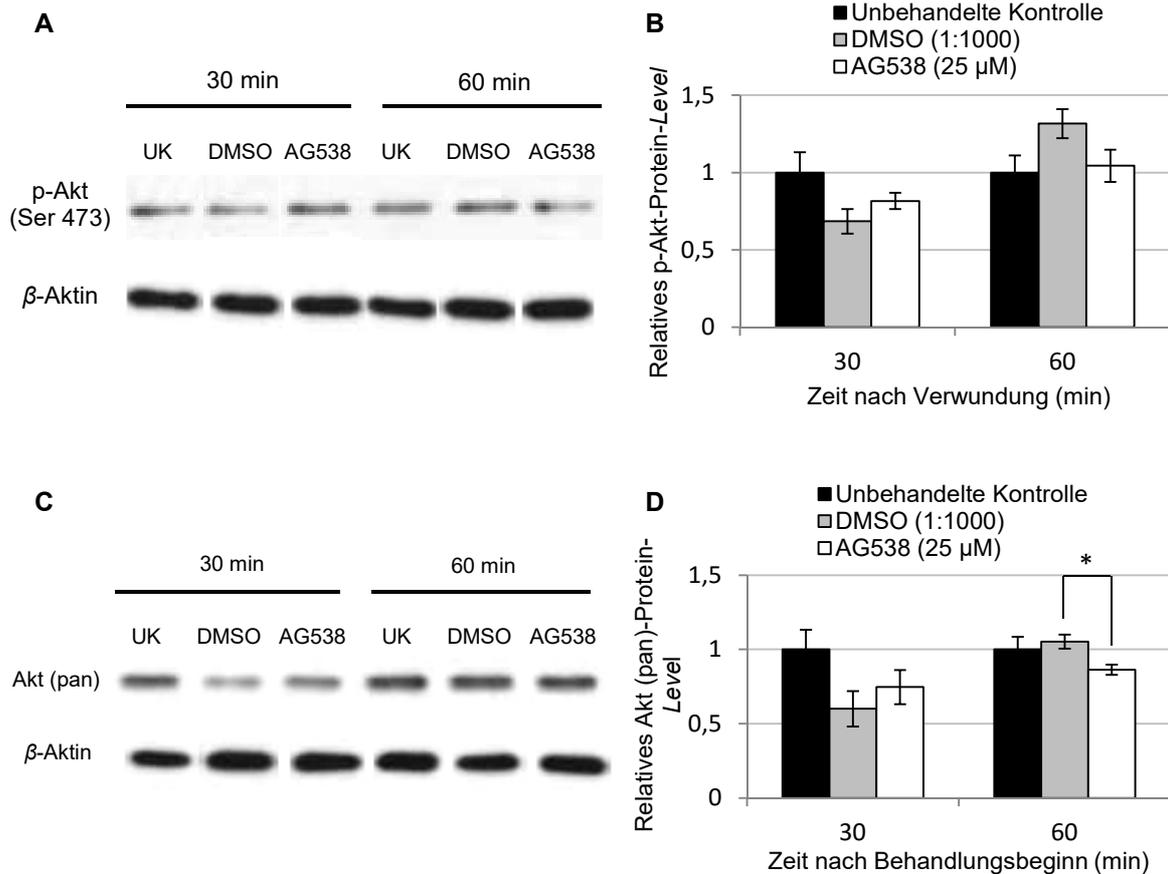


Abbildung 4.12: Auswirkungen einer gleichzeitigen Antagonisierung des Insulin- und IGF-I-Rezeptors mittels AG538 auf die intrazelluläre Signaltransduktion von primären humanen Keratinozyten. (A-D) Exemplarische *Western Blots* für die Protein-Level von (A) p-Akt und (C) Akt (pan) in humanen Keratinozyten, die für 30 Minuten und 60 Minuten mit AG538 und DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt wurden. Eine unbehandelte Kontrolle (UK) wurde jeweils berücksichtigt. Als Ladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet. (B, D) Densitometrische Auswertung der *Western-Blot*-Analysen mit Zellen von verschiedenen Spendern. Die Zielproteine (B) p-Akt (Ser 473) und (D) Akt (pan) wurde jeweils gegen β -Aktin normalisiert. Die Protein-Level von unbehandelten Zellen wurden zu jedem Zeitpunkt auf 100 % gesetzt (n = 3; Mittelwerte \pm Standardfehler; statistisch signifikant mit *: $p < 0,05$ gemäß gepaartem t-Test nach *Student* mit anschließender *Bonferroni*-Korrektur für Mehrfachvergleiche).

4.2 Dermisstruktur und *Diabetes mellitus*

Da ein funktionales Bindegewebe entscheidend für die Integrität der Haut ist, wurden Abweichungen von seiner normalen Organisation mit pathogenen Symptomen des *Diabetes mellitus* in Verbindung gebracht (**siehe Kapitel 1: Einleitung 1.4.3**). Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen die Expression von Proteinen, die wichtig für die Dermisstruktur sind, untersucht, zum anderen die räumliche Ausrichtung von Kollagen- und Elastinfasern in der Dermis humaner diabetischer Haut und gesunder Kontrollbiopsien bestimmt, um so Rückschlüsse auf die Integrität der Haut ziehen zu können. Anschließend wurde versucht, die beobachteten Unterschiede mit porcinem Gewebe nachzustellen, wenn die Biopsien unter hyperglykämischen im Vergleich zu euglykämischen Bedingungen inkubiert wurden.

4.2.1 Genexpression verschiedener Strukturproteine in der Dermis humaner Haut

Fibroblasten sind als häufigste Zellpopulation in der Dermis humaner Haut maßgeblich für die Produktion dermalen Strukturproteine verantwortlich. Ihre Genexpression für Kollagen I (α 1-Kette), Kollagen V (α 2-Kette), Elastin, Fibrillin-1 und Fibronectin in der Dermis von diabetischer und gesunder Haut wurde mithilfe eines *Fluidigm® Dynamic Array* untersucht. Die vergleichende Analyse erfolgte unter Verwendung der in **Tabelle 2.14** aufgeführten Gewebebiopsien.

Generell zeigte sich ein heterogenes Bild bezüglich der verschiedenen Lokalisationen und untersuchten Proteine. Für die zwei Kollagenmoleküle (Kollagen I, α 1 und Kollagen V, α 2) waren die mRNA-Level in diabetischer Dermis von Zehnrücken und Wange verringert, während in diabetischem Oberschenkelgewebe ein deutlich erhöhtes mRNA-Level gefunden wurde. In Unterschenkelgewebe verschiedenen Ursprungs wurden keine Expressionsunterschiede detektiert. Bezüglich Elastin wies diabetisches Gewebe bei drei von vier Körperlokalisationen ein deutlich vermindertes mRNA-Level auf. Nur im Oberschenkel wurde eine mehr als 10-fach erhöhte Genexpression beobachtet. Auch für Fibronectin wurde mit Ausnahme der Lokalisation Oberschenkel eine einheitliche Abnahme der Genexpression in diabetischer Haut beobachtet. Das mRNA-Level von Fibrillin-1 waren für drei Lokalisationen erhöht, einzig in der diabetischen Wange zeigte sich im Vergleich zur gesunden Kontrolle ein vermindertes Fibrillin-1-mRNA-Level (**Tabelle 4.1**).

Tabelle 4.1: Genexpression ausgewählter Strukturproteine in der Dermis von diabetischem im Vergleich zu nicht-diabetischem Gewebe

Gewebe-lokalisierung	n-fache Erhöhung in diabetischem Gewebe				
	Kollagen I, $\alpha 1$	Kollagen V, $\alpha 2$	Elastin	Fibrillin-1	Fibronectin
Oberschenkel	5,32	3,98	10,33	1,86	3,17
Zehnrücken	0,56	0,56	0,09	1,33	0,40
Unterschenkel	1,12	0,91	0,56	1,27	0,81
Wange	0,34	0,48	0,48	0,59	0,68

4.2.2 Orientierung von Kollagen- und Elastinfasern in der Dermis humaner Haut

Die Untersuchung von Kollagen- und Elastinfasern wurde mithilfe der 2-Photonen-Mikroskopie durchgeführt. Hierbei waren die Eigenschaft von Kollagen zur Erzeugung eines SHG-Signals sowie die Fähigkeit von Elastin zur Autofluoreszenz die Voraussetzung dafür, um die Faserproteine detektieren und *in situ* darstellen zu können. Von dem zu analysierenden Gewebe wurden 60 μm dicke Horizontalschnitte ausgehend von der Hautoberfläche angefertigt. Die mikroskopische Untersuchung von humanen Biopsien umfasste drei Schnitttiefen (180 bis 240 μm , 240 bis 300 μm , 300 bis 360 μm), die vom oberen bis ins mittlere *Stratum reticulare* reichten. Hierfür standen Gewebe von vier Diabetikern sowie von vier gesunden Spendern zur Verfügung. An die vergleichende Analyse war die Bedingung geknüpft, dass jeweils eine diabetische und eine nicht-diabetische Probe aus demselben Körperbereich stammten. Hinsichtlich Alter und Geschlecht der Spender wurde ebenfalls - soweit möglich - auf Übereinstimmung geachtet (siehe Kapitel 2: Tabelle 2.14). Die Auswertung der mikroskopischen Messungen erfolgte unter Verwendung des *ImageJ*-Zusatzmoduls *Directionality*. Hierbei entsprachen vertikal zur Hautoberfläche ausgerichtete Fasern einem Winkel von 90°, während horizontal orientierte Fasern durch einen Winkel von 0° kodiert waren. Schräg gelagerte Fasern wurden entsprechend durch Winkel zwischen 0 und 90° wiedergegeben (siehe Kapitel 3: Abbildung 3.9).

4.2.2.1 Räumliche Ausrichtung von Kollagen- und Elastinfasern in humanem Gewebe diabetischer Spender im Vergleich zu gesunden Kontrollen

In diabetischen Hautbiopsien wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine veränderte Orientierung von Kollagenfasern beobachtet. In gesunder Haut zeigte sich ein Übergewicht von vertikalen im Vergleich zu horizontalen Orientierungen. In diabetischer Haut konnten zwei verschiedene Arten von Veränderungen detektiert werden. Zum einen wurden ein Verlust von vertikalen Fasern und eine Zunahme von schrägen und horizontalen Fasern gefunden. In der zweiten Gruppe wurden ein im Vergleich zu gesunder Haut noch stärkeres Überwiegen von vertikalen Fasern und eine entsprechende Abnahme schräger und horizontaler Fasern detektiert (**Abbildung 4.13 A, B**).

Für Elastinfasern zeigte die Analyse des nicht-diabetischen und des diabetischen Gewebes eine relativ gleichmäßige Verteilung aller Orientierungen von Elastinfasern. Ausschließlich für die Lokalisation Wange wurde in diabetischer im Vergleich zu gesunder Haut eine deutliche Zunahme von vertikalen Fasern beobachtet (**Abbildung 4.14 A, B**).

Eine alternative Darstellungsweise der Ergebnisse (**Abbildung 4.13 C, D** für Kollagenfasern und **Abbildung 4.14 C, D** für Elastinfasern) ermöglichte die Varianzen der Faserpolaritäten in nicht-diabetischem mit denen in diabetischem Hautgewebe zu vergleichen. Hierbei wurde eine signifikant höhere Variabilität von Kollagenfaserorientierungen in diabetischem Hautgewebe verglichen mit gesunden Kontrollen gefunden ($p = 0,014$) (**Abbildung 4.13 E**). Für Elastinfasern waren die Veränderungen für Gewebe verschiedenen Ursprungs minimal und daher nicht signifikant (**Abbildung 4.14 E**).

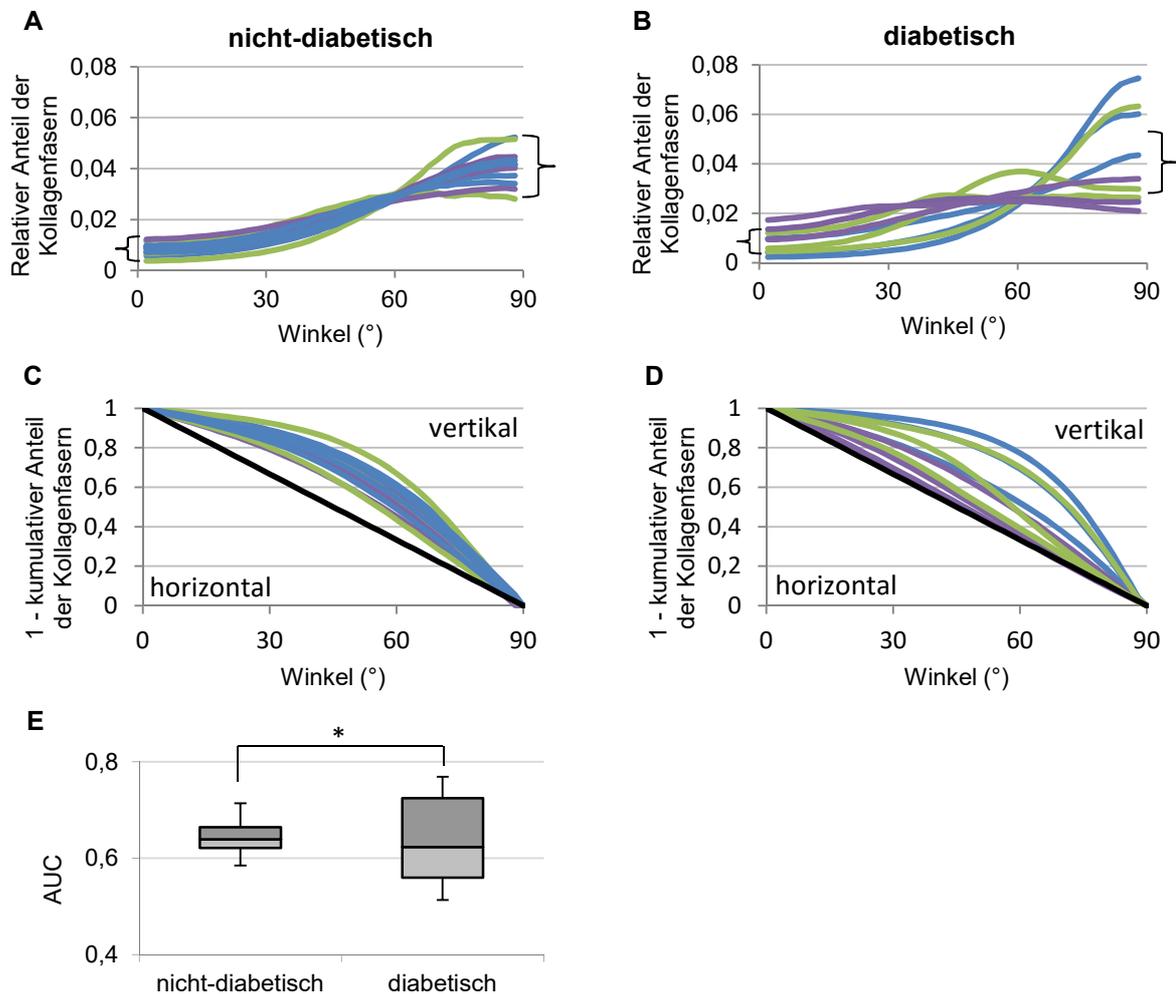


Abbildung 4.13: Orientierung von Kollagenfasern in humanem Gewebe. (A, B) Relativer Anteil der Kollagenfasern für jede Orientierung (kodiert durch Winkel von 0° für horizontale Fasern bis 90° für senkrechte Fasern) in (A) nicht-diabetischem und (B) diabetischem humanem Gewebe. Die Klammern geben den Bereich des Anteils horizontaler (0°) bzw. vertikaler (90°) Fasern in nicht-diabetischem Gewebe an. (C, D) 1 - kumulativer Anteil der Kollagenfasern für jede Orientierung in (C) nicht-diabetischem und (D) diabetischem Gewebe. Die schwarze Diagonale beschreibt den Fall, wenn alle Orientierungen, d. h. alle Winkel, zu gleichen Anteilen vorkommen. Bei Kurvenverläufen oberhalb der Diagonalen liegt ein Übergewicht an vertikalen Fasern vor, während bei Kurvenverläufen unterhalb der Diagonalen horizontal ausgerichtete Fasern dominieren. Verschiedene Farben in einem Diagramm deuten auf unterschiedliche Gewebe hin mit Oberschenkel I und II (blau), Unterschenkel (lila) und Wange (grün). (E) Boxplot der AUC-Werte für die in C und D dargestellten Kurvenverläufe mit Median, zweitem und drittem Quantil sowie Minimal- und Maximalwert (n = 4 für nicht-diabetische und n = 3 für diabetische Gewebe mit jeweils drei Schnitttiefen; *: statistisch signifikant gemäß *Levene*-Test auf Homogenität der Varianzen).

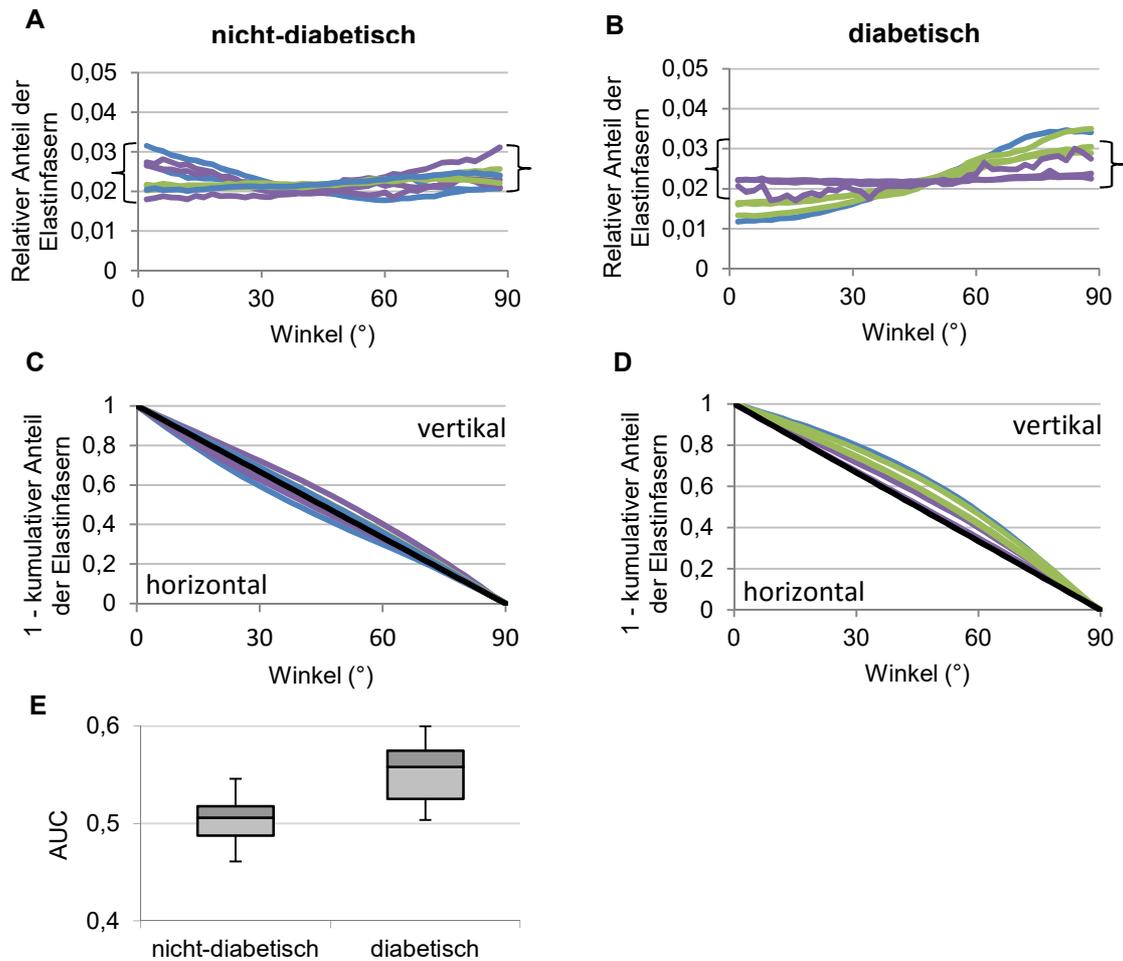


Abbildung 4.14: Orientierung von Elastinfasern in humanem Gewebe. Relativer Anteil der Elastinfasern für die verschiedenen Orientierungen in (A) nicht-diabetischem und (B) diabetischem humanem Gewebe. Die Klammern geben den Bereich des Anteils horizontaler (0°) bzw. vertikaler (90°) Fasern in nicht-diabetischem Gewebe an. (C, D) 1 - kumulativer Anteil der Elastinfasern für jede Orientierung in (C) nicht-diabetischem und (D) diabetischem Gewebe. Die schwarze Diagonale beschreibt den Fall, wenn alle Orientierungen, d. h. alle Winkel, zu gleichen Anteilen vorkommen. Bei Kurvenverläufen oberhalb der Diagonalen liegt ein Übergewicht an vertikalen Fasern vor, während bei Kurvenverläufen unterhalb der Diagonalen horizontal ausgerichtete Fasern dominieren. Verschiedene Farben in einem Diagramm deuten auf unterschiedliche Gewebe hin mit Oberschenkel I und II (blau), Unterschenkel (lila) und Wange (grün). (E) *Boxplot* der AUC-Werte für die in C und D dargestellten Kurvenverläufe mit Median, zweitem und drittem Quantil sowie Minimal- und Maximalwert (n = 4 für nicht-diabetisches Gewebe mit Oberschenkel I: 2 Schnitttiefen (180 bis 240 µm, 300 bis 360 µm), Oberschenkel II: 1 Schnitttiefe (180 bis 240 µm) sowie Unterschenkel und Wange: jeweils 3 Schnitttiefen; n = 3 für diabetisches Gewebe mit Oberschenkel I: 1 Schnitttiefe (240 - 300 µm) sowie Unterschenkel und Wange: jeweils 3 Schnitttiefen).

4.2.3 Polaritäten von Kollagen- und Elastinfasern in porcinem Gewebe nach Kultivierung unter hyperglykämischen im Vergleich zu euglykämischen Bedingungen

Vor allem für Kollagenfasern wurden veränderte Ausrichtungen in diabetischer verglichen mit nicht-diabetischer humaner Haut beobachtet. Basierend auf der Tatsache, dass die

beobachteten Unterschiede mit der Pathogenese diabetischer Komplikationen assoziiert sein können, wurde beabsichtigt, vergleichbare Änderungen mit porcinem Gewebe nachzustellen. Ein solches *Ex-vivo*-Modell sollte dazu dienen, die Wirkung von Substanzen auf die Dermisstruktur zu untersuchen. Hierzu wurden Stanzbiopsien unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen inkubiert. Parallel dazu wurden hyperosmolare Kontrollen mitgeführt. Weiterhin erfolgte die Analyse nativer Stanzen, um auszuschließen, dass bereits die Kultivierung per se zu Verschiebungen der Faserpolaritäten führt. Die Kriterien zur Etablierung des Modells waren dann erfüllt, wenn die Faserverteilung unter euglykämischen Bedingungen die in gesunder humaner Haut widerspiegelte und hyperglykämische Kulturbedingungen zu einer Faserverteilung führten, die der in humanem diabetischem Gewebe entsprach. Die Analyse erfolgte mithilfe der 2-Photonen-Mikroskopie analog zu der für humanes Gewebe, beschränkte sich hier allerdings auf eine Schnitttiefe von 240 bis 300 µm.

Für Kollagenfasern zeigte sich, dass hyperglykämische zu keiner klaren Veränderung der Orientierung führten (**Abbildung 4.15**). Generell war die Ausrichtung der Kollagenfasern ähnlich der gesunden humanen Haut, wenn auch mit einer etwas größeren Variabilität des Anteils vertikaler Fasern. Für hyperosmolare Bedingungen wurde eine teilweise Veränderung wie in diabetischer Haut beobachtet.

Bezüglich der Orientierung von Elastinfasern konnte kein Unterschied zwischen nativen Stanzen und solchen, die unter euglykämischen Bedingungen inkubiert wurden, festgestellt werden. Diese Beobachtung wies daraufhin, dass die Kultivierung der Stanzen an sich keine Veränderung der Faserpolarität herbeiführte. In beiden Fällen konnten die Ergebnisse in zwei Gruppen zusammengefasst werden. Zum einen zeigte sich ein Übergewicht vertikaler Ausrichtungen mit einem entsprechend geringen Anteil horizontal orientierter Fasern, zum anderen der umgekehrte Fall. Unter hyperglykämischen Bedingungen wurde eine deutliche Veränderung der Faserausrichtung im Vergleich zu euglykämischen Bedingungen beobachtet. Diese Veränderung war charakterisiert durch ein ausgewogenes Verhältnis von horizontalen und vertikalen Fasern. Gleiches traf auch auf die hyperosmotischen Kontrollen zu, was daraufhin deutete, dass die Veränderung osmotisch bedingt sein könnte (**Abbildung 4.16**).

Wurde der Vergleich der Elastinfaserverteilung zu humanem Gewebe angestellt, zeigten sich allerdings für native Stanzen und solche unter euglykämischen Bedingungen bei der überwiegenden Zahl an Individuen stark unterschiedliche Faserorientierungen im Vergleich zu nicht-diabetischer humaner Haut. Hyperglykämische und hyperosmotische Bedingungen führten dagegen in manchen, wenn auch nicht allen Fällen, zu Ausrichtungen, wie sie in nicht-diabetischer humaner Haut beobachtet wurden.

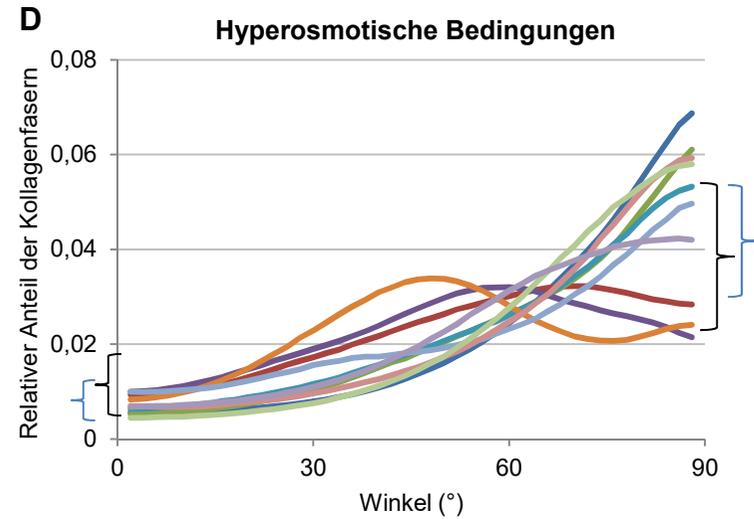
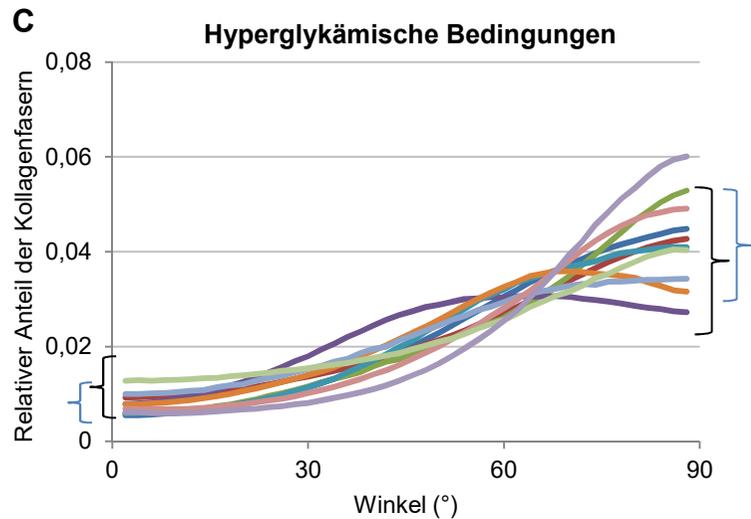
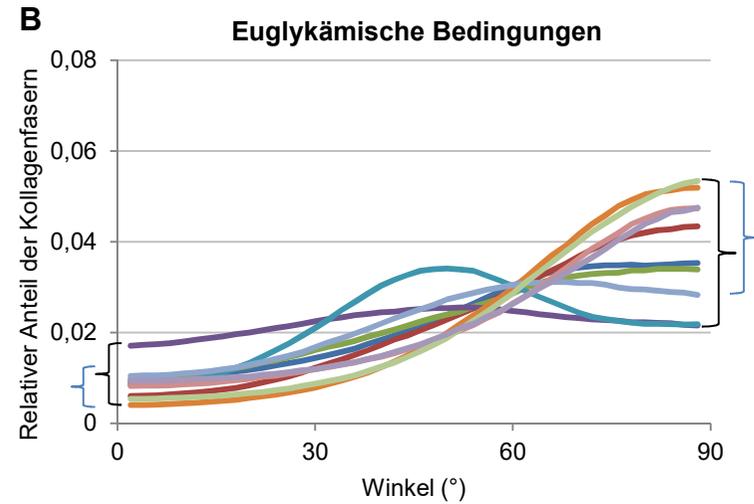
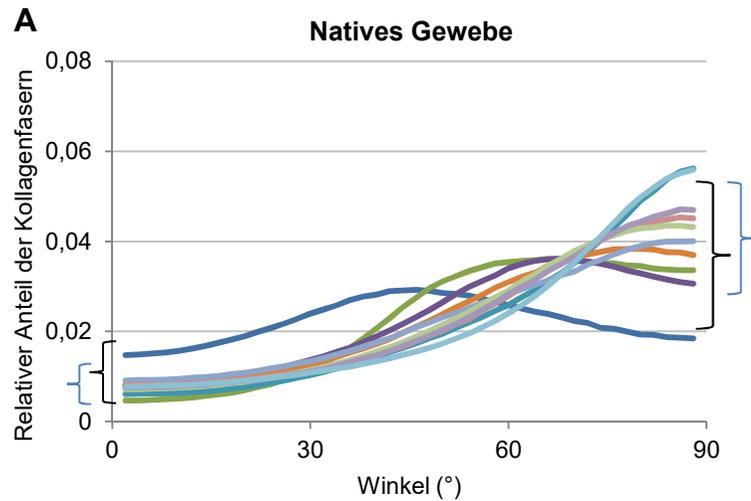


Abbildung 4.15: Orientierung von Kollagenfasern in porcinem Gewebe. Relativer Anteil der Kollagenfasern für die verschiedenen Orientierungen in porcinem Gewebe, das (A) nicht, (B) unter euglykämischen Bedingungen, (C) unter hyperglykämischen Bedingungen und (D) unter hyperosmotischen Bedingungen kultiviert wurde. Die Klammern geben den Bereich des Anteils horizontaler (0°) bzw. vertikaler (90°) Fasern unter euglykämischer Kultivierung (schwarz) bzw. in humanem, nicht-diabetischem Gewebe (blau) an (n = mindestens 10).

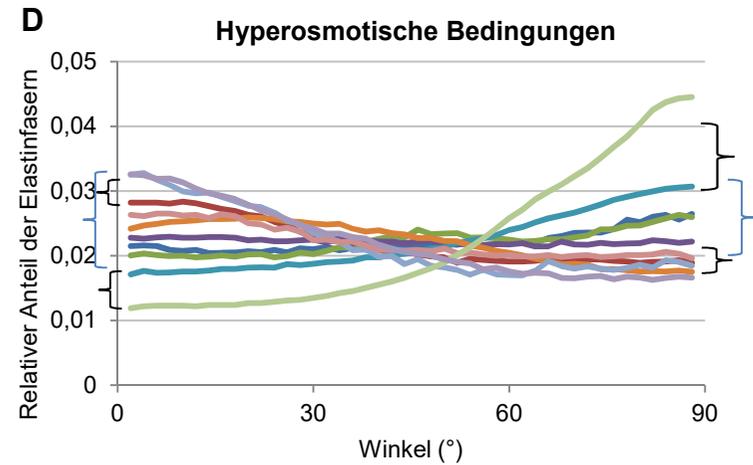
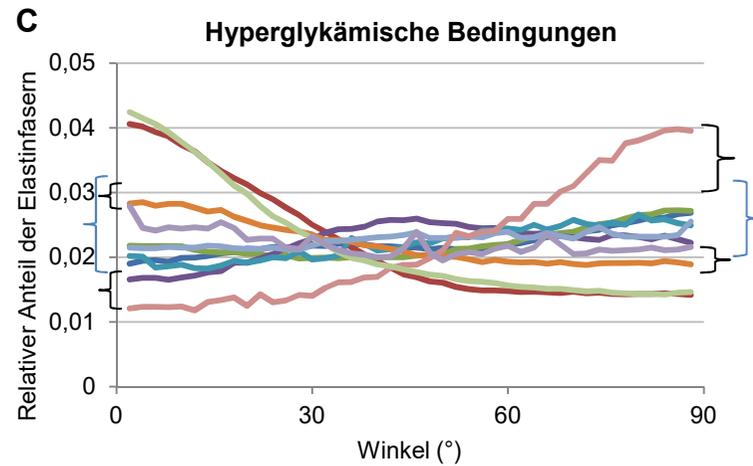
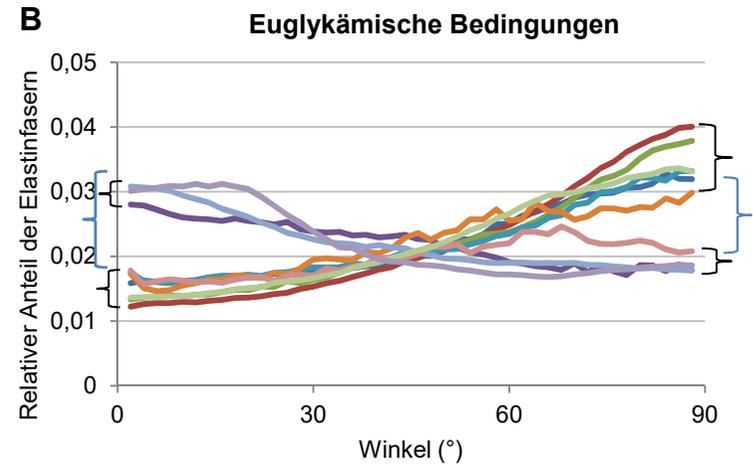
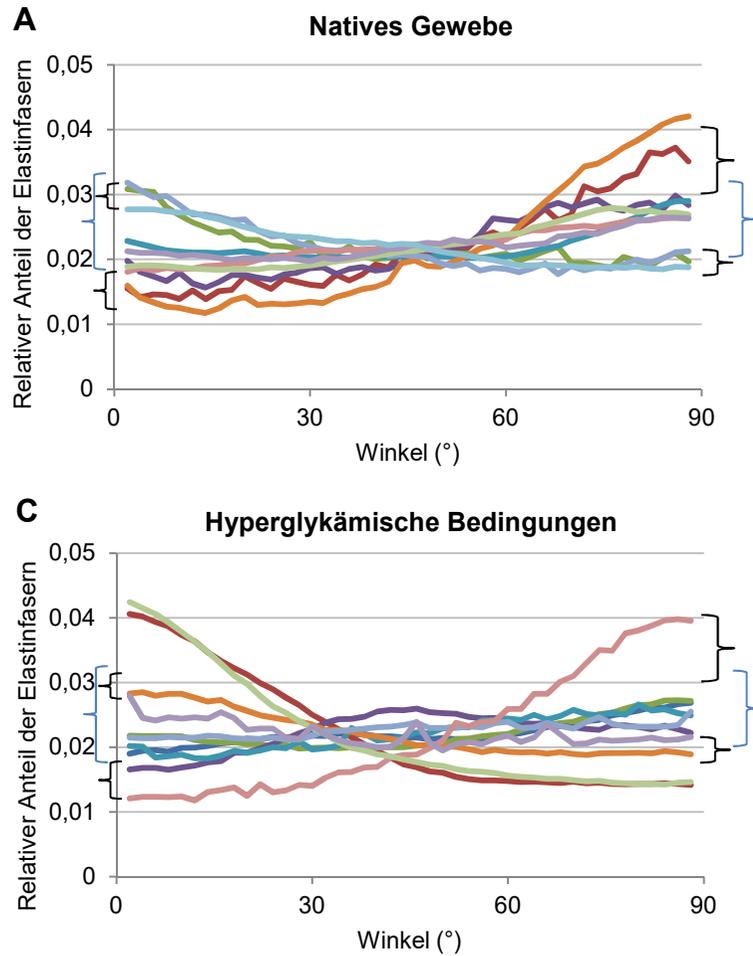


Abbildung 4.16: Orientierung von Elastinfasern in porcinem Gewebe. Relativer Anteil der Elastinfasern für die verschiedenen Orientierungen in porcinem Gewebe, das (A) nicht, unter (B) euglykämischen Bedingungen, (C) hyperglykämischen Bedingungen und (D) hyperosmotischen Bedingungen kultiviert wurde. Die Klammern geben den Bereich des Anteils horizontaler (0°) bzw. vertikaler (90°) Fasern unter euglykämischer Kultivierung (schwarz) bzw. in humanem, nicht-diabetischem Gewebe (blau) an (n = mindestens 10).

4.3 Wundheilung und *Diabetes mellitus*

Zu den kutanen Komplikationen bei Typ-2-Diabetikern gehört häufig eine beeinträchtigte Wundheilung (Rosenberg 1990; Terranova 1991; Brem und Tomic-Canic, 2007). In diesem Abschnitt wurde untersucht, inwieweit Veränderungen von TJ-Proteinen und *Gap-Junction*-Proteinen dazu beitragen könnten, und ob der Triterpenextrakt (TE) die diabetische Wundheilung fördern könnte.

4.3.1 *Tight-Junction*-Proteine in der diabetischen Wundheilung

Unter 4.1.1.1 und 4.1.2 wurden in der Haut von Diabetikern und in Keratinozyten diabetischen Ursprungs Veränderungen von TJ-Proteinen auf Protein- und mRNA-Ebene beobachtet. Da Volksdorf *et al.* (eingereicht) eine Rolle für Claudin-1 und Occludin in der chronischen Wunde aufzeigen konnten, erschien der Vergleich von Keratinozyten diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs hinsichtlich der Genexpression von TJ-Proteinen unter Wundheilungsbedingungen als vielversprechend.

4.3.1.1 Genexpression von TJ-Proteinen in humanen diabetischen und nicht-diabetischen Keratinozyten unter Wundheilungsbedingungen

Die *In-vitro*-Analyse zur mRNA-Expression von Claudin-1, Claudin-4, Occludin und ZO-1 in diabetischen und nicht-diabetischen humanen Keratinozyten unter Wundheilungsbedingungen erfolgte im Vergleich zum unverwundeten Zustand, der unter 4.1.2 beschrieben wurde. Nach 6 Stunden unter Wundheilungsbedingungen wurde für Claudin-1 sowohl in diabetischen als auch in nicht-diabetischen Keratinozyten eine signifikante Steigerung der Genexpression beobachtet, nach 24 Stunden war dies nur in Keratinozyten nicht-diabetischen Ursprungs der Fall (**Abbildung 4.17 A**).

Die mRNA-Level von Claudin-4 waren 6 Stunden nach Verwundung in nicht-diabetischen Keratinozyten signifikant herunterreguliert. Dagegen zeigte sich nach 24 Stunden unter Wundheilungsbedingungen eine signifikante Erhöhung der Claudin-4-mRNA-Level. Diabetische Keratinozyten hingegen wiesen keine Veränderungen der Claudin-4-Genexpression gegenüber unverwundeten Bedingungen auf (**Abbildung 4.17 B**).

Für Occludin zeigte sich unter Wundheilungsbedingungen nur in nicht-diabetischen Zellen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression (**Abbildung 4.17 C**). Die ZO-1-mRNA-Level waren in nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten 6 Stunden nach Verwundung tendenziell heraufreguliert. Für nicht-diabetische Keratinozyten blieb der Trend auch noch 24 Stunden nach

Verwundung erhalten, während in diabetischen Keratinozyten die Expression von ZO-1-mRNA wieder auf das Niveau unter unverwundeten Bedingungen absank (**Abbildung 4.17 D**).

Analog zu der Analyse für unbeschädigte *Monolayer* (**siehe 4.1.2**) wurde die Genexpression von TJ-Proteinen in nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten auch während der *In-vitro*-Wundheilung zu den verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen. Die Claudin-1-mRNA-Level waren 24 Stunden nach Verwundung in diabetischen Keratinozyten signifikant geringer als in nicht-diabetischen Keratinozyten (**Abbildung 4.17 A**). Für Claudin-4 traf diese Beobachtung sogar auf beide Detektionszeitpunkte unter Wundheilungsbedingungen zu (**Abbildung 4.17 B**). Die mRNA-Level von Occludin und ZO-1 wiesen zu 6 und 24 Stunden nach Verwundung keine Unterschiede zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Keratinozyten auf (**Abbildung 4.17 C, D**).

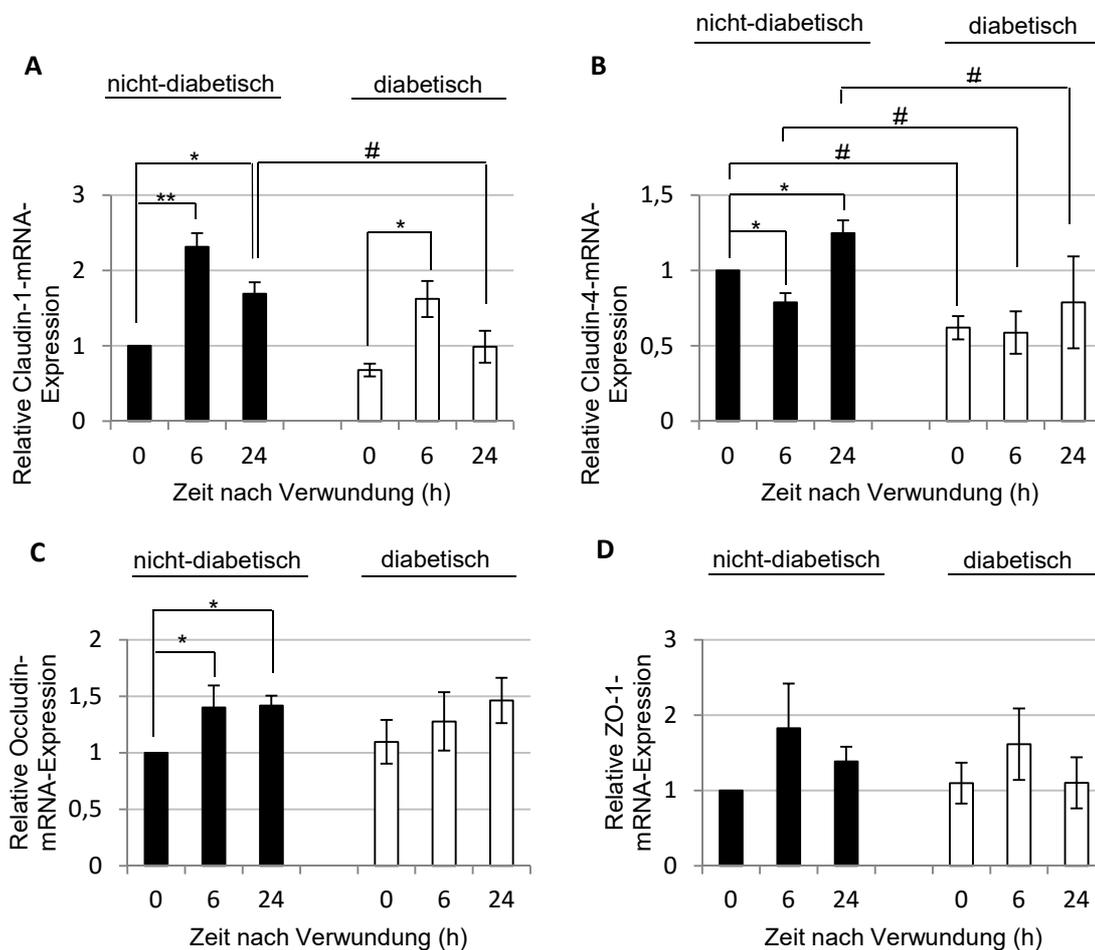


Abbildung 4.17: Genexpression von TJ-Proteinen während der Scratch-Wundheilung. Relative mRNA-Level von (A) Claudin-1, (B) Claudin-4, (C) Occludin und (D) ZO-1 in humanen nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten 6 und 24 Stunden nach Verwundung (jeweils normalisiert gegen die relative mRNA-Expression von nicht-diabetischen Keratinozyten für den Zeitpunkt 0 Stunden (unmittelbar vor Verwundung) (n = 4 jeweils in Dreifachbestimmung; Mittelwert ± Standardfehler; statistisch signifikant mit *: p < 0,05, **: p < 0,01 für den Vergleich von verwundeten gegenüber unverwundeten Bedingungen und mit #: p < 0,05 zwischen diabetischen im Vergleich zu nicht-diabetischen Bedingungen gemäß gepaartem t-Test nach Student).

4.3.2 *Gap-Junction*-Proteine in der diabetischen Wundheilung

Eine Veränderung der *Gap-Junction*-Proteine Cx26 und Cx43 in diabetischer Wundheilung wurde bereits in Nagern und einer geringen Zahl humaner Wundränder gezeigt (Brandner *et al.*, 2004, 2008; Wang *et al.*, 2007). Es ist aber unklar, ob sich diese Veränderungen bereits auf Proteinebene in nicht-läsionaler Haut von Diabetikern finden - auf mRNA Ebene wurde bisher keine Veränderung gefunden (Brandner *et al.*, 2008). Darüber hinaus ist unklar, ob diabetische Keratinozyten während der *Scratch*-Wundheilung Unterschiede gegenüber nicht-diabetischen Keratinozyten hinsichtlich Cx26 und Cx43 aufweisen. Dies sollte nun im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

4.3.2.1 Lokalisation und Expression von Connexinen in diabetischen verglichen mit gesunden, nicht-diabetischen Geweben und Keratinozyten

Connexin 26

Immunhistochemische Färbungen an Kryoschnitten von unverwundeter Haut diabetischen Ursprungs zeigten entweder eine erhöhte oder eine ähnliche epidermale Lokalisation und Immunintensität von Cx26 verglichen mit gesunden Kontrollen (**Abbildung 4.18 A-D**). Fußsohlengewebe nicht-diabetischen Ursprungs wies abschnittsweise eine Cx26-Färbung in den Keratinozyten des *Stratum basale* auf, während das entsprechende diabetische Gewebe für alle Schichten der Epidermis positiv auf Cx26 getestet wurde (**Abbildung 4.18 A, B**). In gesunder Körperhaut wurde Cx26 nicht gefunden, in entsprechender diabetischer Haut war Cx26 ebenfalls nicht vorhanden (**Abbildungen 4.18 C und D**) oder verstärkt exprimiert (**Daten nicht gezeigt**). Für die Cx26-Expression auf mRNA-Ebene wurde in diabetischer im Vergleich zu nicht-diabetischer Haut kein einheitlicher Trend beobachtet. In zwei Fällen waren die mRNA-*Level* deutlich erhöht, während für die übrigen Gewebepaarungen verminderte *Level* ermittelt wurden (**Tabelle 4.2**).

In Primärkulturen von Keratinozyten wurde unter unverwundeten Bedingungen eine einheitliche Tendenz zur Steigerung der Cx26-Genexpression in diabetischen verglichen mit nicht-diabetischen Zellen beobachtet. Für die Zeitpunkte 6 und 24 Stunden nach Verwundung wiesen nicht-diabetische Keratinozyten tendenziell erhöhte Cx26-mRNA-*Level* gegenüber unverwundeten Bedingungen auf, während sich in diabetischen Keratinozyten keine wesentlichen Veränderungen der Cx26-Genexpression zeigten. Dennoch waren die Cx26-mRNA-*Level* in diabetischen gegenüber denen in nicht-diabetischen Keratinozyten auch unter verwundeten Bedingungen tendenziell erhöht (**Abbildung 4.20 A**). Keine dieser Veränderungen war aber statistisch signifikant.

Connexin 43

Auch für Connexin 43 wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet. In Immunfluoreszenzfärbungen wurde in der Epidermis von diabetischem verglichen mit nicht-diabetischem Gewebe abhängig von der Körperlokalisierung entweder eine Herunterregulation (**Abbildung 4.19 A, B**) oder eine Hochregulation (**Abbildung 4.19 C, D**) auf Proteinebene beobachtet. Die Lokalisation blieb generell unverändert. Das mRNA-Level von Connexin 43 war in diabetischer Haut leicht erhöht, aber ohne statistische Signifikanz (**Tabelle 4.2**).

In kultivierten Keratinozyten zeigte sich auf mRNA-Ebene unter unverwundeten Bedingungen kein einheitlicher Trend für den Vergleich von diabetischen mit nicht-diabetischen Zellen. In zwei von drei Fällen war die Cx43-Genexpression in diabetischen Keratinozyten erhöht, in einem weiteren Fall erniedrigt (**Abbildung 4.20 B**).

Unter *In-vitro*-Wundheilungsbedingungen wurde für den Zeitpunkt 6 Stunden nach Schädigung der *Monolayer* eine tendenzielle Erhöhung der Cx43-mRNA-Level in diabetischen Keratinozyten beobachtet, jedoch basiert dieses Ergebnis nur auf einem n = 2. Nach 24 Stunden unter verwundeten Bedingungen zeigte sich keine einheitliche Tendenz. Für nicht-diabetische Keratinozyten waren die Cx43-mRNA-Level 6 und 24 Stunden nach Verwundung nahezu unverändert. Unter Wundheilungsbedingungen wurden für den Vergleich von diabetischen mit nicht-diabetischen Keratinozyten tendenziell höhere Cx43-mRNA-Level nach 6 Stunden beobachtet.

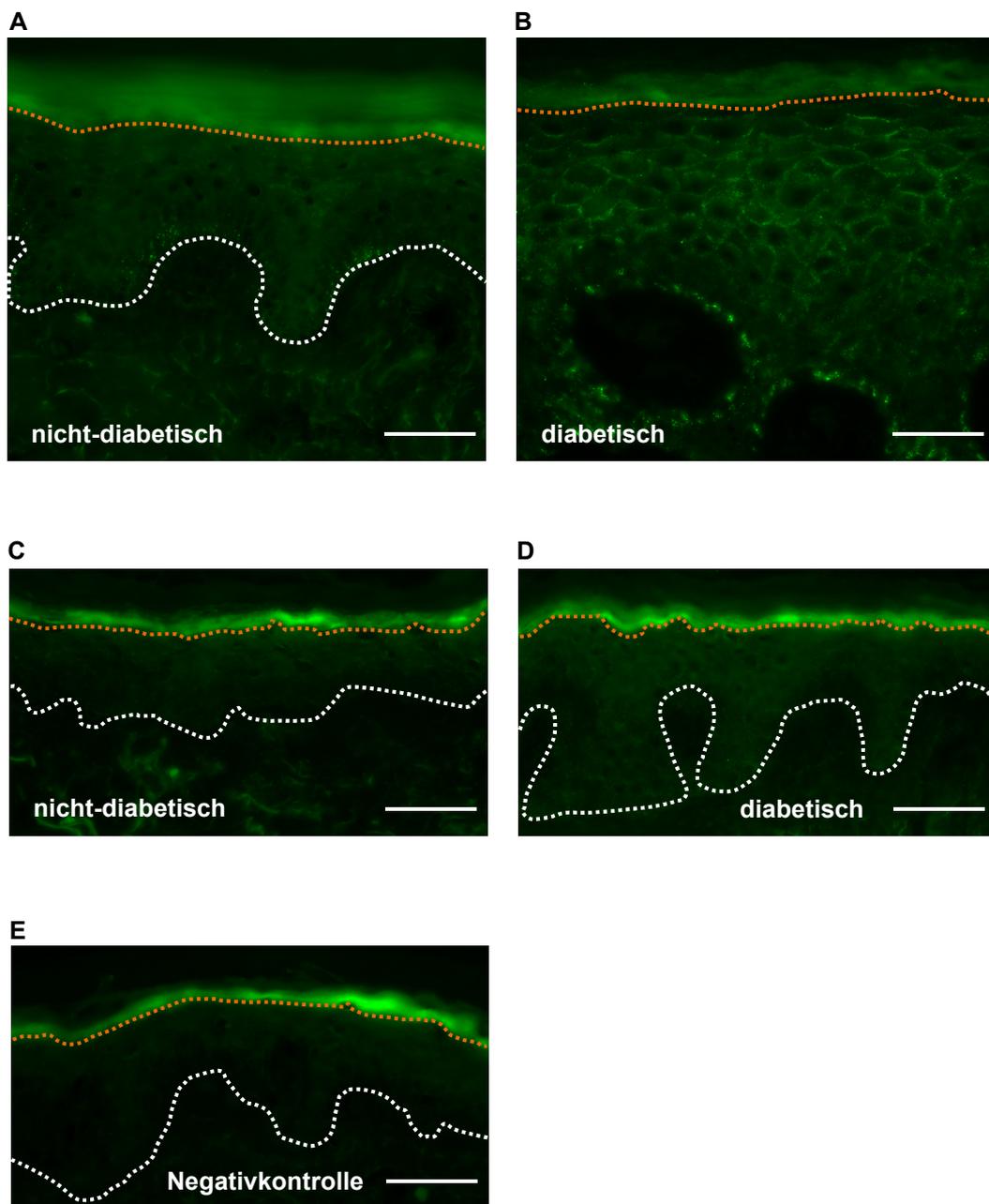


Abbildung 4.18: Immunlokalisation und -intensität von Cx26 in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut. Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Cx26 in diabetischer und gesunder Haut für (A/B, C/D) ausgewählte Paarungen und (E) eine Negativkontrolle. Die orangenen gepunkteten Linien deuten die untere Grenze der unspezifischen Färbung an. Die weißen gepunkteten Linien markieren den Übergang von der Epidermis zur Dermis. Längsbalken: 50 μm .

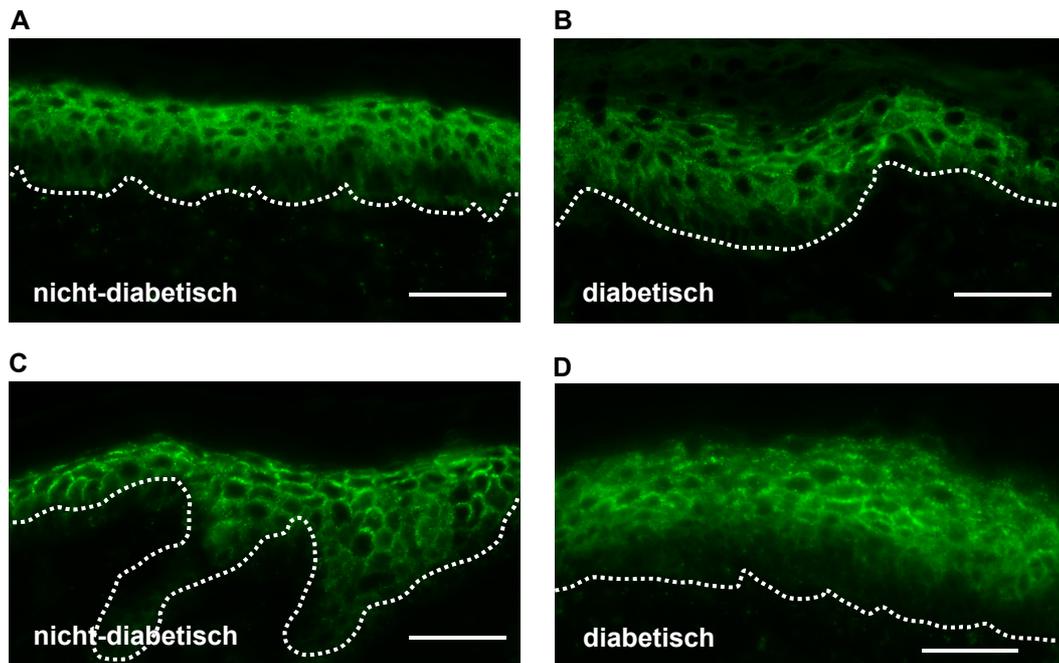


Abbildung 4.19: Immunlokalisation und -intensität von Cx43 in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut. Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Cx43 in diabetischer und gesunder Haut für ausgewählte Paarungen (A/B, C/D). Die weißen gestrichelten Linien deuten die Grenze zwischen Epidermis und Dermis an. Längsbalken: 50 μ m.

Tabelle 4.2: Genexpression von Cx26 und Cx43 in der Epidermis von diabetischem verglichen mit gesundem Gewebe

Gewebelokalisation	n-fache Erhöhung in diabetischem Gewebe	
	Connexin 26	Connexin 43
Oberschenkel	16,05	1,48
Zehnrücken	0,47	1,14
Unterschenkel	5,19	1,79
Wange	0,87	0,58

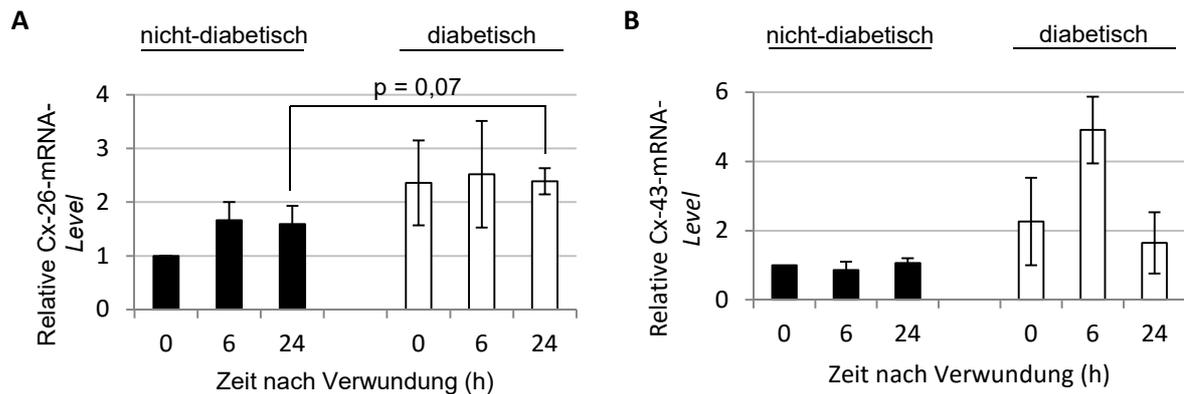


Abbildung 4.20: Genexpression von Connexin-Molekülen während der Scratch-Wundheilung. Relative mRNA-Level von (A) Connexin 26 und (B) Connexin 43 in humanen nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten 6 und 24 Stunden nach Verwundung (jeweils normalisiert gegen die relative mRNA-Expression von nicht-diabetischen Keratinozyten für den Zeitpunkt 0 Stunden (unmittelbar vor Verwundung) ($n = 3$ für unverwundete Bedingungen, $n = 2$ für 6 Stunden und $n = 3$ für 24 Stunden nach Verwundung jeweils in Dreifachbestimmung; Mittelwert \pm Standardfehler; p-Wert gemäß gepaartem t-Test nach Student).

4.3.3 Wundheilung in verschiedenen diabetischen Modellsystemen und seine Beeinflussung durch den Triterpenextrakt (TE) aus Birkenkork und seinen Einzelkomponenten

Ein großes Problem bei diabetischen Wunden ist nach wie vor das Fehlen von geeigneten Behandlungsmöglichkeiten. Ein Triterpenextrakt aus der Birkenrinde (TE) zeigte vielversprechende Wirkung bei normaler Wundheilung *in vivo* (Metelmann *et al.*, 2012, 2015) und *ex vivo* (Ebeling *et al.* 2014). Nun sollte untersucht werden, ob dies auch im diabetischen Kontext der Fall ist. Hierzu waren geeignete Untersuchungssysteme erforderlich. Da diabetische Patienten in diesem Stadium der Untersuchungen nicht in Frage kamen, wurden zunächst aus der Literatur bekannte *In-vitro*-Modellsysteme (Keratinozyten diabetischen Ursprungs, Keratinozyten unter hyperglykämischen Bedingungen) charakterisiert und deren Kulturbedingungen angepasst, sowie ein neues diabetisches *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell etabliert. Als Auswerteparameter diente die Geschwindigkeit des Wundverschlusses unter diabetischen Bedingungen im Vergleich zu nicht-diabetischen Bedingungen. Analog zu humanen *In-vivo*-Wunden sollte diese auch im Testsystem unter diabetischen Bedingungen verlangsamt sein. Die Modellsysteme wurden dann verwendet, um die Wirkung von TE und seiner Hauptkomponente Betulin zu testen.

4.3.3.1 Charakterisierung zweier *Scratch-Assay*-Varianten zur Untersuchung der *In-vitro*-Wundheilung

Als Untersuchungsmethode für die *In-vitro*-Wundheilung diente der *Scratch-Assay*. Hierbei wurde die Proliferation der Zellen nicht inhibiert, damit, wie bei der *In-vivo*-Wundheilung, sowohl die Migration als auch die Proliferation zum Gesamtergebnis beitragen können. Für die Analysen standen zwei Varianten der Methode zur Verfügung. Neben der Durchführung des klassischen *Scratch-Assays* (siehe Kapitel 3: 3.1.7.1) erfolgten zusätzlich Untersuchungen unter Verwendung des *IncuCyte Zoom*[®]-Systems (Essen BioScience) in Kombination mit dem *Woundmaker*[™] (Essen BioScience) (siehe Kapitel 3: 3.1.7.2), da bei zweiterer Variante eine größere Anzahl von Proben parallel getestet werden konnte. Gemäß den Angaben des Herstellers führt die Verwendung des *Woundmaker*[™] zu einer höheren Homogenität der *Scratch*-Breiten und damit auch der absoluten *Scratch*-Größen im Vergleich zur manuellen Verletzung der *Monolayer* mit einer Pipettenspitze beim klassischen *Scratch-Assay*. Dies konnte bestätigt werden. Während sich für die klassische *Scratch-Assay*-Variante eine mittlere Anfangs-*Scratch*-Breite von 0,65 mm mit einer Standardabweichung von 0,088 mm ergab, wurde durch den *Woundmaker*[™] eine durchschnittlich gleich große Ausgangs-*Scratch*-Breite mit einer signifikant geringeren Standardabweichung von 0,066 mm generiert. Die unterschiedlichen absoluten *Scratch*-Größen resultieren aus der Tatsache, dass der klassische *Scratch-Assay* in 12-Well-Platten (Well-Größe: 380 mm²) durchgeführt wurde, während beim *IncuCyte-Zoom*[®]-System 96-Well-Platten (Well-Größe: 32 mm²) verwendet wurden. Der prozentuale Anteil der *Scratch*-Größe an der Gesamt-Well-Größe betrug beim klassischen *Scratch-Assay* 3,76, während der *WoundMaker*[™] durchschnittlich 13,02 % des konfluenten *Monolayers* entfernte. Bezüglich des prozentualen Anteils von ausgewerteter *Scratch*-Fläche stehen 37,56 % beim klassischen *Scratch-Assay* gegenüber 30,07 % beim *IncuCyte-Zoom*[®]-System. Die Auswertung der Wundheilungsgeschwindigkeit wird im Folgenden für beide *Scratch-Assay*-Varianten pro fotografiertem Gesichtsfeld angegeben (Tabelle 4.4).

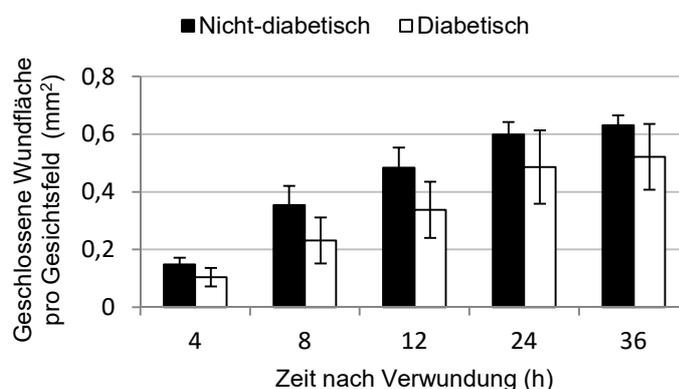
Tabelle 4.4: Vergleich der zwei *Scratch-Assay*-Varianten

Vergleichsparameter	Klassischer <i>Scratch-Assay</i>	<i>IncuCyte-Zoom</i> [®] -System
<i>Scratch</i> -Breite (mm)	0,65 ± 0,088	0,65 ± 0,066
<i>Scratch</i> -Größe (mm ²)	14,29 ± 1,94	4,17 ± 0,42
Prozentualer Anteil der <i>Scratch</i> -Größe an der Gesamt-Well-Größe	3,76 ± 0,51	13,02 ± 1,32
Prozentualer Anteil der ausgewerteten <i>Scratch</i> -Fläche	37,56	30,07
Größe eines Gesichtsfeldes (mm ²)	5,68	4,42

4.3.3.2 Analyse der *In-vitro*-Wundheilung von Keratinozyten diabetischen verglichen mit nicht-diabetischen Ursprungs mit zwei *Scratch-Assay*-Varianten

Um größtmögliche Übereinstimmung zu den *In-vivo*-Bedingungen bezüglich Zelltyp, Spezies und Vorerkrankung herzustellen, wurden zur Durchführung der *In-vitro*-Wundheilungsanalysen Keratinozyten aus dem Hautgewebe von Diabetikern isoliert (Grant *et al.*, 1991; Faries *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2015). Bei Verwendung des klassischen *Scratch-Assays* zeigte sich im Vergleich zu Keratinozyten nicht-diabetischen Ursprungs durchgehend eine tendenziell verzögerte Wundheilung (**Abbildung 4.21 A**), die aber aufgrund der Spender-Heterogenität nicht signifikant war. Dagegen wurde für die Analyse im *IncuCyte-Zoom*[®]-System kein Unterschied in der Wundheilungsgeschwindigkeit zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Keratinozyten beobachtet (**Abbildung 4.21 B**).

A Klassisch



B *IncuCyte Zoom*[®]

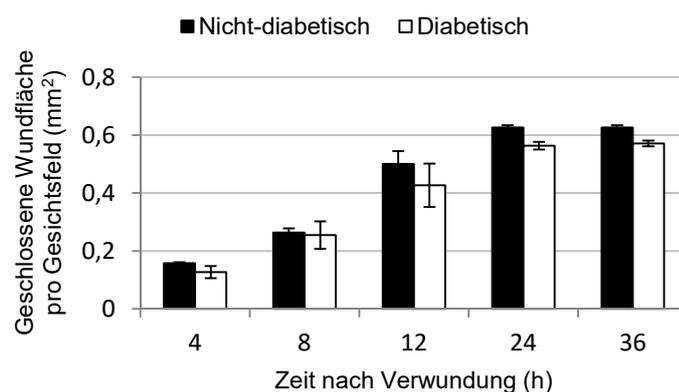


Abbildung 4.21: Einfluss des diabetischen Charakters von humanen, adulten Keratinozyten auf die *In-vitro*-Wundheilung. Größe der geschlossenen *Scratch*-Wundfläche pro Gesichtsfeld von Keratinozyten nicht-diabetischen und diabetischen Ursprungs, die mit dem (A) klassischen *Scratch-Assay* oder dem (B) *IncuCyte-Zoom*[®]-System bei einer Glukosekonzentration von 6 mM analysiert wurden, zu den Zeitpunkten 4, 8, 12, 24 und 36 Stunden nach Verwundung (n = 3 jeweils in Doppelbestimmung beim klassischen *Scratch-Assay* bzw. n = 4 mindestens in Doppelbestimmung für die Untersuchung im *IncuCyte-Zoom*[®]-System; Mittelwerte ± Standardfehler).

Wurden die Wundheilungsgeschwindigkeiten der diabetischen Keratinozyten in den *Scratch*-Assay-Systemen miteinander verglichen, zeigte sich eine tendenziell verlangsamte Wundheilung im klassischen *Scratch*-Assay (**Abbildung 4.22**).

Normalglukose (6 mM Glukose)

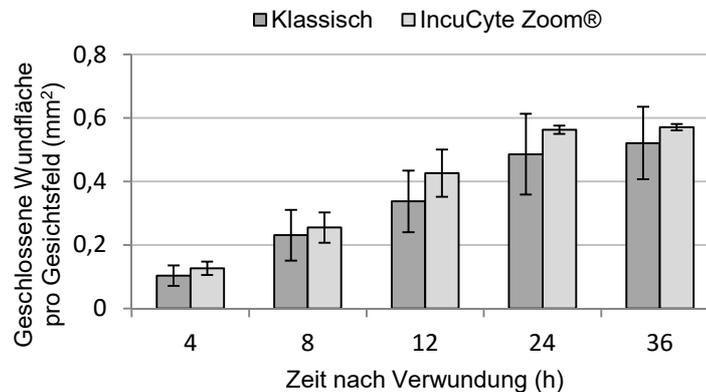


Abbildung 4.22: Einfluss der *Scratch*-Assay-Methode auf die *In-vitro*-Wundheilung von humanen diabetischen Keratinozyten. Größe der geschlossenen *Scratch*-Wundfläche pro Gesichtsfeld von diabetischen Keratinozyten, die entweder mit dem klassischen *Scratch*-Assay oder dem *IncuCyte-Zoom*®-System bei einer Glukosekonzentration von 6 mM analysiert wurden, zu den Zeitpunkten 4, 8, 12, 24 und 36 Stunden nach Verwundung (n = 3 jeweils in Doppelbestimmung beim klassischen *Scratch*-Assay bzw. n = 4 jeweils mindestens in Doppelbestimmung für die Untersuchung im *IncuCyte-Zoom*®-System; Mittelwerte ± Standardfehler).

4.3.3.3 Auswirkungen hyperglykämischer Bedingungen auf die *Scratch*-Wundheilung von primären humanen Keratinozyten - Etablierung von diabetischen *In-vitro*-Wundheilungsmodellen

Das Problem von diabetischen Keratinozyten ist ihre geringe Verfügbarkeit und die große Spendervariabilität. Deshalb wurde untersucht, ob die verminderte *In-vitro*-Wundheilung von Keratinozyten diabetischen Ursprungs mit Keratinozyten aus infanten Vorhäuten unter Hochglukose-Bedingungen nachgestellt werden kann. Hochglukose-Bedingungen zur Nachstellung diabetischer Bedingungen wurden in der Literatur häufig verwendet (zum Beispiel Lan *et al.*, 2008, Wright *et al.*, 2012). Hierzu wurden die Zellen für 48 Stunden unter hyperglykämischen Bedingungen, die in Anlehnung an die erhöhte Blutglukosekonzentration von schlecht eingestellten Diabetikern gewählt wurden, im Vergleich zu euglykämischen Bedingungen, die der normalen physiologischen Situation entsprachen, vorinkubiert. Das jeweils verwendete Keratinozytenmedium enthielt dabei eine Glukosekonzentration von 25 mM

bzw. 6 mM. Um einen möglichen osmotischen Effekt durch die erhöhte Stoffkonzentration ausschließen zu können, wurde eine weitere Bedingung berücksichtigt, bei der das 6 mM enthaltende Medium nicht um 19 mM Glukose, sondern um 19 mM Mannitol ergänzt wurde. Die Untersuchung wurde sowohl für infante als auch für adulte, nicht-diabetische und diabetische humane Keratinozyten durchgeführt.

4.3.3.3.1 Auswirkungen verschiedener Kulturmedien auf die *In-vitro*-Wundheilung von humanen infanten Keratinozyten unter hyperglykämischen im Vergleich zu euglykämischen Bedingungen

Aus der Literatur ist bekannt, dass die *In-vitro*-Wundheilung von infanten humanen Keratinozyten für das Kulturmedium *Keratinocyte-SFM* (K-SFM) der Firma *Thermo Fisher Scientific* unter hyperglykämischen im Vergleich zu euglykämischen Bedingungen beeinträchtigt ist (Lan *et al.*, 2008). Hingegen führt ein anderes Keratinozytenmedium derselben Firma, *EpiLife*[®], bei erhöhter Glukosekonzentration nicht zu einer beeinträchtigten Wundheilung der Zellen (Wright *et al.*, 2013). Daher beinhaltete die Etablierung eines diabetischen *In-vitro*-Wundheilungsmodells die Wahl eines geeigneten Kulturmediums. Hierzu wurden sowohl die bereits publizierten Ergebnisse für die zwei oben genannten Medien evaluiert, als auch ein drittes, bisher ungetestetes Medium der Firma *LifeLine Cell Technology*, *DermaLife*[®] K, in die Versuchsdurchführung miteinbezogen.

Es zeigte sich einzig in K-SFM-Medium 12 und 24 Stunden nach Verwundung der *Monolayer* eine signifikante Beeinträchtigung der Wundheilung, wenn die Glukosekonzentration des Mediums von 6 mM auf 25 mM erhöht wurde. Darüber hinaus wurde gleichermaßen für die osmotische Kontrolle ein signifikant verzögerter Verschluss des *Scratches* beobachtet. Die übrigen zwei Medien wiesen zu keinem der Detektionszeitpunkte eine Veränderung der Wundheilungskapazität zwischen den getesteten Bedingungen auf (**Abbildung 4.23**).

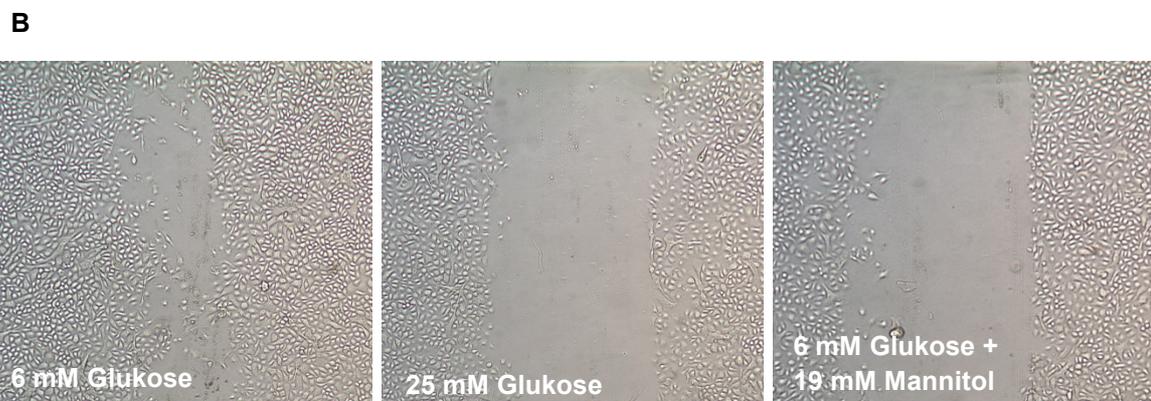
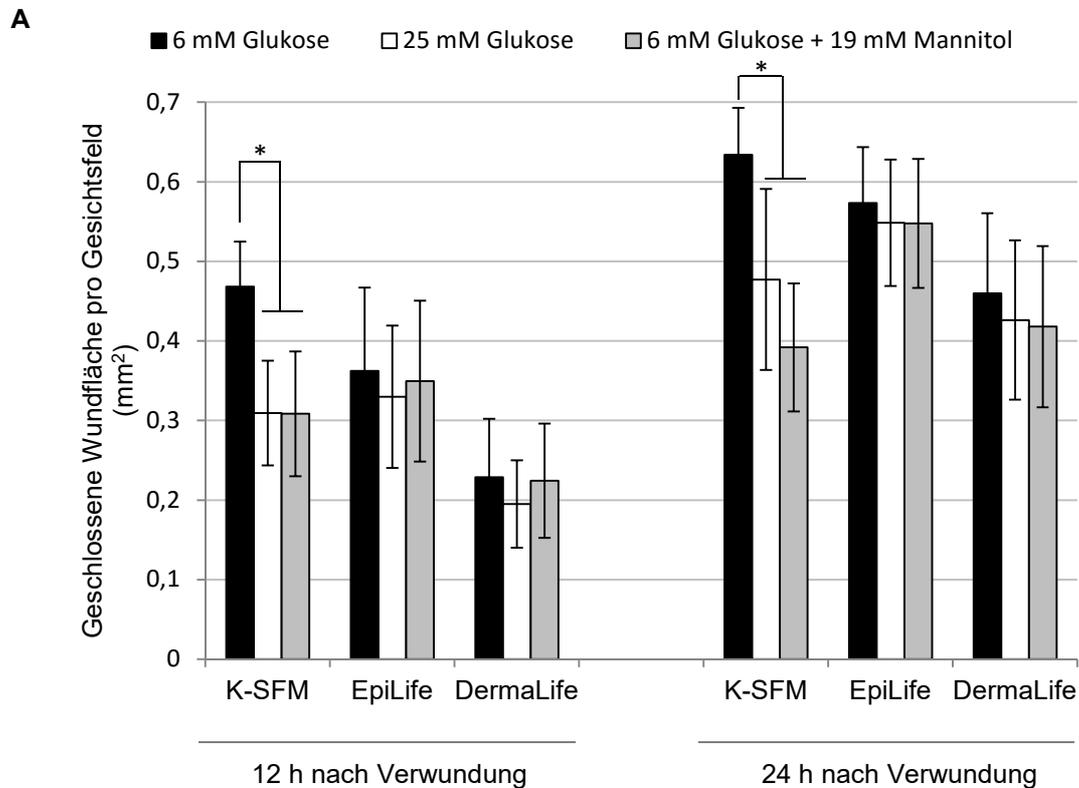


Abbildung 4.23: Einfluss von hyperglykämischen Bedingungen auf die *In-vitro*-Wundheilung infanter humaner Keratinozyten in verschiedenen Kulturmedien. (A) Größe der geschlossenen *Scratch*-Wundfläche pro Gesichtsfeld von infanter humaner Keratinozyten der Passage 2, die in drei unterschiedlichen Keratinozytenmedien jeweils unter euglykämischen (6 mM Glukose), hyperglykämischen (25 mM Glukose) und hyperosmolaren Bedingungen (6 mM Glukose + 19 mM Mannitol) kultiviert wurden, zu den Zeitpunkten 12 und 24 Stunden nach Verwundung ($n = 4$; Mittelwerte \pm Standardfehler; *: statistisch signifikant mit $p < 0,05$ gemäß dem verwendeten *random intercept model* mit anschließender *Bonferroni*-Korrektur für Mehrfachvergleiche). (B) Exemplarische Wundgrößen 24 Stunden nach Verwundung für K-SFM mit 6 mM Glukose, 25 mM Glukose und 6 mM Glukose + 19 mM Mannitol.

4.3.3.3.2 Einfluss von Zusatzstoffen im *Keratinocyte-SFM*-Medium auf die *In-vitro*-Wundheilung von humanen infanten Keratinozyten unter verschiedenen Glukose-Bedingungen

Häufig sollen sich zur Testung von aktiven Substanzen die Zellen im Basalzustand befinden, weil angenommen wird, dass dann der Einfluss der untersuchten Substanzen deutlicher ist. Dies setzt eine Kultivierung ohne zugesetzte Zytokine voraus. Deshalb wurde die *In-vitro*-Wundheilung in K-SFM-Medium mit und ohne Zusatzstoffe unter Normal- und Hochglukose-Bedingungen getestet. Die Analyse erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Versuchen. Der einzige Unterschied bestand in der Tatsache, dass von 24 Stunden nach Aussaat der Keratinozyten an bis zum Ende des Versuches Medium ohne Zusatzstoffe für die Kultivierung der Zellen eingesetzt wurde.

Ohne die Zugabe von Zusatzstoffen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen euglykämischen, hyperglykämischen und hyperosmolaren Kulturbedingungen 12 und 24 Stunden nach Verwundung der *Monolayer* (**Abbildung 4.24 A**). Für die Verwendung von Kulturmedium ohne Zusatzstoffe im Vergleich zu mit Zusatzstoffen wurde aber unter euglykämischen Bedingungen bereits eine signifikant geringere Wundheilungsgeschwindigkeit der Zellen beobachtet. Die Unterschiede unter hyperglykämischen und hyperosmolaren Bedingungen waren marginal. Da infanten Keratinozyten in Kulturmedium ohne Zusatzstoffe unter hyperglykämischen im Vergleich zu euglykämischen Bedingungen keine verminderte Wundheilung aufwiesen, wurden alle folgenden Untersuchungen unter Verwendung von K-SFM-Medium mit Zusatzstoffen durchgeführt.

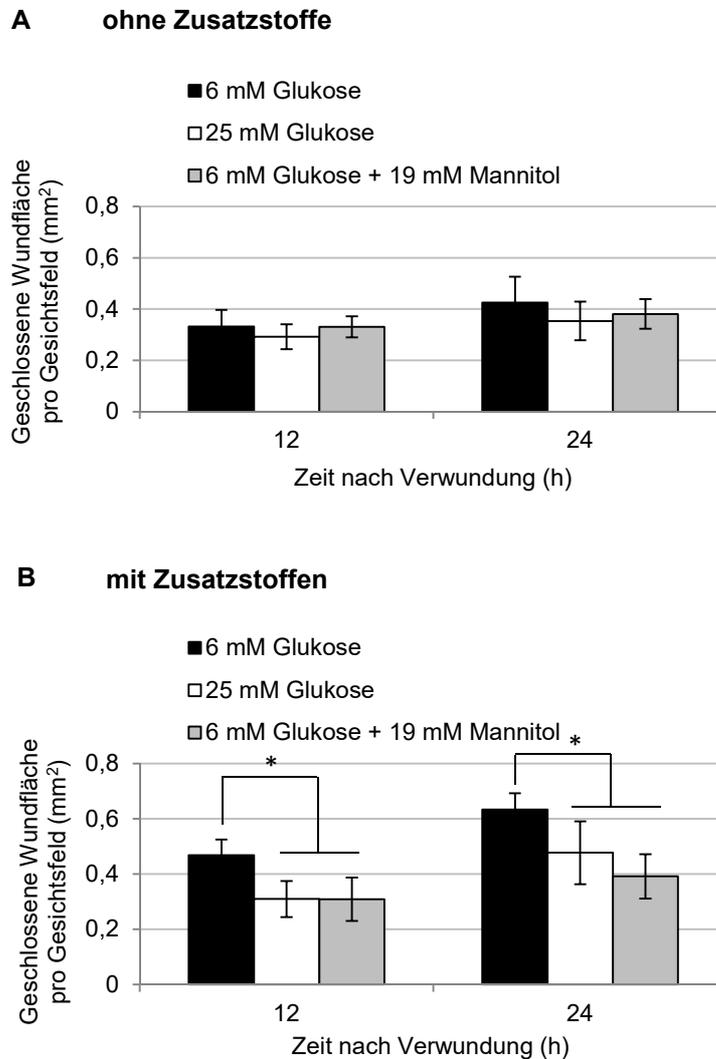


Abbildung 4.24: Einfluss von hyperglykämischen Bedingungen auf die *In-vitro*-Wundheilung infanter humaner Keratinozyten in K-SFM ohne und mit Zusatzstoffen. Größe der geschlossenen *Scratch*-Wundfläche pro Gesichtsfeld von infanten humanen Keratinozyten der Passage 2, die in K-SFM (A) ohne und (B) mit Zusatzstoffen unter euglykämischen (6 mM Glukose), hyperglykämischen (25 mM Glukose) und hyper-osmotischen Bedingungen (6 mM Glukose + 19 mM Mannitol) kultiviert wurden, zu den Zeitpunkten 12 und 24 Stunden nach Verwundung (jeweils $n = 4$; Mittelwerte \pm Standardfehler; *: statistisch signifikant mit $p < 0,05$ gemäß dem verwendeten *random intercept model* mit anschließender *Bonferroni*-Korrektur für Mehrfachvergleiche).

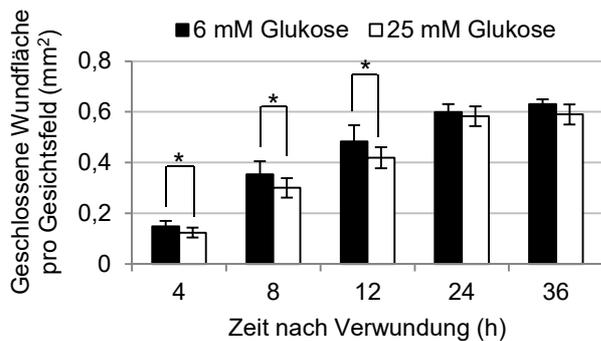
4.3.3.4 Analyse der *In-vitro*-Wundheilung von adulten, nicht-diabetischen und diabetischen humanen Keratinozyten unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen mit zwei *Scratch-Assay*-Varianten

Da die Folgeschäden des Typ-2-*Diabetes* meist erst im fortgeschrittenen Lebensalter auftreten (Meneilly und Tessier, 2001), empfahl sich auch die *Scratch*-Wundheilung von humanen Keratinozyten adulter Spender unter Hochglukose- im Vergleich zu Normalglukosebedingungen zu untersuchen. Für die Analyse wurden beide *Scratch-Assay*-Varianten verwendet.

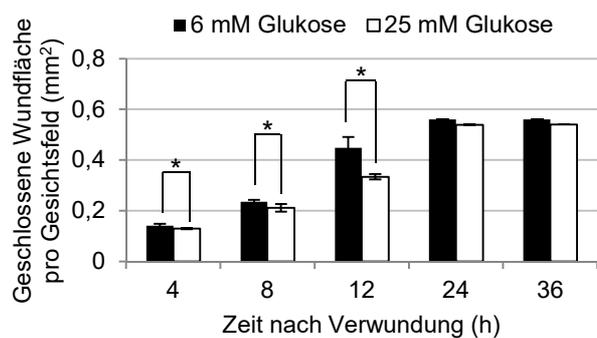
Adulte, nicht-diabetische Keratinozyten unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen

Wurde die *In-vitro*-Wundheilung adulter, nicht-diabetischer Keratinozyten mit dem klassischen *Scratch-Assay* unter hyperglykämischen im Vergleich zu euglykämischen Bedingungen untersucht, so zeigte sich zu 4, 8 und 12 Stunden nach Verwundung eine signifikante Beeinträchtigung des Wundverschlusses (**Abbildung 4.25 A**). Gleiches galt für die Analyse der Zellen im *IncuCyte Zoom*[®]-System. Der Unterschied zwischen den Kulturbedingungen hinsichtlich der Detektionszeitpunkte 4 und 8 Stunden war jedoch weniger deutlich ausgeprägt als beim klassischen *Scratch-Assay* (**Abbildung 4.25 B**). 24 und 36 Stunden nach Verwundung wurden für die zwei *Scratch-Assay*-Varianten jeweils nur geringe Unterschiede zwischen Normal- und Hochglukosebedingungen beobachtet, da die *Monolayer* in beiden Fällen nach 24 Stunden bereits nahezu vollständig geschlossen waren. Wenn die zwei *Scratch-Assay*-Systeme im Hinblick auf dieselbe Glukosekonzentration miteinander verglichen wurden, zeigten sich sowohl unter eu- als auch unter hyperglykämischen Bedingungen keine signifikant unterschiedlichen Geschwindigkeiten der *In-vitro*-Wundheilung (**Abbildung 4.25 C und D**).

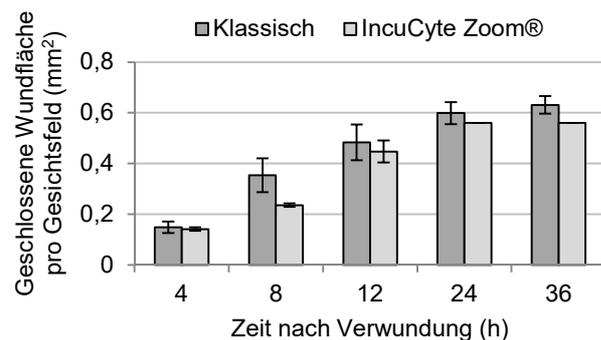
A Klassisch



B IncuCyte Zoom®



C Normalglukose (6 mM)



D Hochglukose (25 mM)

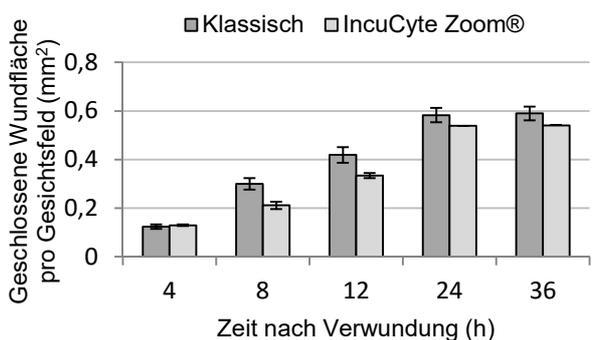


Abbildung 4.25: Auswirkungen verschiedener Scratch-Assay-Varianten und verschiedener Glukosekonzentrationen auf die *In-vitro*-Wundheilung adulter, nicht-diabetischer Keratinozyten. (A, B) Größe der geschlossenen *Scratch*-Wundfläche pro Gesichtsfeld von adulten, nicht-diabetischen Keratinozyten, die entweder mit dem (A) klassischen *Scratch*-Assay oder dem (B) *IncuCyte-Zoom*®-System bei 6 und 25 mM Glukosekonzentration analysiert wurden, zu den Zeitpunkten 4, 8, 12, 24 und 36 Stunden nach Verwundung. (C, D) Gegenüberstellung der geschlossenen Wundflächen für die zwei *Scratch*-Assay-Varianten bei einer Glukosekonzentration von (C) 6 mM und (D) 25 mM zu 4, 8, 12, 24 und 36 Stunden nach Verwundung (n = 4 jeweils in Doppelbestimmung für den klassischen *Scratch*-Assay bzw. n = 3 jeweils mindestens in Doppelbestimmung für die Untersuchung im *IncuCyte-Zoom*®-System; Mittelwerte ± Standardfehler; *: statistisch signifikant mit p < 0,05 gemäß dem verwendeten *random intercept model*).

Adulte, diabetische Keratinozyten unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen

Die Verwendung von 96-Well-Platten im *IncuCyte Zoom*[®]-System ermöglichte, diabetische Keratinozyten nicht nur unter Normalglukose-, sondern parallel auch unter Hochglukosebedingungen zu untersuchen. Hierbei wurde zu keinem der analysierten Detektionszeitpunkte ein signifikanter Unterschied in der *In-vitro*-Wundheilung zwischen den zwei Glukosekonzentrationen beobachtet (**Abbildung 4.26**). Auch beim Vergleich von nicht-diabetischen mit diabetischen Keratinozyten unter Hochglukosebedingungen zeigte sich durchgehend eine vergleichbare Wundheilungsgeschwindigkeit (**Abbildung 4.27**).

IncuCyte Zoom[®]

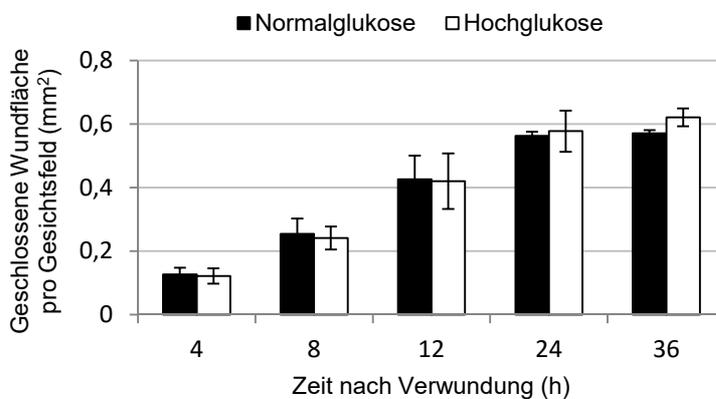


Abbildung 4.26: Einfluss von hyperglykämischen Bedingungen auf die *In-vitro*-Wundheilung von humanen diabetischen Keratinozyten. Größe der geschlossenen *Scratch*-Wundfläche pro Gesichtsfeld von diabetischen Keratinozyten, die mit dem *IncuCyte-Zoom*[®]-System unter Normal (6 mM)- und Hochglukose (25 mM)-Bedingungen analysiert wurden, zu den Zeitpunkten 4, 8, 12, 24 und 36 Stunden nach Verwundung (n = 4 mindestens in Doppelbestimmung; Mittelwert ± Standardfehler).

Hochglukose (25 mM) im *IncuCyte-Zoom*[®]-System

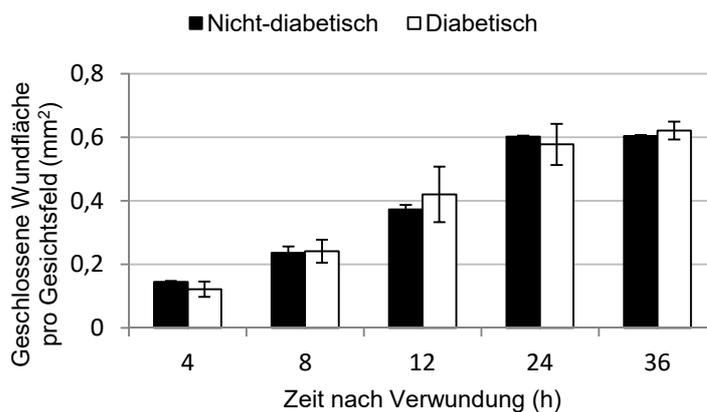


Abbildung 4.27: Einfluss des diabetischen Charakters von humanen, adulten Keratinozyten auf die *In-vitro*-Wundheilung. Größe der geschlossenen *Scratch*-Wundfläche pro Gesichtsfeld von nicht-diabetischen und diabetischen Keratinozyten, die mit dem *IncuCyte-Zoom*[®]-System unter Hochglukosebedingungen analysiert wurden, zu den Zeitpunkten 4, 8, 12, 24 und 36 Stunden nach Verwundung (n = 3 für nicht-diabetische Keratinozyten, n = 4 für diabetische Keratinozyten jeweils mindestens in Doppelbestimmung; Mittelwert ± Standardfehler).

4.3.3.5 Etablierung diabetischer *Ex-vivo*-Wundheilungsmodelle

Da unter Verwendung von kultivierten Keratinozyten nur bedingt die Wundheilungsverzögerung, die *in vivo* beobachtet wird, nachgestellt werden konnte und sehr abhängig von den Versuchsbedingungen war, sollte zusätzlich ein weiteres „diabetisches“ Wundheilungsmodell etabliert werden, das vom Aufbau und den beteiligten Zellen mehr der Gesamthaut entspricht und somit die *In-vivo*-Situation besser abbildet.

4.3.3.5.1 Einfluss verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Wundheilung und den Phänotyp von porcinen *Ex-vivo*-Wundheilungsmodellen

Um ein diabetisches *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell zu etablieren, wurde das in unserem Labor etablierte *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell für normale Wundheilung (Brandner *et al.*, 2006; Pollok *et al.*, 2011) modifiziert. Hierzu wurden die porcinen Stanzbiopsien unter euglykämischen, hyperglykämischen und hyperosmolaren Bedingungen kultiviert. Ihre Verwundung erfolgte entweder ohne oder mit Vorinkubation unter den drei beschriebenen Bedingungen. Auf der Grundlage dieses Versuchsaufbaus wurde die Wundheilung 48 Stunden nach Verwundung durch Schockfrieren der Wundmodelle abgestoppt. Als Maßstab der Bewertung wurde die Länge der regenerierten Epidermis herangezogen (**Abbildung 4.28 A**). Wurden die Stanzbiopsien ohne Vorinkubation verwundet, zeigte sich bei erhöhter ($468 \mu\text{m} \pm 47 \mu\text{m}$) gegenüber normaler Glukosekonzentration ($413 \mu\text{m} \pm 50 \mu\text{m}$) eine tendenziell verbesserte Wundheilung, während die hyperosmolare Kontrollbedingung ($410 \mu\text{m} \pm 106 \mu\text{m}$) keine Veränderung gegenüber der euglykämischen Situation aufwies. Mit Vorinkubation der Stanzbiopsien verschlechterte sich die Wundheilung unter hyperglykämischen Bedingungen ($263 \mu\text{m} \pm 15 \mu\text{m}$) signifikant im Vergleich zu euglykämischen Bedingungen ($399 \mu\text{m} \pm 15 \mu\text{m}$). Auch die Wundheilungsmodelle unter hyperosmolaren Kontrollbedingungen zeigten eine Tendenz zur verlangsamten Reepithelialisierung. Diese war aber geringer ausgeprägt ($322 \mu\text{m} \pm 38 \mu\text{m}$) und nicht signifikant. Darüber hinaus konnte bei erhöhter Glukosekonzentration im Kulturmedium eine Gelbfärbung der Stanzbiopsien beobachtet werden (**Abbildung 4.28 B**). Dies war mit der Mannitol-Kontrolle nicht der Fall.

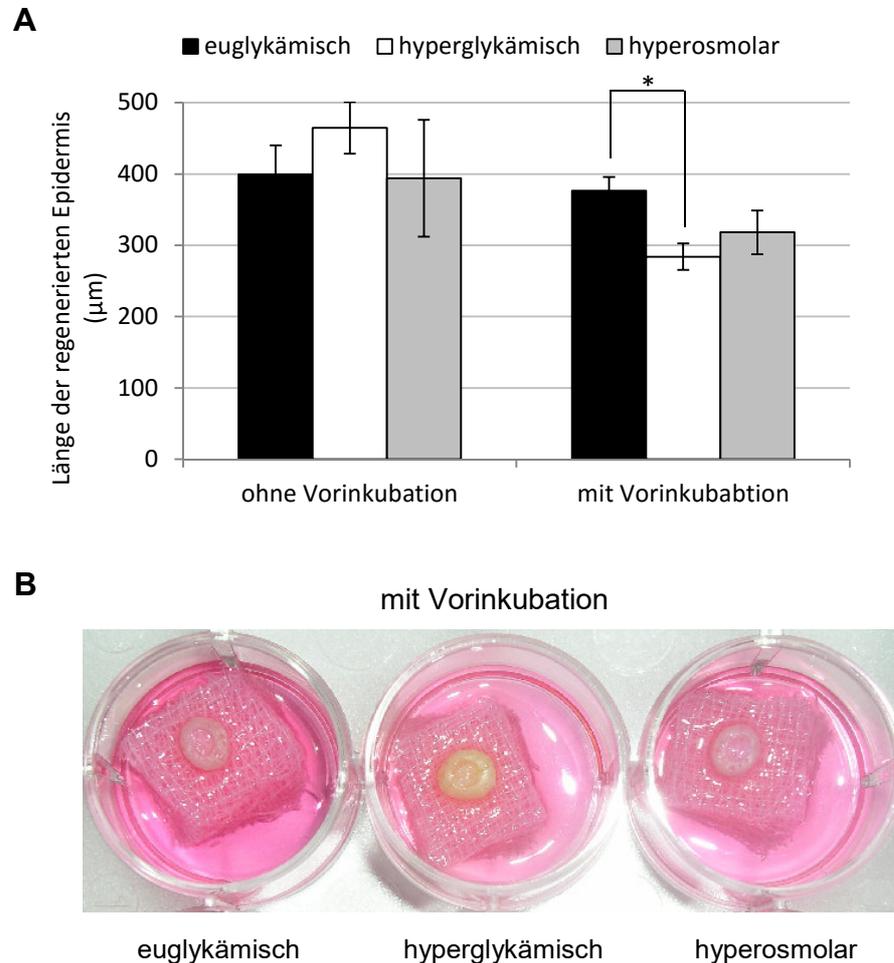


Abbildung 4.28: Einfluss von hyperglykämischen Bedingungen auf die Wundheilung und auf den Phänotyp von porcinen *Ex-vivo*-Wundheilungsmodellen. (A, B) Porcine Stanzbiopsien wurden nach Verwundung für 48 Stunden unter euglykämischen, hyperglykämischen und hyperosmolaren Bedingungen kultiviert. (A) Die drei Kulturbedingungen sind für den Versuchsaufbau ohne und mit Vorinkubation der Biopsien getrennt voneinander gruppiert. Die Länge der regenerierten Epidermis ist als Mittelwert \pm Standardfehler von zehn unabhängigen Experimenten dargestellt, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. *: statistisch signifikant mit $p < 0,05$ im Vergleich mit der euglykämischen Bedingung gemäß dem verwendeten *linear mixed model* mit anschließender *Bonferroni*-Korrektur für Mehrfachvergleiche. (B) Gelbfärbung der Biopsien, die unter hyperglykämischen Bedingungen kultiviert wurden. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für acht Experimente, die das gleiche Resultat hervorbrachten.

4.3.3.6 Analyse von TE und seiner Hauptkomponente Betulin in diabetischen Modellsystemen

4.3.3.6.1 Einfluss von TE in verschiedenen galenischen Formulierungen auf die *Ex-vivo*-Wundheilung unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass TE einen positiven Effekt auf die *Ex-vivo*-Wundheilung (Ebeling *et al.*, 2014) und auf die *In-vivo*-Wundheilung (Metelmann *et al.*, 2012 und 2015) in normalen Wunden hat. Deshalb sollte nun getestet werden, ob dieser Extrakt auch auf die *Ex-vivo*-Wundheilung unter hyperglykämischen Bedingungen wundheilungsfördernd wirkt. Da *ex vivo* und *in vitro* bisher überlappend ein TE-Oleogel mit einer Konzentration von 10 µg/ml TE in Sonnenblumenöl verwendet wurde, war dies auch Ausgangspunkt meiner Untersuchungen. Darüber hinaus ist es für die Arzneimittelentwicklung, zu der mein Projekt innerhalb einer AiF-Förderung beitragen sollte, wichtig, dass die Darreichungsform gegebenenfalls berührungsfrei als Schaum möglich wäre. Dazu benötigt man eine Emulsion. Deshalb wurde im Rahmen meiner Doktorarbeit getestet, ob eine TE- und Sonnenblumenöl-enthaltende Emulsion auf Wasser-in-Öl-Basis die positive Wirkung, die der TE in Sonnenblumenöl (Oleogel) bereits gezeigt hatte, behält.

4.3.3.6.2 Einfluss von W/O-Emulsionen mit unterschiedlichem Wassergehalt auf die Wundheilung im porcinen *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell

Um zu evaluieren, welche W/O-Emulsionen für die galenische Entwicklung in Frage kommen, wurden zunächst Emulsionen mit unterschiedlichem Wassergehalt (5 %, 30 % und 60 %) hinsichtlich ihrer Wirksamkeit im porcinen *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell unter physiologischen Glukosebedingungen getestet. Parallel dazu wurde die Analyse des TE-Oleogels durchgeführt, das als Positivkontrolle fungierte. Da PBS die wässrige Phase beider Formulierungen darstellt, wurde es als Kontrolle mitgeführt.

Nach Verwundung der porcinen Stanzbiopsien erfolgte unmittelbar die Applikation der Substanzen. Die *Ex-vivo*-Modelle wurden für 48 Stunden unter euglykämischen Bedingungen kultiviert. Für die Emulsion mit 60 % Wassergehalt wurde die größte Wirksamkeit ($473 \mu\text{m} \pm 83$) beobachtet. Dahinter folgte das TE-Oleogel ($441 \mu\text{m} \pm 41$). Gegenüber der 60 %igen Wasser-in-Öl-Emulsion wiesen die Emulsionen mit 5 % und 30 % Wasseranteil geringere Effekte auf ($413 \mu\text{m} \pm 46$ und $413 \mu\text{m} \pm 57$) und reihten sich hinter dem TE-Oleogel, aber vor der PBS-Kontrolle ein, für die mit $323 \mu\text{m} \pm 50$ die durchschnittlich kürzeste regenerierte Epidermis gemessen wurde (**Abbildung 4.29**).

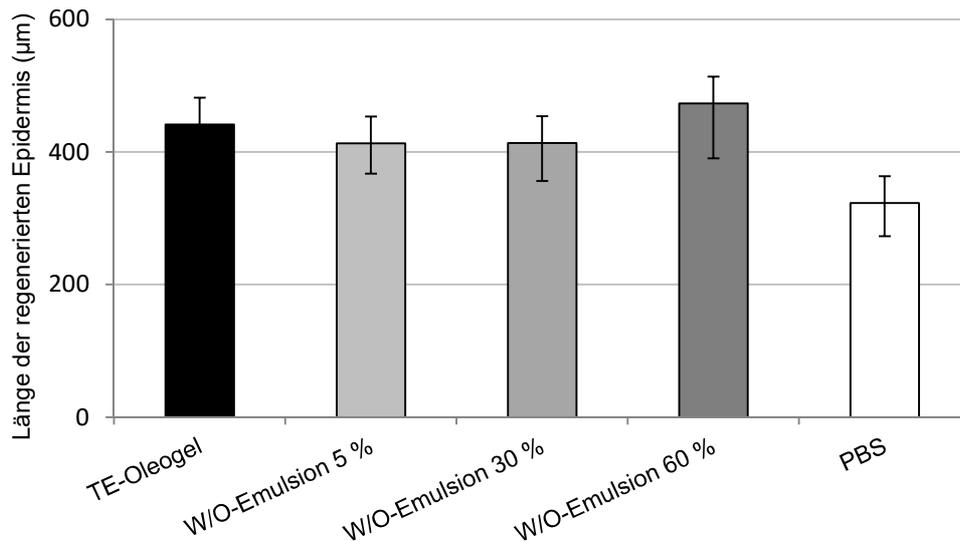


Abbildung 4.29: Einfluss von W/O-Emulsionen mit unterschiedlichem Wassergehalt auf die Wundheilung im porcinen *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell. Länge der regenerierten Epidermis (in µm) im WHM unter euglykämischen Bedingungen nach Behandlung mit einem TE-Oleogel, drei TE-enhaltenden W/O-Emulsionen mit unterschiedlichem Wassergehalt (5 %, 30 % und 60 %) und PBS (n = 10 jeweils in Doppelbestimmung; Mittelwert ± Standardfehler).

4.3.3.6.3 Einfluss von TE in verschiedenen galenischen Formulierungen auf die porcine *Ex-vivo*-Wundheilung unter hyperglykämischen Bedingungen

Aufgrund des vielversprechenden Resultats aus 4.3.3.6.2 wurde die 60 %ige W/O-Emulsion ausgewählt, um ihren Effekt auch auf die Wundheilung unter hyperglykämischen Bedingungen zu testen. Parallel dazu wurde erneut das 10 %ige TE-Oleogel getestet, um zu untersuchen, ob dieses Oleogel auch unter hyperglykämischen Bedingungen wirkt und somit ggf. auch bei diabetischen Wunden angewandt werden könnte. Als Positivkontrolle diente hier der Wachstumsfaktor PDGF (*platelet-derived growth factor*), für den bereits eine wundheilungsfördernde Wirkung bei diabetischen Ulcera gezeigt wurde (Keswani *et al.*, 2004). Da PBS die wässrige Phase der W/O-Emulsion 60 % sowie das Lösungsmittel von PDGF darstellte, wurde es als wirkstofffreie Kontrolle mitgeführt. Es wurde bereits in vorherigen Untersuchungen gezeigt, dass Sonnenblumenöl, die Ölphase des Oleogels und auch der Emulsionen, die Wundheilung im Vergleich zu PBS tendenziell verschlechtert (Steinbrenner *et al.*, in Revision), deshalb wurde auf einen Vergleich damit verzichtet. Die Untersuchung erfolgte mithilfe des unter 4.3.3.5.1 etablierten hyperglykämischen *Ex-vivo*-Wundheilungsmodells.

Unter hyperglykämischen Bedingungen wurde eine statistisch signifikante Wundheilungssteigerung für die 60 %ige W/O-Emulsion ($317 \mu\text{m} \pm 20$) und PDGF ($358 \mu\text{m} \pm$

45) gegenüber PBS ($189 \mu\text{m} \pm 23$) beobachtet. Das TE-Oleogel ($326 \mu\text{m} \pm 28$) zeigte ebenfalls eine deutliche Zunahme in der Länge der regenerierten Epidermis, jedoch war ihr Effekt nicht statistisch signifikant ($p = 0,067$). Für beide galenischen Formulierungen sowie für PDGF konnte auch unter euglykämischen und hyperosmolaren Bedingungen eine tendenziell positive Beeinflussung der Wundheilung festgestellt werden (**Abbildung 4.30**).

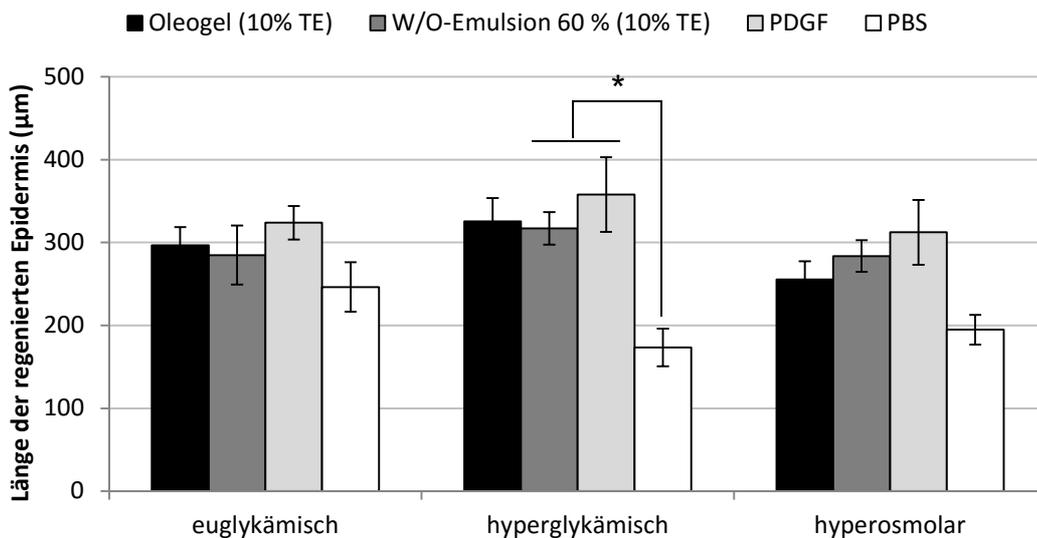


Abbildung 4.30: Einfluss von TE in verschiedenen galenischen Formulierungen auf die porcine *Ex-vivo*-Wundheilung unter hyperglykämischen Bedingungen. Länge der regenerierten Epidermis (in μm) von porcinen Stanzbiopsien, die nach Verwundung für 48 Stunden mit einem TE-Oleogel (10 %), einer 60 %igen W/O-Emulsion (mit 10 % TE-Oleogel), PDGF (120 ng/ml) und PBS behandelt wurden. Die vier Behandlungsvarianten sind jeweils für die Versuchsdurchführung unter euglykämischen, hyperglykämischen und hyperosmolaren Bedingungen getrennt voneinander gruppiert ($n = 16$ jeweils in Doppelbestimmung; Mittelwert \pm Standardfehler; *: statistisch signifikant mit $p < 0,05$ gegenüber der PBS-Behandlung gemäß dem verwendeten *linear mixed model* mit anschließender *Bonferroni*-Korrektur für Mehrfachvergleiche).

4.3.3.6.4 Auswirkungen von TE und seiner Hauptkomponente Betulin auf die Wundheilung in verschiedenen diabetischen *In-vitro*-Modellsystemen

Es konnte sowohl für juvenile (**siehe 4.3.3.3.1**) als auch für adulte, nicht-diabetische (**siehe 4.3.3.4**) Keratinozyten gezeigt werden, dass sie unter hyperglykämischen verglichen mit euglykämischen Bedingungen zu einem verlangsamten Wundverschluss *in vitro* führen. Diese zweidimensionalen Wundheilungsmodelle wurden verwendet, um die Wirkung von TE und seiner Hauptkomponente Betulin auf die Geschwindigkeit des Wundverschlusses zu untersuchen. Ebeling *et al.* (2014) konnten zeigen, dass die Wundheilung durch TE auch *in vitro*

gefördert wird. Hierbei musste der in DMSO gelöste TE allerdings in deutlich geringeren Konzentrationen eingesetzt werden als im Oleogel, weil zum einen die Freisetzung aktiver Substanzen aus dem Oleogel geringer war, zum anderen die Zellen *in vitro* besser zugänglich waren als *ex vivo* und *in vivo*. Deshalb wurden die folgenden Experimente mit einer 10-fach bzw. 100-fach geringeren TE-Konzentration im Vergleich zu den *Ex-vivo*-Versuchen, aber mit vergleichbaren Konzentrationen zu Ebeling *et al.* (2014) durchgeführt.

4.3.3.6.5 Wirkung von TE und seiner Hauptkomponente Betulin auf die *In-vitro*-Wundheilung infanter Keratinozyten

Für die Durchführung des Experiments wurde der klassische *Scratch-Assay* verwendet. Die Behandlung der Zellen mit TE (1 µg/ml) und Betulin (0,87 µg/ml) begann unmittelbar nach Verwundung der *Monolayer* und wurde bis zum Versuchsende fortgesetzt. Die Konzentration von Betulin wurde entsprechend ihrem Anteil im Triterpenextrakt gewählt. Daneben wurden eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO 1:1000) sowie eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Die Experimente wurden unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen durchgeführt.

Unter euglykämischen Bedingungen führte die Behandlung mit TE nach 12 und 24 Stunden unter Wundheilungsbedingungen zu einem signifikant verlangsamten Wundverschluss gegenüber dem Lösungsmittel. Für Betulin wurde im Vergleich zu DMSO über die gesamte Versuchsdauer kein Unterschied in Bezug auf die Wundheilungsgeschwindigkeit beobachtet (**Abbildung 4.31 A**). Bei Hochglukose zeigte sich mit TE über die gesamte Versuchsdauer ein signifikant verlangsamter Wundschluss. Im Gegensatz dazu wiesen Keratinozyten für die Behandlung mit Betulin im Vergleich zu DMSO ab 24 Stunden nach dem *Scratch* bis zum Versuchsende eine tendenziell erhöhte Wundheilungsgeschwindigkeit auf (**Abbildung 4.31 B**). Für die osmotische Kontrolle resultierte die Behandlung mit TE und Betulin zu 12 Stunden und 24 Stunden nach Verwundung in einem signifikant negativen Effekt auf die Wundheilung. An den beiden folgenden Detektionszeitpunkten blieb die beeinträchtigte Wundheilung für TE erhalten, während Betulin gegenüber der Lösungsmittelkontrolle keinen Unterschied aufwies (**Abbildung 4.31 C**).

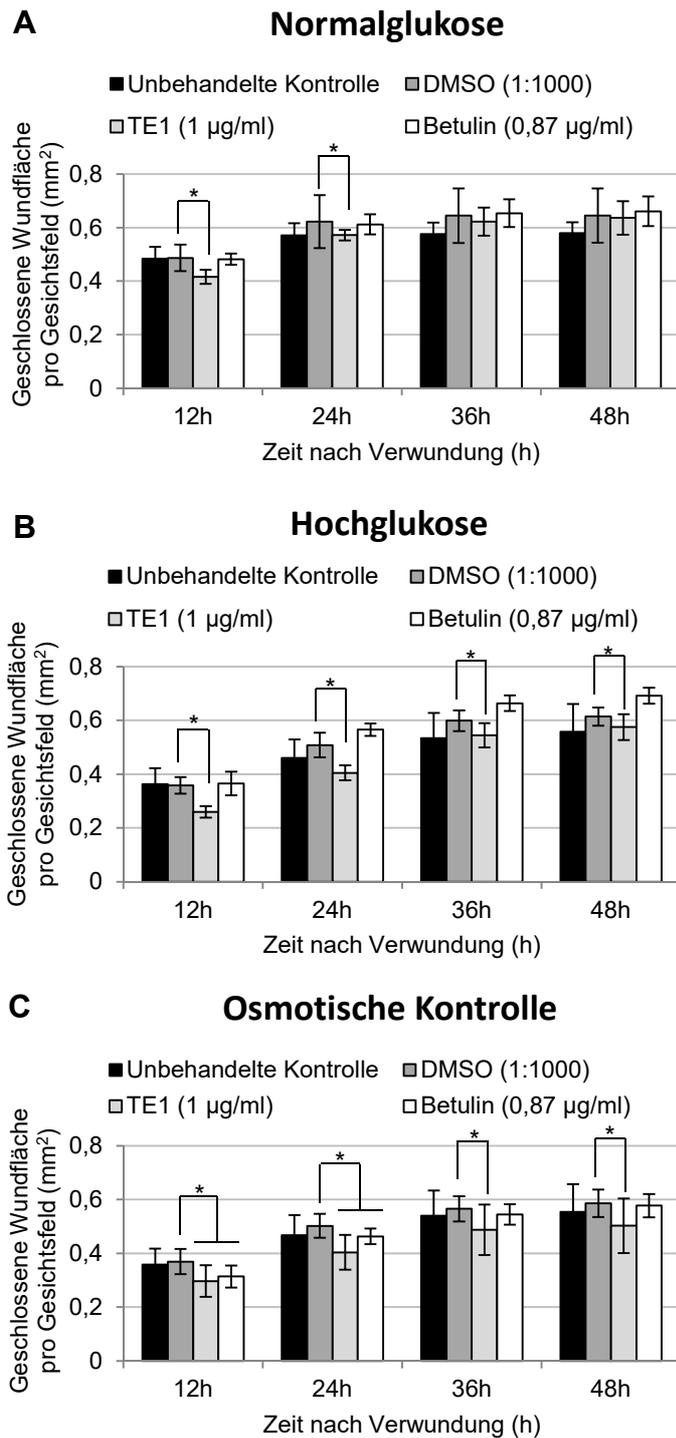


Abbildung 4.31: Auswirkungen einer TE- und Betulin-Behandlung auf die *In-vitro*-Wundheilung infanter Keratinozyten unter verschiedenen Glukosebedingungen im klassischen *Scratch-Assay*. (A, B, C) Größe der geschlossenen *Scratch*-Wundfläche pro Gesichtsfeld von humanen infanten Keratinozyten der Passage 2, die mit TE1 (1 µg/ml), Betulin (0,87 µg/ml) oder DMSO (1:1000) behandelt wurden, zu 12, 24, 36 und 48 Stunden nach Verwundung der *Monolayer*. Im Vergleich dazu werden unbehandelte Zellen gezeigt. Die vier Behandlungsvarianten sind jeweils für die Versuchsdurchführung unter (A) euglykämischen (6 mM), (B) hyperglykämischen (25 mM) und (C) hyperosmolaren (6 mM Glukose + 19 mM Mannitol) Bedingungen dargestellt. (n = 4 jeweils in Doppelbestimmung; Mittelwerte ± Standardfehler; *: statistisch signifikant mit p < 0,05 gemäß dem verwendeten *random intercept model* mit *Bonferroni*-Korrektur für Mehrfachvergleiche).

4.3.3.6.6 Einfluss von TE und seiner Einzelkomponenten auf die *In-vitro*-Wundheilung adulter, nicht-diabetischer Keratinozyten unter verschiedenen Glukosebedingungen

Die Behandlung juveniler Keratinozyten mit TE in der Konzentration von 1 µg/ml zeigte im *In-vitro*-Wundheilungsmodell unter allen Kulturbedingungen einen signifikant negativen Effekt auf die Geschwindigkeit des Wundschlusses. Die Untersuchung seiner Wirkung auf die Wundheilung adulter, nicht-diabetischer Keratinozyten wurde deshalb um die zehnfach niedrigere Konzentration (TE 100 ng/ml) erweitert. Für Betulin wurde analog verfahren, um den unter **4.31 B** beobachteten tendenziell wundheilungsfördernden Effekt gegebenenfalls noch zu steigern. Die geringeren Konzentrationen von TE und Betulin wiesen eine zehnfach höhere Lösungsmittelverdünnung auf, weshalb neben der Analyse von DMSO 1:1000 auch die von DMSO 1:10.000 erforderlich war. Die Untersuchung der beschriebenen Ansätze erfolgte sowohl unter Normal- als auch unter Hochglukose-Bedingungen für die zwei unterschiedlichen *Scratch*-Assay-Varianten.

Klassischer *Scratch*-Assay

Im klassischen *Scratch*-Assay zeigte sich für TE 1 µg/ml und Betulin 0,87 µg/ml zu 24 und 36 Stunden nach Verwundung unter Normalglukosebedingungen eine signifikant verlangsamte Wundheilung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (**Abbildung 4.32 A1**). Für die zehnfach geringeren Konzentrationen von TE und Betulin wurde unter Normalglukose kein Unterschied gegenüber DMSO beobachtet (**Abbildung 4.32 A2**). Bei erhöhter Glukosekonzentration wirkte sich TE (1 µg/ml) ab 24 Stunden nach Verwundung negativ auf die Wundheilung aus. Gleiches zeigte sich für Betulin (0,87 µg/ml) bereits ab 12 Stunden nach Verwundung (**Abbildung 4.32 B1**). Hingegen resultierte die Behandlung mit TE 100 ng/ml zu allen Detektionszeitpunkten in einer tendenziell erhöhten Wundheilungsgeschwindigkeit, während Betulin in einer Konzentration von 87 ng/ml erst ab 24 Stunden nach Verwundung einen tendenziell positiven Effekt gegenüber der Lösungsmittelkontrolle aufwies (**Abbildung 4.32 B2**).

***IncuCyte-Zoom*[®]-System**

Im *IncuCyte-Zoom*[®]-System wurde unter Normalglukosebedingungen für TE 1 µg/ml und Betulin 0,87 µg/ml bereits nach 12 Stunden ein deutlicher Trend zu einer verlangsamten Wundheilung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle beobachtet. 24 und 36 Stunden nach Verwundung wies TE einen signifikant negativen Effekt auf die Geschwindigkeit des Wundschlusses auf. Für die Behandlung der Zellen mit Betulin hingegen zeigte sich nur am letzten Detektionszeitpunkt eine signifikant verlangsamte Wundheilung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (**Abbildung 4.33 A1**). Die um eine Zehnerpotenz geringeren

Konzentrationen für TE und Betulin wiesen 8 Stunden nach Verwundung einen positiven Trend auf die Geschwindigkeit des Wundschlusses verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle auf (**Abbildung 4.33 A2**). Unter hyperglykämischen Bedingungen zeigte sich für TE 1 µg/ml und Betulin 0,87 µg/ml gegenüber DMSO zu 4 und 8 Stunden ein signifikant positiver Effekt auf die Wundheilung. Sowohl für TE als auch für Betulin wurde 24 Stunden nach Verwundung eine signifikant verzögerte Wundheilung beobachtet (**Abbildung 4.33 B1**). Die zehnfach geringeren Konzentrationen von TE und Betulin zeigten 4 und 8 Stunden nach Verwundung keinen Unterschied im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Zu 12 Stunden wies der TE einen tendenziell positiven Effekt gegenüber DMSO auf, der wundheilungsfördernde Effekt von Betulin war für diesen Detektionszeitpunkt statistisch signifikant (**Abbildung 4.33 B2**).

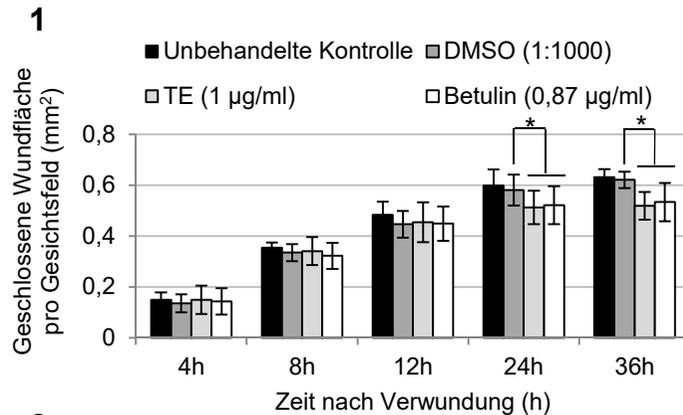
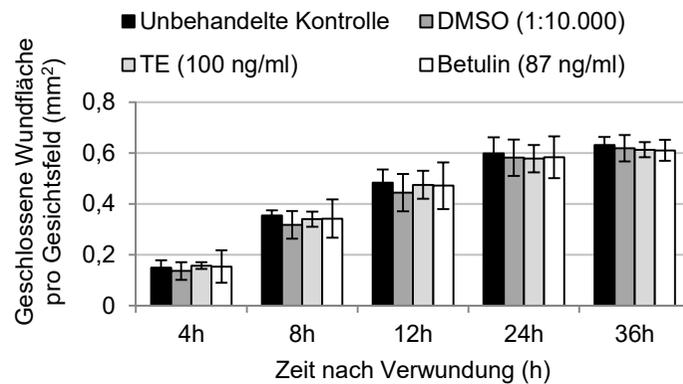
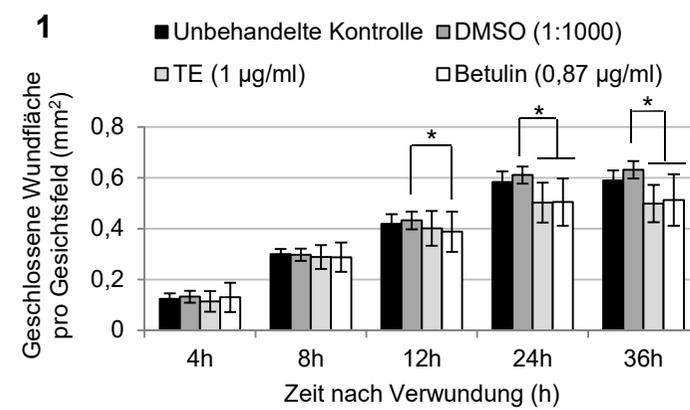
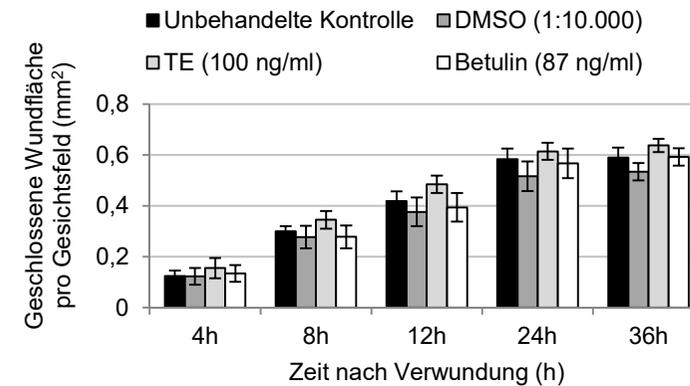
A**Normalglukose****2****B****Hochglukose****2**

Abbildung 4.32: Klassischer *Scratch*-Assay: Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von TE und Betulin auf die *In-vitro*-Wundheilung von adulten, nicht-diabetischen Keratinozyten unter verschiedenen Glukosebedingungen. (A1, A2, B1, B2) Größe der geschlossenen *Scratch*-Wundfläche pro Gesichtsfeld von adulten, nicht-diabetischen Keratinozyten, die mit TE ((A1, B1) 1 µg/ml, (A2, B2) 100 ng/ml), Betulin ((A1, B1) 0,87 µg/ml, (A2, B2) 87 ng/ml), DMSO ((A1, B1) 1:1000, (A2, B2) 1:10.000) behandelt wurden, zu 4, 8, 12, 24 und 36 Stunden nach Verwundung der *Monolayer* für die Analyse mit dem klassischen *Scratch*-Assay. Im Vergleich dazu werden unbehandelte Zellen gezeigt (A1, A2, B1, B2). Die vier Behandlungsvarianten sind jeweils für die Versuchsdurchführung unter (A) Normalglukose (6 mM)- und (B) Hochglukose (25 mM)-Bedingungen dargestellt (n = 4 jeweils in Doppelbestimmung; Mittelwerte ± Standardfehler; *: statistisch signifikant mit p < 0,05 gemäß dem verwendeten *random intercept model* mit anschließender *Bonferroni*-Korrektur für Mehrfachvergleiche).

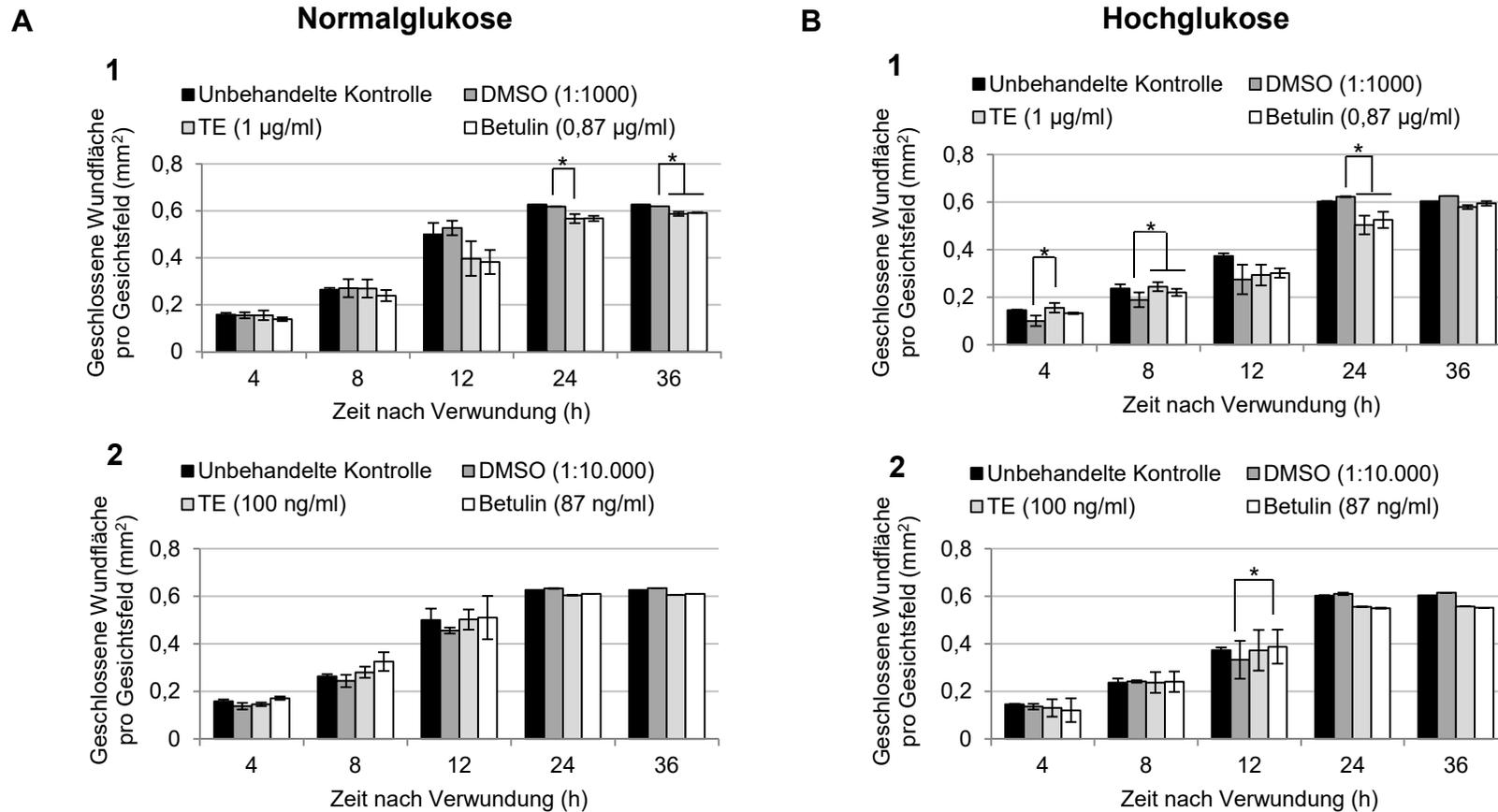


Abbildung 4.33: Scratch-Assay-Analyse im IncuCyte-Zoom®-System: Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von TE und Betulin auf die *In-vitro*-Wundheilung von adulten, nicht-diabetischen Keratinozyten unter verschiedenen Glukosebedingungen. (A1, A2, B1, B2) Größe der geschlossenen *Scratch*-Wundfläche pro Gesichtsfeld von adulten, nicht-diabetischen Keratinozyten, die mit TE ((A1, B1) 1 µg/ml, (A2, B2) 100 ng/ml), Betulin ((A1, B1) 0,87 µg/ml, (A2, B2) 87 ng/ml) oder DMSO ((A1, B1) 1:1000, (A2, B2) 1:10.000) behandelt wurden, zu 4, 8, 12, 24 und 36 Stunden nach Verwundung der *Monolayer* für die Analyse im *IncuCyte-Zoom*®-System. Im Vergleich dazu werden unbehandelte Zellen gezeigt (A1, A2, B1, B2). Die vier Behandlungsvarianten sind jeweils für die Versuchsdurchführung unter (A) Normalglukose (6 mM)- und (B) Hochglukose (25 mM)-Bedingungen dargestellt (n = 3 jeweils in Doppelbestimmung; Mittelwerte ± Standardfehler; *: statistisch signifikant mit p < 0,05 gemäß dem verwendeten *random intercept model* mit anschließender *Bonferroni*-Korrektur für Mehrfachvergleiche).

4.3.3.6.7 Einfluss von TE und seiner Einzelkomponenten auf die *In-vitro*-Wundheilung diabetischer Keratinozyten

Diabetische Keratinozyten unter euglykämischen Bedingungen zeigten im *IncuCyte-Zoom*[®]-System für die Behandlung mit TE 1 µg/ml gegenüber der Lösungsmittelkontrolle zu 4 und 8 Stunden nach Verwundung einen tendenziell positiven Effekt auf die Wundheilungsgeschwindigkeit der Zellen. Dagegen war die Wundheilung ab 12 Stunden nach Verwundung bis zum Versuchsende signifikant verlangsamt (**Abbildung 4.34 A1**). Für Betulin 0,87 µg/ml wurde zu 4 Stunden ein signifikant positiver Effekt auf die Geschwindigkeit des Wundschlusses detektiert. Bis zum Versuchsende war für jeden der folgenden Detektionszeitpunkte (8, 12, 24 und 36 Stunden) noch eine tendenziell wundheilungsfördernde Wirkung zu beobachten (**Abbildung 4.34 A1**). Für die zehnfach geringere Konzentration von TE (100 ng/ml) wiesen diabetische Keratinozyten zu 4, 8 und 12 Stunden nach Verwundung eine signifikant verlangsamte Wundheilung auf (**Abbildung 4.34 A2**). Für Betulin 87 ng/ml zeigte sich gegenüber DMSO 1:10.000 über die gesamte Versuchsdauer kein Unterschied in der Geschwindigkeit des Wundschlusses (**Abbildung 4.34 A2**).

Diabetische Keratinozyten unter Hochglukosebedingungen zeigten für die Behandlung mit TE 1 µg/ml ab 8 Stunden nach Verwundung bis zum Versuchsende eine signifikant verlangsamte Wundheilung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (**Abbildung 4.34 B1**). Betulin 0,87 µg/ml führte 4, 8 und 36 Stunden nach Verwundung zu keiner Veränderung der Wundheilungsgeschwindigkeit. Für die Detektionszeitpunkte 12 und 24 Stunden war die Wundheilung statistisch signifikant verlangsamt (**Abbildung 4.34 B1**). TE in einer Konzentration von 100 ng/ml zeigte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle über die gesamte Versuchsdauer keinen Unterschied im Wundheilungsverhalten (**Abbildung 4.34 B2**). Für Betulin 87 ng/ml wurde dagegen ab 4 Stunden bis einschließlich 24 Stunden nach Verwundung ein wundheilungsfördernder Effekt beobachtet, der zu 8 und 12 Stunden statistisch signifikant war. 36 Stunden nach Verwundung war kein Unterschied mehr zur Lösungsmittelkontrolle erkennbar (**Abbildung 4.34 B2**).

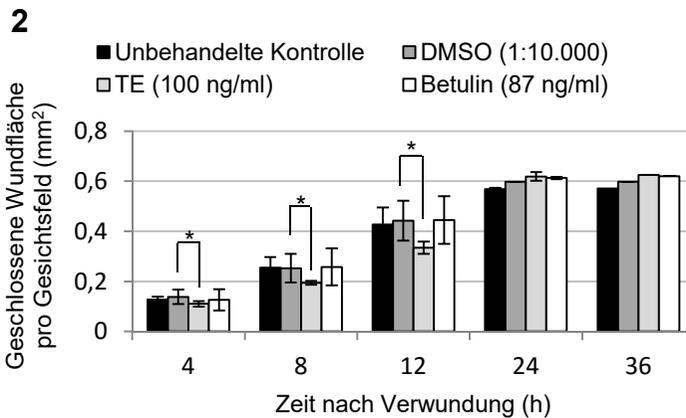
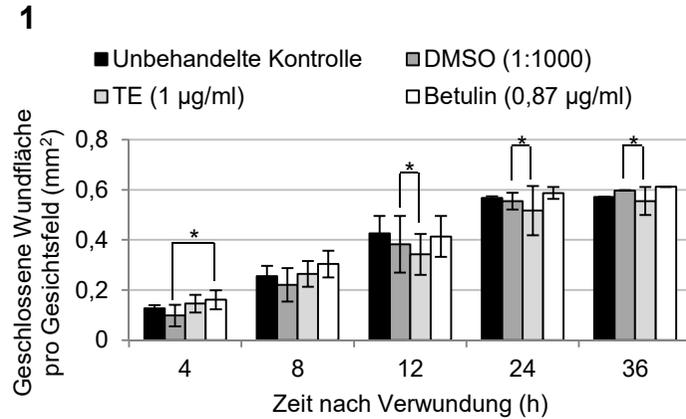
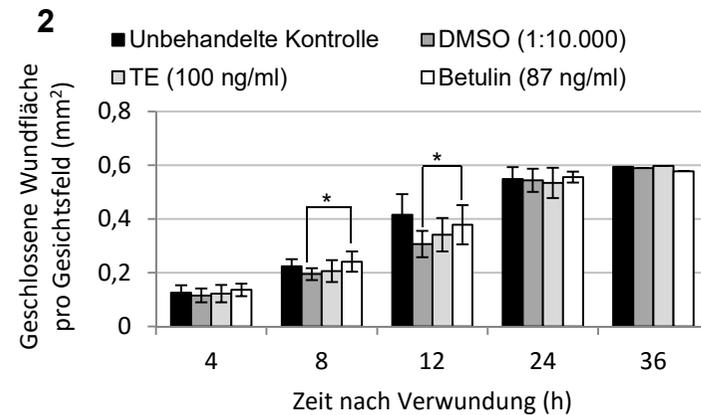
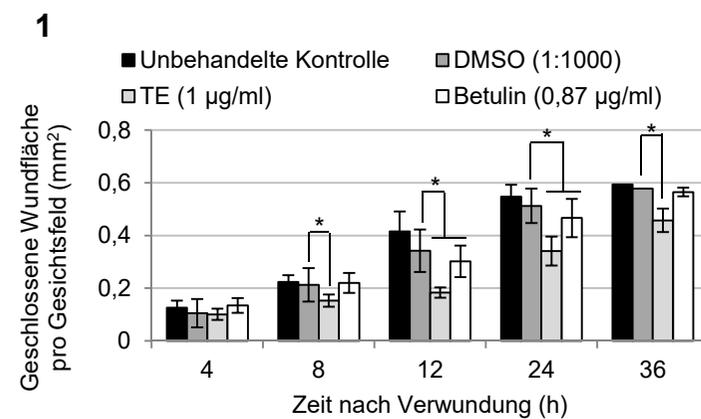
A**Normalglukose****B****Hochglukose**

Abbildung 4.34: Scratch-Assay-Analyse im IncuCyte-Zoom®-System: Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von TE und Betulin auf die In-vitro-Wundheilung von diabetischen Keratinozyten unter verschiedenen Glukosebedingungen. (A1, A2, B1, B2) Größe der geschlossenen Scratch-Wundfläche pro Gesichtsfeld von diabetischen Keratinozyten, die mit TE ((A1, B1) 1 µg/ml, (A2, B2) 100 ng/ml), Betulin ((A1, B1) 0,87 µg/ml, (A2, B2) 87 ng/ml) oder DMSO ((A1, B1) 1:1000, (A2, B2) 1:10.000) behandelt wurden, zu 4, 8, 12, 24 und 36 Stunden nach Verwundung der Monolayer für die Analyse im IncuCyte-Zoom®-System. Im Vergleich dazu werden unbehandelte Zellen gezeigt (A1, A2, B1, B2). Die vier Behandlungsvarianten sind jeweils für die Versuchsdurchführung unter (A) Normalglukose (6 mM)- und (B) Hochglukose (25 mM)-Bedingungen dargestellt (n = 4 jeweils in Doppelbestimmung; Mittelwerte ± Standardfehler; *: statistisch signifikant mit p < 0,05 gemäß dem verwendeten *random intercept model* mit anschließender *Bonferroni-Korrektur* für Mehrfachvergleiche).

4.3.3.6.8 Einfluss von TE und Betulin auf das Proliferationsvermögen adulter, nicht-diabetischer Keratinozyten unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen

Der *Scratch-Assay* bildet den Einfluss von Substanzen auf die Proliferation und die Migration ab. Um nun speziell den Einfluss auf die Proliferation zu testen, wurden BrdU-Assays durchgeführt. Nach einer Präinkubation von 48 Stunden unter Normal- und Hochglukosebedingungen wurden adulte, nicht-diabetische Keratinozyten mit TE und Betulin in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen für 6, 24 und 48 Stunden stimuliert, um deren Wirkung auf das Proliferationsvermögen der Zellen zu untersuchen. TE (1 µg/ml) und Betulin (0,87 µg/ml) wiesen 6 Stunden nach Verwundung sowohl unter eu- als auch unter hyperglykämischen Bedingungen ein vergleichbares Proliferationsvermögen wie die Lösungsmittelkontrolle auf. Für die zehnfach geringere Konzentration von Betulin (87 ng/ml) wurde bei Normalglukose ein tendenziell negativer Effekt beobachtet. Dagegen zeigte sich unter hyperglykämischen Bedingungen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ein signifikant positiver Effekt auf ihre mitotische Aktivität. Für TE 100 ng/ml zeigte sich unter keiner der Kulturbedingungen ein Unterschied gegenüber DMSO (**Abbildung 4.35 A**). Nach einer Stimulation von 24 Stunden wurde unter Normal- und Hochglukosebedingungen für 1 µg/ml TE und 0,87 µg/ml Betulin im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ein signifikant negativer Effekt auf die Proliferation beobachtet. Die zehnfach geringeren TE- und Betulinkonzentrationen führten unter eu- und hyperglykämischen Bedingungen zu keiner Veränderung des Proliferationsvermögens im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (**Abbildung 4.35 B**). Nach 48-stündiger Stimulation resultierte die Behandlung mit TE (1 µg/ml) und Betulin (0,87 µg/ml) unter eu- sowie unter hyperglykämischen Bedingungen in einer signifikant verminderten Proliferationskapazität der Zellen. Für die zehnfach geringere Konzentration von Betulin (87 ng/ml) war bei Normalglukose verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle kein Unterschied erkennbar, während unter hyperglykämischen Bedingungen ein signifikant positiver Effekt auf das Proliferationsvermögen beobachtet wurde. Die Behandlung mit TE 100 ng/ml führte sowohl unter eu- als auch unter hyperglykämischen Bedingungen zu einer vergleichbaren mitotischen Aktivität wie mit DMSO (**Abbildung 4.35 C**).

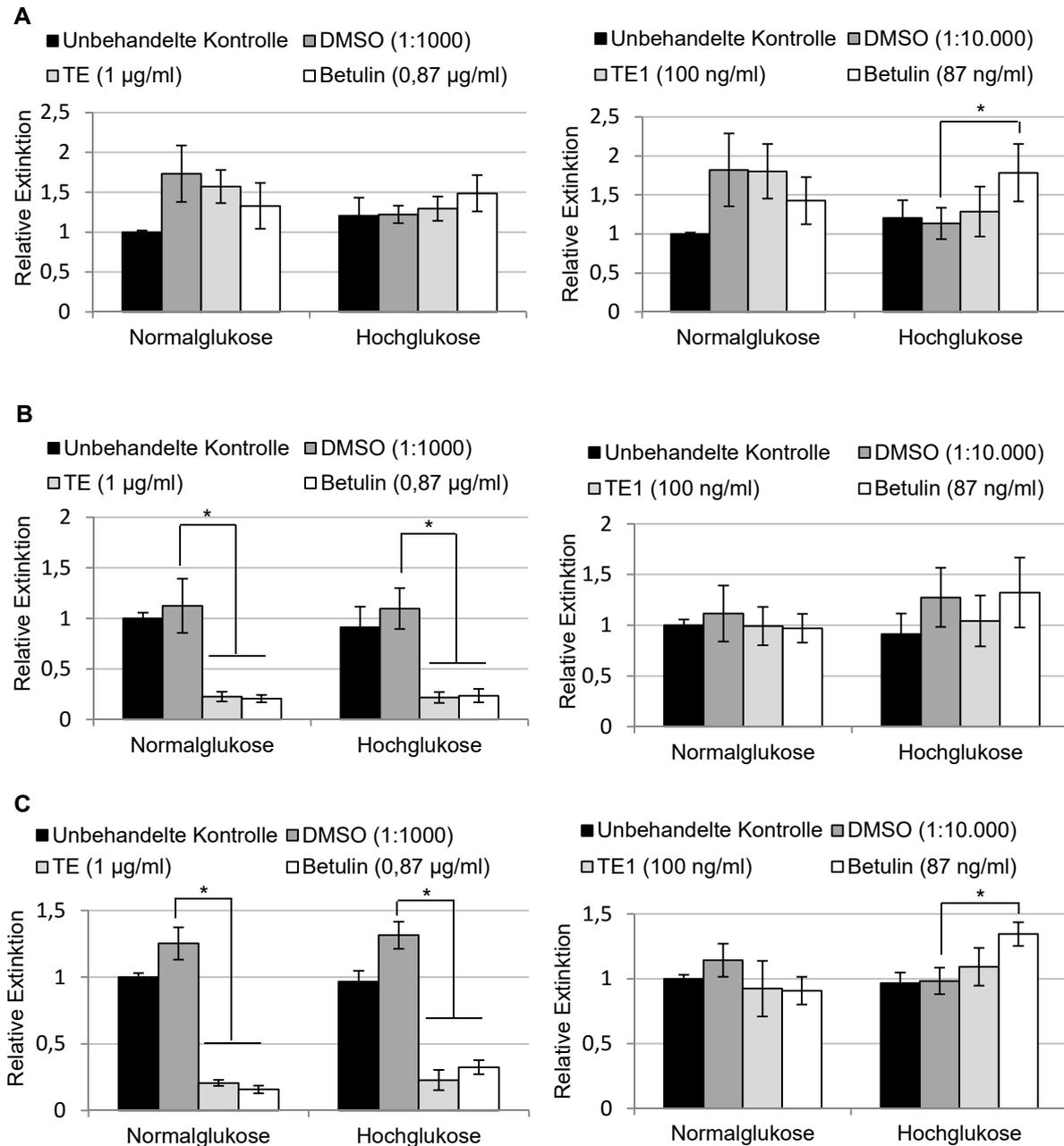


Abbildung 4.35: Einfluss verschiedener Konzentrationen von TE und Betulin auf die Proliferation adulter, nicht-diabetischer Keratinozyten unter hyperglykämischen Bedingungen. Relative Extinktion als Maß für das Proliferationsvermögen adulter, nicht-diabetischer Keratinozyten, die mit TE (1 µg/ml, 100 ng/ml), Betulin (0,87 µg/ml, 87 ng/ml) oder DMSO (1:1000, 1:10.000) unter Normal (6 mM)- und Hochglukose (25 mM)-Bedingungen behandelt wurden, zu **(A)** 6, **(B)** 24 und **(C)** 48 Stunden nach Beginn der Stimulation. Die Extinktion von unbehandelten Zellen unter Normalglukose-Bedingungen wurde zu jedem Detektionszeitpunkt auf 1 gesetzt (n = 5 jeweils mindestens in Sechsfachbestimmung; Mittelwert ± Standardfehler; statistisch signifikant mit *: p < 0,05 gemäß gepaartem t-Test nach *Student* mit anschließender *Bonferroni*-Korrektur für Mehrfachvergleiche).

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der physikalischen Hautbarriere bei Diabetikern und in diabetischen Zellen

5.1.1 Die Haut von Diabetikern weist Veränderungen für TJ- und SC-Proteine auf.

Eine intakte Hautbarriere ist für die Integrität des menschlichen Körpers von elementarer Bedeutung. Das *Stratum corneum* (SC) als äußerste Schicht der Epidermis spielt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle. Daneben verfügt die Haut über TJ-Strukturen im *Stratum granulosum*, die eine weitere Ebene der physikalischen Barriere darstellen (Brandner *et al.*, 2002; Tsukita und Furuse, 2002), die aber auch die Integrität des SC beeinflussen können (Kirschner *et al.*, 2009 und 2011; Sugawara *et al.*, 2013; Yuki *et al.*, 2012). Vor dem Hintergrund, dass Diabetiker ein erhöhtes Risiko für Hautinfektionen aufweisen (Muller *et al.*, 2005), wurde die physikalische Barriere in diabetischer im Vergleich zu gesunder humaner Haut anhand der TJ-Proteine Cldn-1, Cldn-4, Ocln und ZO-1 und des SC-Proteins Filaggrin untersucht. Immunhistochemische Analysen zeigten, dass die Intensität von Cldn-1, Cldn-4, Ocln und ZO-1 in humaner Haut von Diabetikern signifikant oder tendenziell vermindert waren. Gleiches wurde auf mRNA-Ebene für Cldn-1, Cldn-4 und Ocln beobachtet. Die Untersuchungen zur basalen Genexpression in Keratinozyten, die aus diabetischem Hautgewebe isoliert wurden, brachte geringere Cldn-1- und Cldn-4-mRNA-Level hervor, während Ocln und ZO-1 im Vergleich zu Keratinozyten nicht-diabetischen Ursprungs unverändert exprimiert wurden. Damit konnte ich zum ersten Mal beschreiben, dass es hinsichtlich der TJ-Proteine Unterschiede zwischen humaner diabetischer und gesunder Haut gibt. Eine veränderte Immunintensität von TJ-Proteinen in der Haut wurde bereits im Zusammenhang mit anderen kutanen Erkrankungen beim Menschen beschrieben. Bei vollständigem Verlust von Cldn-1 liegt das NISCH-Syndrom vor (Hadj-Rabia *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurden verminderte Level von Cldn-1 in läsionaler Haut von Personen mit atopischer Dermatitis detektiert (Batista *et al.*, 2015; Gruber *et al.*, 2015). De Benedetto *et al.* (2011) beschrieben eine reduzierte Expression von Cldn-1 in nicht-läsionaler Haut von AD-Patienten einer amerikanischen Patientenkohorte. In läsionaler psoriatischer Haut wurden Cldn-4, Ocln und ZO-1 erhöht sowie in mehr epidermalen Schichten gefunden, während Cldn-1 vermindert oder vollständig herunterreguliert war (Kirschner *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2007). Beim Plattenepithelkarzinom zeigte sich ebenfalls eine breitere

epidermale Verteilung von ZO-1 sowie ein Verlust von Ocln. Die Immunintensität von Cldn-1 war in unteren Epidermisschichten geringer. Bei Personen mit *Ichthyosis vulgaris* wurden verminderte epidermale Immunintensitäten von Ocln und ZO-1 detektiert (Gruber *et al.*, 2011). Während bei den oben genannten Hauterkrankungen die Immunintensität von Cldn-1, Cldn-4, Ocln und ZO-1 unterschiedlich verändert und teilweise auch mit einer abnormen epidermalen Verteilung assoziiert war, wurden die untersuchten TJ-Proteine bei *Diabetes mellitus* ganzheitlich vermindert, ohne Auswirkungen auf ihre Lokalisation in der Epidermis gefunden. Dies deutet auf einen umfassenden TJ-basierten Barriereverlust hin.

Im Gegensatz zu den TJ-Proteinen war Filaggrin in diabetischer Haut sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene tendenziell hochreguliert. Dennoch muss eine erhöhte Filaggrin-Expression nicht zwangsläufig zu einer Erhöhung des funktionellen Filaggrin-Monomers führen. Sugawara *et al.* (2013) zeigten in Cldn-1-defizienten Mäusen, dass zwar Filaggrin-Vorläufermoleküle stark angereichert waren, monomeres Filaggrin aber nicht detektiert werden konnte. Da der im Rahmen meiner Doktorarbeit verwendete Antikörper sowohl gegen Profilaggrin als auch gegen monomeres Filaggrin gerichtet war, könnte die erhöhte Filaggrin-Expression in diabetischem Gewebe auf akkumulierte Filaggrin-Vorläufermoleküle zurückgeführt werden, die möglicherweise hinderlich für die Ausbildung eines funktionalen *Stratum corneum* sind. Thyssen *et al.* (2011) zeigten, dass dänische Patienten mit Typ-2-*Diabetes* signifikant häufiger einen Filaggrin-negativen Phänotyp aufweisen als gesunde Personen. Bei Personen, die gemäß eigener Angabe an *Diabetes mellitus* erkrankt waren, fand sich parallel ein signifikant vermehrtes Auftreten von atopischer Dermatitis. Da ein vermindertes Level oder der komplette Verlust von Filaggrin mit Hauterkrankungen, wie der atopischen Dermatitis (AD) (Batista *et al.*, 2015) oder *Ichthyosis vulgaris* (Smith *et al.*, 2006), assoziiert sind, besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen einer dysfunktionalen Hautbarriere und *Diabetes*. Weiterhin konnte eine signifikant positive Korrelation von Schwangerschafts-*Diabetes* mit atopischer Dermatitis und Allergensensibilisierung bei Neugeborenen detektiert werden (Kumar *et al.*, 2009).

Obwohl die Veränderungen der TJ-Proteine und von Filaggrin natürlich unabhängig voneinander sein können, deuten Ergebnisse von Gruber *et al.* (2015), Sugawara *et al.* (2013) und Yuki *et al.* (2012) an, dass eine Herabregulation von TJ-Proteinen bzw. eine gestörte TJ-Barriere Auswirkungen auf die Homöostase des SC, inklusive einer Erhöhung der Filaggrin-Expression, hat. Damit könnten Veränderungen von TJ-Proteinen ursächlich für die Filaggrin-Veränderungen sein. Diese Hypothese müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Bezüglich der Funktionalität der Hautbarriere konnte in Hautäquivalenten mit beeinträchtigter TJ-Barriere durch Behandlung mit *Clostridium perfringens*-Enterotoxin, was vor allem zu einer Herabregulation von Cldn-4 führt, eine fehlende Reifung von lamellaren Lipidstrukturen und ein

erhöhter pH-Wert sowie eine gestörte *Outside-in*-Hautbarriere beobachtet werden (Yuki *et al.*, 2012). Sugawara *et al.* (2013) wiesen eine gesteigerte Wasserverdunstung über isolierte SC-Sheets von Cldn-1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach. Unter Verwendung eines X-Gal-Penetrations-Assays konnte gezeigt werden, dass ebenfalls eine beeinträchtigte *Outside-in*-Barriere des SC vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass die Veränderungen von TJ-Proteinen, die in diabetischer Haut beobachtet wurden, Konsequenzen für die Funktionalität der Hautbarriere von Diabetikern haben könnten. In der gegenwärtigen Literatur finden sich zahlreiche Publikationen, die Veränderungen des *Stratum corneum* in diabetischer Haut beschreiben. Diesbezüglich zeigten Sakai *et al.* (2005), dass Diabetiker mit erhöhter Nüchternblutglukose eine signifikant geringere Hydratisierung des *Stratum corneum* aufweisen. Seité *et al.* (2011) detektierten eine geringere Hautfeuchtigkeit am Unterarm von Diabetikern im Vergleich zu gesunden Individuen. Darüber hinaus wurde für diabetische Patienten ebenfalls ein veränderter Lipidgehalt der Hautoberfläche beobachtet. Bei erhöhtem Nüchternblutzucker und HbA_{1c}-Wert wurden signifikant geringere Lipide auf der Stirnoberfläche von Diabetikern nachgewiesen. Auch am Oberschenkel und am volaren Unterarm zeigte sich ein tendenziell reduzierter Lipidgehalt (Sakai *et al.*, 2005). Diabetiker weisen damit dermale Eigenschaften auf, die auch bei altersbedingter Hauttrockenheit vorzufinden sind. Darüber hinaus beobachteten Yoon *et al.* (2002) eine veränderte Abschuppung von diabetischer Haut. Das erhöhte Infektionsrisiko von Diabetikern (Muller *et al.*, 2005) könnte demzufolge auf einer beeinträchtigten SC-Barriere beruhen. Dagegen bestand kein Unterschied hinsichtlich des transepidermalen Wasserverlustes zwischen Diabetikern und gesunden Probanden (Sakai *et al.*, 2005; Seirafi *et al.*, 2009).

5.1.2 Diabetische Keratinozyten weisen eine erhöhte Permeabilität für Ionen sowie für höher- und hochmolekulare Substanzen auf.

Da (TJ-)Barriere-Assays an diabetischer Haut den Zugang zu größeren Mengen frischer diabetischer Haut vorausgesetzt hätte, der im Rahmen der Doktorarbeit nicht möglich war, wurde die Barrierefunktion von diabetischen versus nicht-diabetischen Keratinozyten in Zellkultur untersucht. Durch Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration (Calcium-Switch) können auch in kultivierten Keratinozyten TJ-Strukturen induziert werden, deren Zusammensetzung der TJ-Strukturen im *Stratum granulosum* entspricht (Brandner *et al.*, 2002; Pummi *et al.*, 2001). Damit einhergehend verändern sich die Permeabilitätseigenschaften von primären human Keratinozyten-Sheets für Ionen sowie für höher- und hochmolekulare Substanzen (Helfrich *et al.*, 2007; Kirschner *et al.*, 2011; Yuki *et al.*, 2007).

Primäre humane Keratinozyten diabetischen Ursprungs zeigten signifikant verminderte mRNA-Level von Cldn-4 und tendenziell verminderte mRNA-Level für Cldn-1. In früheren Publikationen wurde bereits gezeigt, dass der siRNA-vermittelte *Knockdown* von Cldn-1, Cldn-4, Occludin oder ZO-1 in Keratinozyten mit einer erhöhten Permeabilität für Ionen und FD-4 assoziiert war. Bei Knockdown von Cldn-1 und ZO-1 wurde zusätzlich eine gesteigerte Durchlässigkeit für FD-40 beobachtet (Kirschner *et al.*, 2013; Saitou *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der von mir analysierten TJ-Proteine für die Ausbildung einer intakten Keratinozytenbarriere. Diabetische Keratinozyten wiesen einen Tag nach dem Calcium-Switch eine signifikant undurchlässigere Barriere für Ionen und die untersuchten FD-Moleküle verglichen mit Keratinozyten nicht-diabetischen Ursprungs auf. Dagegen wurde von Tag 3 an bis einschließlich Tag 8 nach Calcium-Switch für nicht-diabetische Keratinozyten ein signifikant höherer TER beobachtet, der eine geringere Ionen-Permeabilität impliziert. Hinsichtlich der Keratinozytenbarriere für FD-4 und FD-40 waren ab Tag 4 Keratinozyten aus dem Hautgewebe von Diabetikern signifikant durchlässiger.

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) liefert zu früheren Zeitpunkten nach Calcium-Switch (≤ 4 Tage) Informationen über die Durchlässigkeit der sich formierenden TJ-Barriere (Kirschner *et al.*, 2013; Zorn-Kruppa *et al.*, 2015). Dabei wurde 48 bis 72 Stunden ein Anstieg der TJ-Barrierefunktion beobachtet, die dann zu einer Homöostase führte (Kirschner *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass der TER nicht zwischen parazellulärer und transzellulärer Permeabilität unterscheidet (Kirschner und Brandner, 2012). Wie Kirschner *et al.* (2013) aber unter Verwendung der 2-Wege-Impedanz-Spektroskopie nachweisen konnten, ist die Höhe des TER in Keratinozyten maßgeblich durch die parazelluläre Ionen-Permeabilität bedingt, die durch *Tight Junctions* reguliert wird (Kirschner *et al.*, 2013). Um neben dem *pore pathway*, der ausschließlich die Passage von Ionen und kleinen ungeladenen Molekülen erlaubt, auch den *leak pathway* durch *Tight Junctions* zu untersuchen, wurde zusätzlich die Permeabilität von höher- und hochmolekularen Substanzen (FITC-assoziierte Dextran-Moleküle mit 4 und 40 kDa) über Keratinozyten bestimmt. Mit zunehmender Versuchsdauer kann sowohl für die Ionenpermeabilität als auch für die FITC-Dextran-Permeabilität zusätzlich der Beitrag einer präliminären *Stratum-corneum*-Barriere hinzukommen, der je nach Medium und Spender variiert (Zorn-Kruppa *et al.*, 2015).

Meine Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass zu Beginn der TJ-Bildung (Tag 1 nach Ca-Switch) diabetische Zellen sogar eine weniger permeable TJ-Barriere sowohl für Ionen als auch für größere Moleküle aufweisen. Für Ionen kehrte sich dieser Effekt innerhalb der nächsten 48 Stunden um, so dass nun diabetische Zellen eine höhere TJ-Permeabilität aufwiesen. Dieser Effekt blieb über die gesamte Versuchszeit bestehen, wobei, wie oben beschrieben, zu späteren Zeitpunkten dies nicht nur eine erhöhte TJ-Permeabilität widerspiegeln muss, sondern

auch eine erhöhte Permeabilität des präliminären SC beinhalten kann. Für FD-4 und FD-40 trat erst ab Tag 4 eine erhöhte Permeabilität ein. Demnach zeigten sich Unterschiede für den *pore pathway* und den *leak pathway* durch *Tight Junctions*. Dieses Ergebnis könnte auf eine voneinander unabhängige Regulation der zwei Permeationswege hindeuten (Shen *et al.*, 2011). Da die Permeabilität von diabetischen Keratinozyten zu späteren Zeitpunkten weiter zunahm, ist davon auszugehen, dass entweder ein defektes SC vorlag oder sogar ein generelles Differenzierungsproblem, das durch veränderte Expression von Insulin- und IGF-*I*-Rezeptor entstehen könnte (Wertheimer *et al.*, 2000).

Vor dem Hintergrund einer geringeren Immunintensität der TJ-Komponenten Cldn-1 und Cldn-4 in diabetischer Haut kann geschlussfolgert werden, dass die erhöhte Ionenpermeabilität zu frühen Zeitpunkten vermutlich durch die Herabregulation dieser Moleküle bedingt ist. Da Claudine vor allem im *pore pathway* involviert sind, während Occludin und ZO-1 eine größere Rolle im *leak pathway* spielen (Shen *et al.*, 2011) und wiederum die mRNA-Level dieser beiden Proteine in kultivierten diabetischen Keratinozyten nicht wesentlich verändert sind, könnte dies eine Erklärung für die unveränderte Permeabilität größerer Moleküle zu früheren Zeitpunkten nach Calcium-Switch sein. Dies deutet dann auch darauf hin, dass die veränderte Permeabilität für diese Moleküle zu späteren Zeitpunkten vor allem auf einer veränderten Durchlässigkeit des präliminären SC beruhen könnte. Weshalb die Permeabilität der TJs zu Beginn der TJ-Bildung (24 Stunden) in diabetischen Zellen im Vergleich zu nicht-diabetischen erniedrigt ist, kann bisher nicht erklärt werden.

5.1.3 Mögliche Ursachen des verminderten TER in diabetischen Keratinozyten

Diabetes mellitus Typ 2 ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Blutglukosekonzentration und durch Insulinresistenz. Für die Auswirkungen einer Hyperglykämie auf den TER von Keratinozyten aus dem Hautgewebe gesunder Probanden zeigte sich zu frühen Zeitpunkten kein Effekt, zu späten Zeitpunkten nach dem Calcium-Switch eine signifikante Herunterregulation. Da kein Effekt zu frühen Zeitpunkten beobachtet wurde und die Keratinozytenbarriere ab circa Tag 4 nicht mehr nur aus der TJ-Barriere besteht, sondern zusätzlich auch durch das vorhandene präliminäre *Stratum corneum* bedingt ist, deutet dies darauf hin, dass Hyperglykämie vor allem die SC Barriere beeinflusst. In der Haut von Ratten mit chronischer Hyperglykämie wiesen Park *et al.* (2011) einen verminderten Zusammenhalt von Korneozyten nach, der auf eine geringere Korneodesmosomen-Adhäsion zurückgeführt wurde. Die beeinträchtigte SC-Integrität war das Resultat einer verminderten Hydratation sowie einer reduzierten epidermalen Lipidsynthese. Generell kann das Fehlen eines Effekts zu frühen Zeitpunkten aber natürlich auch daran liegen, dass Hyperglykämie einen gewissen Zeitraum

benötigt, um sich in den Zellen zu manifestieren. *Advanced glycation endproducts* (AGEs), die mit negativen Effekten assoziiert sind, sammeln sich in humaner Haut zunehmend mit normalem Altern an. Dieser Prozess wird durch Hyperglykämie beschleunigt (Gkogkolou und Böhm, 2012 als Übersichtsartikel). Yokota und Tokudome (2015) zeigten, dass die Haut von haarlosen Mäusen, die mit Hilfe von Glyoxal in allen Schichten, einschließlich des *Stratum corneum*, glykiert worden war, eine erhöhte Permeabilität für das hydrophile Molekül Natrium-Fluorescein (376 g/mol) aufwies. Die Glykierung von Molekülen führt zu einer Akkumulation von *advanced glycation endproducts* (AGEs) in oberen Epidermisschichten (Kawabata *et al.*, 2011). Somit könnten speziell diese AGEs zu der in meiner Arbeit beobachteten Barriere-Beeinträchtigung beitragen. Dies sollte in zukünftigen Experimenten genauer untersucht werden.

Als weiteres Charakteristikum des *Diabetes mellitus* Typ 2 neben der Hyperglykämie gilt die Insulinresistenz, bei der die Zielzellen von Insulin nicht adäquat auf das Hormon ansprechen. Um die Auswirkungen der Insulinresistenz auf die Keratinozytenbarriere zu testen, wurde die Insulin-vermittelte Signaltransduktion über den Insulin-Rezeptor und den IGF-*I*-Rezeptor mittels spezifischer Antagonisten verhindert. Die Inhibition nur des Insulin-Rezeptors führte nicht zu einem verminderten transepithelialen Widerstand. Möglicherweise kann der für Insulin zugängliche IGF-*I*-Rezeptor den Ausfall des Insulin-Rezeptors kompensieren (De Kerdanet *et al.*, 2015). Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Ausmaß der Antagonisierung nicht ausreichte, um einen Effekt auf den TER zu zeigen. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass zwar ein herabregulierender Effekt auf die Phosphorylierung des stromabwärts gelegenen Moleküls Akt beobachtet wurde, dieser aber bei der quantitativen Auswertung nicht signifikant war. Die Konzentration des Inhibitors orientierte sich an Literaturangaben (Vikram und Jena, 2010). Die gleichzeitige Antagonisierung beider Rezeptoren führte hingegen zu einem signifikant geringeren TER von Tag 1 nach Calcium-*Switch* durchgehend bis zum Versuchende an Tag 5. In zukünftigen Experimenten sollte nun der Zusammenhang zwischen IR-/IGF-*I*-R-Antagonisierung und der Expression von TJ- und SC-Proteinen untersucht werden. Noch unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Carien Niessen, die unter Verwendung von *Knockout*-Mäusen generiert wurden, stützen die Ergebnisse meiner Permeabilitätsanalysen unter Insulinresistenz-Bedingungen. Ein *Knockout* nur des Insulin-Rezeptors führte nicht zu einer verminderten TJ-Barriere in murinen Keratinozyten. Nur ein Doppel-*Knockout* des Insulin- und des IGF-*I*-Rezeptors zeigte eine Beeinträchtigung der TJ-Barriere.

5.2 Charakterisierung der Dermisstruktur von humaner diabetischer Haut

5.2.1 Die Genexpression dermalen Strukturproteine ist in Fibroblasten diabetischen Ursprungs im Vergleich zu gesunden Kontrollen verändert.

Fibroblasten als Produzenten dermalen Strukturproteine sind für den Aufbau und die Aufrechterhaltung eines intakten Hautbindegewebes von entscheidender Bedeutung. Pathophysiologische Bedingungen des *Diabetes mellitus* können diese dermale Homöostase stören, indem sie den Phänotyp von Fibroblasten verändern (Lerman *et al.*, 2003; Molinari *et al.*, 2008). Zur Charakterisierung der Dermisstruktur in diabetischer Haut wurde in der vorliegenden Arbeit die Genexpression von Strukturproteinen des Bindegewebes in Fibroblasten untersucht. Für vergleichende Analysen standen Hautbiopsien von Diabetikern und gesunden Individuen zur Verfügung, die hinsichtlich Körperlokalisierung sowie Geschlecht und Alter der Spender gepaart wurden. Die mRNA-Level der fibrillären Kollagene Typ I, $\alpha 1$ und Typ V, $\alpha 2$ waren bei zwei der vier getesteten Lokalisationen in diabetischem Gewebe herunterreguliert. In den anderen zwei Fällen war die Genexpression in diabetischer Haut unverändert oder deutlich erhöht verglichen mit gesunden Biopsien. Dabei waren die mRNA-Level der zwei Kollagenmoleküle in der Haut von Diabetikern im Vergleich zu gesunden Probanden für alle getesteten Lokalisationen gleichförmig verändert oder unverändert. Vor dem Hintergrund, dass Kollagen V heterotypische Fibrillen mit Typ I-Kollagen ausbildet (Wenstrup *et al.*, 2004), könnte dies auf einen gemeinsamen Regulationsmechanismus der Genexpression hindeuten. Van der Pijl *et al.* (1998) beobachteten ebenfalls eine Heterogenität der Immunintensität von Kollagen I. Das Level schien von den assoziierten Begleitsymptomen (zum Beispiel Albuminurie) abhängig zu sein, wobei häufig, aber nicht immer, ein erhöhtes Level verglichen mit gesunden Probanden zu beobachten war. Diese Studie wurde zwar an Patienten mit Typ-1-Diabetes durchgeführt, aber Knaš *et al.* (2013) konnten unter Verwendung von Rattenmodellen nachweisen, dass Störungen der extrazellulären Matrix bei *Diabetes* Typ 1 und Typ 2 ähnlich sind. In der Haut von diabetischen Ratten des Typs 2 wurde ein geringeres $\alpha 1$ -Kollagen-I-mRNA-Level beobachtet (Luttrell *et al.*, 2008). Auf Proteinebene wurde Kollagen I in diabetischer Maushaut ebenfalls vermindert gefunden (Bermudez *et al.*, 2011). *Advanced glycation endproducts* in Form von glykiertem BSA konnten die Expression von Genen, die für Kollagenketten kodieren, in kultivierten Fibroblasten sowohl herab- als auch hochregulieren (Molinari *et al.*, 2008; Serban *et al.*, 2008). Möglicherweise ist die Kollagenexpression in Abhängigkeit individueller Komplikationsursachen tatsächlich nicht einheitlich bei Diabetikern verändert. Eine Studie mit einer größeren Zahl von Typ-2-Diabetikern und einer genauen Dokumentation der *Diabetes*-Komplikationen wäre für die Zukunft wünschenswert.

Weiterhin wurde die Genexpression von Elastin und Fibrillin-1 untersucht, die auf Proteinebene Bestandteile von Elastinfasern sind. Für Elastin zeigten sich in drei von vier Fällen deutlich verminderte mRNA-Level. Die Genexpression von Elastin in der Haut von Diabetikern wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Typ 2-diabetische Ratten wiesen eine verminderte Genexpression für Elastin auf (Luttrell *et al.*, 2008). Molinari *et al.* (2008) detektierten in kultivierten Hautfibroblasten, die zusammen mit glykiertem BSA inkubiert wurden, ebenfalls eine Herunterregulation von Elastin-mRNA. Somit entsprachen 3 von 4 Proben den Erkenntnissen, die in Tier-/Zellkultur-Modellen gefunden wurden. Der abweichende Fall könnte zeigen, dass, ähnlich wie oben für Kollagen beschrieben, weitere (krankheitsassoziierte) Faktoren einen Einfluss haben könnten, die nicht unbedingt im Modell abgebildet werden. Für Fibrillin-1 war die Genexpression in meinen Untersuchungen in der Dermis von drei Geweben diabetischen Ursprungs erhöht, von denen zwei aber verminderte Elastin-Level aufwiesen. Im dritten Gewebe mit erhöhter Fibrillin-1-Genexpression war ebenfalls die von Elastin gesteigert. Bei der vierten Gewebepaarung zeigten sich sowohl für Fibrillin-1 als auch für Elastin verminderte mRNA-Level. Die Genexpression von Fibrillin-1 wurden bisher nicht in der Haut von Diabetikern untersucht. Im *Corpus cavernosum* und in der Niere von diabetischen Ratten des Typs 2 zeigten sich erhöhte Fibrillin-1-mRNA-Level (Gaikwad *et al.*, 2010; Luttrell *et al.*, 2008), während sie im Herzgewebe vermindert waren (Gaikwad *et al.*, 2010). Aufgrund dieser vermeintlich organspezifischen Regulation der Fibrillin-1-Genexpression unter diabetischen Bedingungen können keine Gesetzmäßigkeiten für andere Gewebe abgeleitet werden. Um verlässliche Aussagen für humane Haut machen zu können, muss die Anzahl getesteter Hautproben erhöht werden.

Für die Untersuchung der Fibronektin-mRNA-Level zeigte sich in drei von vier Fällen eine Herunterregulation. Hierbei handelte es sich um die gleichen drei Gewebe, die auch eine geringere Genexpression von Elastin aufwiesen. Kolbe *et al.* (1990) wiesen ebenfalls verminderte mRNA-Level in Hautproben von Typ-2-Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach. Auch in Biopsien, die aus dem Wundrand diabetischer Ulzera von Patienten mit Typ-2-Diabetes stammten, beobachteten Yang *et al.* (2000) eine geringere Expression von Fibronektin-mRNA verglichen mit normaler Haut. Hinzu kommt, dass Fibroblasten, die in Kultur zusammen mit AGEs inkubiert wurden, auch verminderte Fibronektin-mRNA-Level aufwiesen (Molinari *et al.*, 2008). Die erkennbare Tendenz zu einer gestörten Genexpression von Fibronektin in der Haut von Diabetikern und diabetischen Modellen sind Hinweise auf die Bedeutsamkeit von Fibronektin für die kutane Homöostase.

5.2.2 Kollagenfasern weisen in humaner diabetischer Haut eine veränderte Orientierung im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf.

Mithilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie in Kombination mit dem Fiji-Zusatzmodul *Directionality* wurde eine Methode etabliert, mit der die räumliche Ausrichtung von Kollagen- und Elastinfasern in Hautproben untersucht werden konnte. Anschließend wurde untersucht, ob mit diesem Versuchs-*Setting* Veränderungen von Kollagen- und Elastinfasern in humanem diabetischem Hautgewebe verglichen mit nicht-diabetischem Hautgewebe beobachtet werden kann. Hierbei wurde darauf geachtet, dass jeweils ein diabetisches und ein nicht-diabetisches Gewebe aus derselben Körperlokalisierung stammten. Das Geschlecht und das Alter der Gewebespende sollten nach Möglichkeit ebenfalls übereinstimmen, da gezeigt werden konnte, dass diese Parameter einen Einfluss auf die Struktur der Dermis haben (Shuster *et al.*, 1975).

Für die untersuchten Gewebepaarungen zeigte sich hinsichtlich der räumlichen Orientierung von Kollagenfasern eine signifikante Veränderung in diabetischem Gewebe. Während Gewebe gesunder Individuen eine recht einheitliche Anordnung von Kollagenfasern aufwies, die durch ein deutliches Übergewicht an vertikal im Vergleich zu horizontal verlaufenden Fasern gekennzeichnet war, wurde in den Geweben von Diabetikern eine erhöhte Variabilität in den Faserorientierungen beobachtet, die mit Folgen für die Hautintegrität assoziiert sein könnte.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass es im Laufe einer *Diabetes*-Erkrankung zu Veränderungen von Bindegewebsstrukturen kommen kann (Bailey, 1995; Sternberg *et al.*, 1985; Vlassara und Uribarri, 2014 als Übersichtsartikel). In humaner diabetischer Haut wurden eine verminderte Löslichkeit und ein geringerer Umsatz von Kollagen beobachtet, was mit erhöhter N-Glykierung von Kollagenfasern assoziiert war (Schnider und Kohn, 1981). Generell sind von Glykierungen vor allem langlebige Moleküle, wie Kollagen und Elastin, betroffen (Toyama und Hetzer, 2013). Neben Glykierungen kann es ferner zu Querverbindungen und zur Fragmentierung der Proteine kommen (Sell und Monnier, 2011). Niu *et al.* (2012) beobachteten in der Haut von Patienten mit *Typ-2-Diabetes* eine tendenziell verminderte Dermisdicke mit verkürzten, dünneren Kollagenfibrillen, die weniger dicht gepackt waren. Tanaka *et al.* (1988) konnten anhand von Rattenschwanzsehnen zeigen, dass die Glykierung von Kollagen zu einer Ausdehnung seiner dreidimensionalen Struktur in der xy-Ebene führt. Mithilfe meines Versuchs-*Settings* konnte ich erstmals zeigen, dass eine abnormale Struktur von Kollagen in diabetischer Haut ebenfalls mit einer veränderten Orientierung der Fasern in z-Richtung assoziiert sein könnte.

Für Elastinfasern konnte keine deutliche Veränderung in meinen Experimenten beobachtet werden. Die fehlende Veränderung für Elastinfasern könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass bereits in der Haut von gesunden Spendern – im Unterschied zu Kollagenfasern – eine deutliche Unstrukturiertheit vorliegt. Darunter ist ein vergleichbarer Anteil aller Orientierungen

zu verstehen. Möglicherweise ist das Versuchs-*Setting* somit nicht geeignet, um Veränderungen von Elastinfasern zu detektieren. In der Aorta von Ratten mit Typ-1-*Diabetes* im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren gleichen Alters konnten allerdings ultrastrukturelle morphologische Veränderungen von Fibrillin-Mikrofibrillen nachgewiesen werden (Akhtar *et al.*, 2010). Während sich für die durchschnittliche Mikrofibrillenlänge kein Unterschied zeigte, war die durchschnittliche Periodizität der Moleküle vermindert. Eine Aussage über die Orientierung wurde aber nicht gemacht. Yoshinaga *et al.* (2012) beschrieben für experimentell glykiertes Elastin eine Akkumulation von abnorm aggregierten Elastinfasern, die sich durch eine im Durchmesser erweiterte Struktur sowie eine hohe Unordnung von Faserverläufen äußerte. Generell konnten aber Ghazaryan *et al.* (2012) nachweisen, dass Elastinfasern weniger anfällig für die Ausbildung von AGEs sind als Kollagenfasern, die entscheidend für strukturelle Veränderungen sind (Yoshinaga *et al.*, 2012).

5.2.3 Die Orientierungen von Kollagen- und Elastinfasern in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut können mit porcinem Hautgewebe nicht nachgestellt werden.

Da die Verfügbarkeit von diabetischem humanem Gewebe, zum Beispiel für die Testung von neuen Arzneimitteln, eingeschränkt ist, besteht ein großer Bedarf an verlässlichen Surrogaten. Es wurde deshalb getestet, ob ein Modellsystem etabliert werden kann, das nach Kultivierung unter Normalbedingungen die gleichen Kollagen- und Elastinfaser-Ausrichtungen aufweist wie humane Haut gesunder Spender und unter „diabetischen“ Bedingungen denen von Hautgewebe diabetischer Patienten entspricht. Da für die Wundheilung eine Inkubation von Hautstanzen aus den *Plicae* von Schweinohren unter hyperglykämischen Bedingungen sehr vielversprechend zur Entwicklung eines diabetischen Modells war (**siehe Kapitel 4: Ergebnisse 4.3.3.5.1**), erfolgte die Kultivierung hier analog, aber ohne Verletzung der Haut. Für die räumliche Ausrichtung von Kollagenfasern zeigte sich zwar eine ähnliche Anordnung in porciner im Vergleich zu humaner gesunder Haut und eine 96-stündige Inkubation unter euglykämischen Bedingungen veränderte diese nicht wesentlich, aber ich konnte auch keine Veränderungen unter hyperglykämischen Bedingungen verglichen mit euglykämischen Bedingungen beobachten. Möglicherweise wäre eine längere Inkubationsdauer unter hyperglykämischen Bedingungen notwendig gewesen, um Veränderungen in den Polaritäten der Kollagenfasern - bedingt durch die Ausbildung von *advanced glycation endproducts* (AGEs) - herbeizuführen. So zeigten Ghazaryan *et al.*, dass die Autofluoreszenz von Kollagen infolge der Ausbildung von AGEs erst dann ansteigt, wenn humanes Gewebe länger als vier Tage

einer erhöhten Zuckerlösung ausgesetzt war (Ghazaryan *et al.*, 2012). Allerdings konnte ich bereits nach kurzer Inkubationszeit unter hyperglykämischen Bedingungen eine für AGEs typische Gelbfärbung des Gewebes (**siehe Kapitel 4: Ergebnisse 4.3.3.5.1**) beobachten.

Für die Orientierung von Elastinfasern wurden deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Schweinen beobachtet, generell war die Verteilung heterogener als in humanen Proben. Darüber hinaus hatten bereits die Kulturbedingungen unter euglykämischen Bedingungen einen Einfluss auf die Faserorientierung. Somit konnten die Polaritäten von Kollagen- und Elastinfasern in humaner Haut diabetischen Ursprungs im Vergleich zu der von gesunden Probanden unter Verwendung dieses kutanen Modellsystems nicht nachgestellt werden. Eine mögliche Alternative zur Etablierung eines solchen Modells könnte die Verwendung von humaner Haut gesunder Erwachsener sein. Dies würde aber erfordern, dass man humane Gewebe regelmäßig und in größerem Umfang erhält.

5.3 Auswirkungen des *Diabetes mellitus* auf die Wundheilung

5.3.1 TJ-Proteine sind vor und während der diabetischen im Vergleich zur normalen *In-vitro*-Wundheilung auf mRNA-Ebene verändert exprimiert.

Da bekannt ist, dass Diabetiker ein beeinträchtigt Wundheilungsvermögen aufweisen, wurde getestet, ob TJ-Proteine in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Hierzu wurde die Genexpression der TJ-Proteine Cldn-1, Cldn-4, Ocln und ZO-1 in proliferations- und migrationsfähigen Keratinozyten aus dem Gewebe von Diabetikern und aus gesunden Kontrollen unmittelbar vor und während der *Scratch*-Wundheilung untersucht. Dabei konnte ich zum einen zeigen, dass während der Wundheilung nicht-diabetischer Keratinozyten eine signifikante Hochregulation von Cldn-1, Cldn-4 und Ocln beobachtet wird. Die Induktion ihrer Genexpression nach Verwundung in nicht-diabetischen Zellen deutet demnach auf eine Funktion der TJ-Proteine im Rahmen der Wundheilung hin. In diesem Zusammenhang konnte unter Verwendung humaner Wundheilungsheilungsmodelle gezeigt werden, dass die epidermale Regeneration mit einer frühen Expression von Cldn-1 und Ocln assoziiert ist (Brandner *et al.*, 2002; Malminen *et al.*, 2003). Darüber hinaus zeigten sich für Cldn-1, Cldn-4 und Occludin signifikante Unterschiede zwischen den Zellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs mit niedrigeren mRNA-Level in diabetischen Zellen. *Scratch-Assay*-Versuche wurden unter Niedrig-Calcium-Bedingungen durchgeführt (Lan *et al.*, 2008 und 2009; Pollok *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2009 und 2012). Dies bedeutet, dass die

TJ-Proteine keine funktionellen *Tight Junctions* ausbilden (Yuki *et al.*, 2007) und somit ihre Funktion in der *Scratch*-Wundheilung TJ-unabhängig ist.

Wie anhand von *Cldn-1-Knockdown*-Experimenten gezeigt werden konnte, äußern sich die Folgen einer verminderten *Cldn-1*-Genexpression in primären humanen Keratinozyten in Form einer beeinträchtigten *In-vitro*-Wundheilung (Volksdorf *et al.*, eingereicht). Weiterhin zeigten Volksdorf *et al.*, dass die regenerierende Epidermis und/oder der Wundrand von chronischen Wunden durch den Verlust von *Cldn-1* auf Proteinebene gekennzeichnet war, während es in normalen Wunden vorhanden war. Bezüglich *Cldn-4* wurde beobachtet, dass der *Knockdown* von *Cldn-4* zu einer beeinträchtigten *In-vitro*-Wundheilung von Brustepithelzellen führt (Webb *et al.*, 2013). In Typ-2-diabetischen Ratten war die korneale Wundheilung vermindert und mit einer geringeren *Ocln*-Expression assoziiert (Huang *et al.*, 2015a). Volksdorf *et al.* zeigten ebenfalls die Abwesenheit von *Ocln* in chronischen Wunden. Weiterhin wurde für den *Knockdown* der *Ocln*-Genexpression nachgewiesen, dass die *Scratch*-Wunden verlangsamt geschlossen wurden, wenn die Zellen mechanischem Stress ausgesetzt wurden (Volksdorf *et al.*, eingereicht). Damit könnten sowohl die verminderten *Cldn-1*-, *Cldn-4* und *Ocln*-mRNA-Level in Keratinozyten diabetischen Ursprungs mit schlecht heilenden diabetischen Ulzera in Verbindung stehen.

5.3.2 Charakterisierung der *Gap-Junction*-Proteine Cx26 und Cx43 in unverwundeter diabetischer Haut und in der diabetischen Wundheilung

Gap-Junction-Proteine spielen im Rahmen der Wundheilung eine wichtige Rolle, die auf dynamischen Veränderungen ihrer Expression in humaner Haut beruht (Brandner *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 2003). Das streng regulierte Wechselspiel aus Induktion und Abbau von Connexinen konnte bei schlecht heilenden diabetischen Wunden mit Abweichungen im Vergleich zur normalen Wundheilung assoziiert werden (Becker *et al.*, 2012 als Übersichtsartikel; Brandner *et al.*, 2004 und 2008; Wang *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang stellen Cx26 und Cx43 zwei Schlüsselkomponenten dar. Brandner *et al.* (2004) zeigten, dass Cx26 in unverwundeter humaner Haut – mit Ausnahme der Fußsohle – nicht oder nur gering vorhanden war. Diese Beobachtung traf auch auf die von mir untersuchten Hautgewebe gesunder Probanden zu. Die Analyse der Lokalisation und Immunintensität von humanem unverwundetem Hautgewebe diabetischen Ursprungs wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Meine immunhistochemischen Färbungen zeigten, dass Cx26 zum Teil, aber nicht immer, hochreguliert war. Die Lokalisation Fußsohle stellte hierbei eine Besonderheit dar. Übereinstimmend mit Ergebnissen aus der Literatur wurde hierfür eine Immunfärbung für Cx26 in der Basalschicht bereits von Gewebe nicht-diabetischen Ursprungs nachgewiesen (Lucke *et*

al., 1999). In Fußsohlengewebe diabetischen Ursprungs zeigte sich eine deutlich erhöhte Cx26-Immunintensität in allen Schichten der Epidermis.

Für die Cx26-Expression auf mRNA-Ebene wurde in unverwundeter diabetischer im Vergleich zu nicht-diabetischer Haut ebenfalls kein einheitlicher Trend beobachtet. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Brandner *et al.* (2008), die im Mittel auch keine Veränderung beobachteten. In kultivierten Keratinozyten aus dem Gewebe von Diabetikern im Vergleich zu gesunden Probanden wurde ebenfalls in Übereinstimmung mit der Literatur kein signifikanter Unterschied gefunden (Brandner *et al.*, 2008), allerdings war das *Level* tendenziell erhöht.

Im Wundheilungsverlauf konnte ich für nicht-diabetische Keratinozyten sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden gegenüber unverwundeten Bedingungen eine tendenziell erhöhte Cx26-Genexpression detektieren. Dies deckt sich mit Beobachtungen bei *Ex-vivo*-Modellen, in denen während der normalen Wundheilung Cx26 zeitabhängig induziert wurde (Brandner *et al.*, 2004). In diabetischen Zellen wurde diese Hochregulation nicht beobachtet, allerdings befand sich, wie oben bereits angemerkt, das Cx26-*Level* bereits vor Verwundung auf einem tendenziell höheren Niveau, das beibehalten wurde. Wang *et al.* (2007) beobachteten in diabetischer Rattenhaut, dass Cx26 nach Verwundung normal induziert wurde, jedoch war seine Verteilung am Wundrand verbreitert. In schlecht heilenden diabetischen Ulzera war Cx26 am Wundrand und unmittelbar dahinter vorhanden (Brandner *et al.*, 2004). Djililian *et al.* (2006) zeigten, dass die ektopische Expression von Cx26 in Mausepidermis den Übergang in die Remodellierungsphase blockiert. Dies deutet auf eine erhöhte Cx26-Expression hin, die sich vor allem zu späteren Zeitpunkten der Wundheilung negativ auswirken könnte. Generell könnte somit die hier in dieser Arbeit bei einem Teil der Diabetiker bereits in unverwundeter Haut beobachtete Hochregulation von Cx26 dazu beitragen, dass diese Subpopulation besonders anfällig für die Ausbildung von chronischen Wunden ist.

Die Beobachtung, dass Connexin 43 in unverwundeter Haut in allen Schichten der Epidermis vorhanden ist (Brandner *et al.*, 2004), traf auf alle meine untersuchten Hautbiopsien sowohl nicht-diabetischen als auch diabetischen Ursprungs zu. In Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sich für Cx43 in der Epidermis von diabetischem verglichen mit nicht-diabetischem Gewebe abhängig von der Körperlokalisierung entweder eine Herunterregulation oder eine Hochregulation. Die mRNA-*Level* von Cx43 waren in unverwundeter diabetischer Haut sehr leicht und nicht signifikant erhöht. Brandner *et al.* (2008) beobachteten auch keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Cx43-Genexpression in diabetischen im Vergleich zu nicht-diabetischen Hautbiopsien. Dahingegen zeigten Wang *et al.* (2007) in der Epidermis von diabetischen Ratten signifikant verminderte Cx43-Immunintensität. Generell unterscheidet sich aber die Expression und Lokalisation von Cx43 zwischen Mensch und Nager (Wilgenbus *et al.*, 1992), so dass auch diese unterschiedliche Ausprägung diabetischer Bedingungen dadurch

bedingt sein könnte. Darüber hinaus handelte es sich bei Wang *et al.* (2007) um ein Typ-1-*Diabetes*-Modell.

Die Herunterregulation von Cx43 am Wundrand ist für die spontane Wundheilung von entscheidender Bedeutung (Brandner *et al.*, 2004; Coutinho *et al.*, 2003; Goliger und Paul, 1995). Für humane Haut wurde gezeigt, dass Cx43 bei spontaner Wundheilung weder am Wundrand, in der Nähe des Wundrandes noch in der regenerierenden Epidermis vorhanden war (Brandner *et al.*, 2004). In chronischen/diabetischen Wunden dagegen wurde Cx43 in Zellen am Wundrand, in der Nähe des Wundrandes und im Gewebe dahinter detektiert (Brandner *et al.*, 2004). Auch in diabetischen Ratten lag der verminderten Wundheilung eine gestörte Cx43-Expression in Keratinozyten am Wundrand zugrunde (Wang *et al.*, 2007). Deshalb wurde überprüft, ob die Cx43-Genexpression in kultivierten Keratinozyten diabetischen im Vergleich zu nicht-diabetischen Ursprungs unter *Scratch*-Wundheilungsbedingungen ebenfalls verändert war. Ich beobachtete für Keratinozyten diabetischen Ursprungs nach 6 Stunden tatsächlich eine tendenzielle Hochregulation der Cx43-mRNA-Level, während Keratinozyten aus der Haut gesunder Spender zu diesem Zeitpunkt eine minimal verminderte Cx43-Genexpression aufwiesen. Nach 24 Stunden war die Cx43-Genexpression in Keratinozyten beiden Ursprungs wieder auf dem Niveau vor Verwundung.

5.3.3 Einfluss eines Triterpenextraktes aus dem Korkmaterial der äußeren Rinde von weißen Birken (*Betulae cortex*) auf die diabetische Wundheilung

Der Triterpenextrakt aus dem Korkmaterial der äußeren Rinde von Birken zeigte als Bestandteil eines Oleogels (Oleogel-S10) in klinischen Studien vielversprechende Resultate bei der Behandlung von Spalthautwunden (Metelmann *et al.*, 2012 und 2015). Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurde getestet, ob dieser Triterpenextrakt auch das Potenzial besitzt, den beeinträchtigten Heilungsprozess diabetischer Wunden zu fördern. Hierfür wurden zunächst zwei- und dreidimensionale Untersuchungsmodelle etabliert, die das verminderte Wundheilungsvermögen von diabetischer Haut in Form einer gestörten Reepithelialisierung nachstellen. Zum einen wurden unter Verwendung primärer humaner Keratinozyten *In-vitro-Scratch-Assay*-Untersuchungen durchgeführt, für die zwei Methoden, der klassische *Scratch-Assay* und eine semiautomatische Variante dessen, zur Verfügung standen. Zum anderen erfolgten *Ex-vivo*-Wundheilungsanalysen mit porciner Haut.

5.3.3.1 Beurteilung der Eignung von verschiedenen *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Modellen zur Untersuchung der diabetischen Wundheilung bzw. zur Testung von neuen Wirkstoffen

Diabetische Keratinozyten

Die Verwendung von Keratinozyten aus dem Wundrand diabetischer Ulzera erscheint für die Analyse der *In-vitro*-Wundheilung unter diabetischen Bedingungen am geeignetsten, da ihre Fähigkeit zur Migration und Proliferation verändert ist (Usui *et al.*, 2008). Aufgrund ihrer extrem limitierten Verfügbarkeit und ihrer oft schlechten Kultivierbarkeit mussten jedoch alternative Zellen gefunden werden, die hinsichtlich des diabetischen Phänotyps größtmögliche Übereinstimmung mit Keratinozyten aus dem Wundrand von Ulzera aufweisen. Deshalb wurde im Rahmen meiner Doktorarbeit unter Anwendung des klassischen *Scratch-Assays* untersucht, ob Keratinozyten aus unverwundeter Haut von Diabetikern eine beeinträchtigte *In-vitro*-Wundheilung aufweisen, um als Modell für die Analyse des Triterpenextraktes fungieren zu können. In der Literatur wurden solche Zellen bereits für *In-vitro*-Wundheilungsanalysen im diabetischen Kontext verwendet (Faries *et al.*, 2001; Pollok *et al.*, 2011). Da Pollok *et al.* (2011) zeigen konnten, dass der charakteristische Phänotyp von Keratinozyten diabetischen Ursprungs mit zunehmender Passagenzahl in Kultur verloren geht, wurden meine Experimente mit Zellen der Passage 2 bis 4 durchgeführt. Allerdings wurde für Keratinozyten diabetischen Ursprungs nur im klassischen *Scratch-Assay* ein verlangsamter Wundverschluss beobachtet, und dies auch nur tendenziell. Im *IncuCyte-Zoom*[®]-System wurde keine Tendenz der Veränderung im Vergleich zu Keratinozyten aus gesunden Hautbiopsien beobachtet. Eine Ursache der nur tendenziellen Veränderungen im klassischen *Scratch-Assay* ist die hohe Variabilität der Wundheilungskapazität von Keratinozyten aus diabetischem Gewebe. Zwei der getesteten Primärkulturen zeigten eine Verlangsamung der Wundheilung, während die dritte Primärkultur keinen Unterschied gegenüber Keratinozyten nicht-diabetischen Ursprungs aufwies. Hierbei konnte die Wundheilungsgeschwindigkeit der Zellen mit den Hb1Ac-Werten der Spender korreliert werden. Demnach führten höhere Hb1Ac-Werte (7,8 % und 8,0 %) zu beeinträchtigter *Scratch*-Wundheilung, was für nur leicht erhöhte Hb1Ac-Werte (6,4 %) nicht beobachtet wurde. Ob Hyperglykämie tatsächlich entscheidend zum diabetischen Phänotyp hinsichtlich der Wundheilungseigenschaften von humanen Keratinozyten beiträgt, müsste mit einer größeren Zahl von Primärkulturen mit verschiedenen Hb1Ac-Werten näher überprüft werden.

In meinen *In-vitro*-Untersuchungen mit Keratinozyten-*Monolayern* wurde unter Anwendung des klassischen *Scratch-Assays* für diabetische im Vergleich zu nicht-diabetischen Zellen eine tendenziell verlangsamte *In-vitro*-Wundheilung detektiert, während sich im *IncuCyte-Zoom*[®]-System kein Unterschied zeigte. Wie später noch diskutiert werden wird (**Abschnitt 5.3.3.3**),

wurde nur im *IncuCyte-Zoom*[®]-System nach kurzfristiger Applikation von Triterpenextrakt ein positiver Einfluss auf die Wundheilung detektiert. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die Wahl des Untersuchungssystems die Ergebnisse beeinflussen kann. Hierfür können verschiedene Ursachen angeführt werden. Beim klassischen *Scratch-Assay* nimmt die Fläche der *Scratch-Wunde* einen geringeren Anteil am Gesamt-*Well* ein als beim *IncuCyte-Zoom*[®]-System. Damit ist auch der Anteil von Zellen, die an der Wundheilung beteiligt sind, im Vergleich zu nicht-betroffenen Zellen deutlich geringer. So ist vorstellbar, dass verschiedene Relationen von Wund- zu *Well*-Größe erhebliche Auswirkungen auf die Wundheilungscharakteristik und Wundheilungsdynamik in einem solch minimalistischen System haben. Generell entspricht dabei der klassische *Scratch-Assay* hinsichtlich der Relation von Wundgröße zu Anzahl von umgebenden Zellen mehr den *In-vivo*-Bedingungen. Da kein Unterschied hinsichtlich der Wund-Breiten zwischen den beiden *Scratch-Assay*-Varianten besteht, ist dies vor allem dann von Bedeutung, wenn die zu untersuchende Substanz gegebenenfalls nicht unmittelbar auf die Zellen am Wundrand wirkt, sondern vor allem solche dahinter anspricht. Weiterhin könnten die unterschiedlichen Ergebnisse auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass beim *IncuCyte-Zoom*[®]-System technisch-bedingt nur der mittlere Bereich des *Wells* fotografiert wurde, wohingegen beim klassischen *Scratch-Assay* der Wundheilungsfortschritt an vier Positionen, die über den gesamten *Scratch*-Bereich verteilt waren, detektiert wurde. Demnach wurde beim klassischen *Scratch-Assay* ein umfangreicherer Überblick in das Wundheilungsverhalten der Zellen erhalten als bei Verwendung des *IncuCyte-Zoom*[®]-Systems, wenngleich der prozentuale Anteil der ausgewerteten Gesamtwundfläche für beide *Scratch-Assay*-Varianten vergleichbar war. Vorteilhaft bezüglich des *IncuCyte-Zoom*[®]-Systems ist aber die dauerhafte Inkubation der Zellen unter Kultivierungsbedingungen sowie die verbesserte Homogenität der Anfangswundgrößen. Darüber hinaus kann der Wundheilungsfortschritt in kurzen Zeitabständen dokumentiert werden, ohne dabei die Zellen zu stören. Die Möglichkeit zum hohen Durchsatz macht diese Methode für Analysen wertvoll, bei denen vielversprechende Substanzen aus einem großen Pool selektiert werden sollen, um anschließend einer genaueren Prüfung unterzogen zu werden.

Nicht-diabetische Keratinozyten unter hyperglykämischen Bedingungen

Infante Keratinozyten

Zur Induktion diabetischer Wundheilungsbedingungen *in vitro* wird in der Literatur häufig eine erhöhte Glukosekonzentration im Kulturmedium verwendet, um den gesteigerten Blutglukosespiegel bei schlecht eingestellten Diabetikern nachzustellen (Lan *et al.*, 2008;

Villarroel *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2011). Prinzipiell können hierzu Keratinozyten aus infanten Vorhäuten verwendet werden, die den Vorteil haben, dass alle Spender das gleiche Geschlecht und ein ähnliches Alter (< 5 Jahre) aufweisen. Darüber hinaus stammen alle Biopsien aus derselben Lokalisation. Die Homogenität der Hautproben ist damit vergleichsweise hoch. Allerdings tritt Typ-2-Diabetes normalerweise erst im Erwachsenenalter auf. Die zweite Möglichkeit ist also, adulte Zellen zu verwenden, die allerdings bezüglich ihrer Herkunft dann eine größere Variabilität aufweisen.

Humane, infantile Keratinozyten wiesen bei erhöhter Glukosekonzentration im Vergleich zur Normalglukosebedingung eine signifikant verlangsamte Wundheilung 12 und 24 Stunden nach Verwundung auf. Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt aber nur bei Kultivierung der Zellen in K-SFM-Medium. Zwei weitere getestete Keratinozytenmedien (*DermaLife*[®] und *EpiLife*[®]) führten unter hyperglykämischen Bedingungen nicht zu einer beeinträchtigten *In-vitro*-Wundheilung (Zorn-Kruppa *et al.*, 2015). Für die Analysen aller drei Medien wurden jeweils Keratinozyten derselben Donoren verwendet. Daher ist davon auszugehen, dass die unterschiedlichen Ergebnisse in der Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien begründet liegen. So unterscheidet sich das K-SFM-Medium von den anderen zwei Keratinozytenmedien durch eine 1,5- bzw. 1,8-fach höhere Calcium-Konzentration. Da Calcium die Differenzierung von Keratinozyten beeinflusst, könnten Zellen in K-SFM mit einem veränderten Phänotyp assoziiert sein. Darüber hinaus weist K-SFM im Vergleich zu *EpiLife*[®] eine 50-fach höhere Konzentration des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) auf, der entscheidend zur Aktivierung der Keratinozytenmigration während der Wundheilung beiträgt (Werner und Grose, 2003). Für *DermaLife*[®] ist die EGF-Konzentration nicht bekannt. Hinsichtlich weiterer Bestandteile können die drei Medien nicht verglichen werden, da keine weiteren Informationen zu Inhaltsstoffen von K-SFM vorliegen. Generell konnte auch für andere *Readout*-Parameter beobachtet werden, dass die Wahl des Keratinozytenmediums einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis hat (Zorn-Kruppa *et al.*, 2015). Außerdem sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass das Vorhandensein von Zusatzstoffen (*supplements*) im Kulturmedium erforderlich war, um einen signifikanten Unterschied zwischen eu- und hyperglykämischen Bedingungen hinsichtlich der Wundheilungsgeschwindigkeit detektieren zu können. Die Kultivierung der Zellen in Nährmedium ohne Zusatzstoffe zeigte bereits unter Normalglukosebedingungen einen signifikant verminderten Wundverschluss, der bei erhöhter Glukosekonzentration nicht signifikant beeinträchtigt wurde. Die verlangsamte *Scratch*-Wundheilung von humanen infanten Keratinozyten bei Verwendung von K-SFM-Medium inklusive Zusatzstoffen war in Übereinstimmung mit Resultaten aus der Literatur (Lan *et al.*, 2008 und 2009). Auch die Beobachtung, dass *EpiLife*[®]-Medium mit erhöhter Glukosekonzentration nicht zu einer verminderten *In-vitro*-Wundheilung von primären humanen

Keratinocyten führte, wiesen bereits Wright *et al.* (2013) nach. Dies zeigt, dass mit infanten Keratinocyten unter hyperglykämischen Bedingungen das verminderte Wundheilungsvermögen von diabetischer Haut nachgestellt werden kann, allerdings nur, wenn das richtige Medium ausgewählt wird. Neben der Hyperglykämie haben also weitere Faktoren einen wesentlichen Einfluss auf die diabetische Wundheilung. Darin könnte sich das Mikromilieu einer *In-vivo*-Wunde widerspiegeln, zu dem auch andere Zelltypen, beispielsweise durch die Sekretion von Zytokinen, beitragen. Die Ergebnisse der *In-vitro*-Wundheilungsanalysen müssen deshalb vorsichtig betrachtet werden, da nicht klar ist, welche Parameter, die noch für die Wechselwirkung mit der zu testenden Substanz wichtig sind und von anderen Zelltypen in der Wunde vermittelt werden, durch die Keratinocyten-Monokultur nachgestellt wurden oder nicht.

Adulte Keratinocyten

Auch in Zellen von adulten Spendern zeigte sich ein signifikant verlangsamter Verschluss von *In-vitro-Scratch*-Wunden, wenn die Zellen in K-SFM-Medium inklusive Zusatzstoffen bei erhöhter Glukosekonzentration kultiviert wurden. Der Unterschied beschränkte sich im Gegensatz zu infanten Keratinocyten auf die ersten 12 Stunden, galt aber ebenfalls für die zusätzlich berücksichtigten Detektionszeitpunkte 4 und 8 Stunden nach Verwundung. Da während dieses frühen Zeitraums nach Verwundung noch überwiegend Keratinocytenmigration erfolgt, bevor die Proliferation der Zellen einsetzt, kann von einem durch Hyperglykämie induzierten Migrationsdefekt ausgegangen werden. Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass Keratinocyten aus adultem Hautgewebe bei Kultivierung unter Hochglukosebedingungen eine unveränderte Proliferationskapazität aufweisen (Daten nicht gezeigt). Nach 24 Stunden waren die *In-vitro-Scratch*-Wunden von adulten Keratinocyten bereits nahezu vollständig geschlossen, so dass zwischen den zwei Kulturbedingungen keine Unterschiede mehr ausgemacht werden konnten. Somit konnte auch für adulte Zellen durch Hochglukose-Bedingungen eine verminderte Geschwindigkeit des Wundverschlusses nachgestellt werden, die oben diskutierten Einschränkungen für infanten Keratinocyten aufgrund der Monokultur gelten aber auch hier.

Porcine *Ex-vivo*-Haut unter hyperglykämischen Bedingungen

Ein großer Nachteil der *In-vitro*-Keratinocyten-Systeme ist, wie oben beschrieben, dass andere Zellen, die in der Wundheilung eine Rolle spielen, nicht berücksichtigt werden und die von ihnen produzierten Substanzen nur über das Kulturmedium simuliert werden können. Dahingegen handelt es sich bei dem *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell um ein organotypisches Modell bestehend aus Dermis und Epidermis mit allen darin enthaltenden zellulären und strukturellen

Komponenten von normaler Haut. Durch die Kultivierungsvariante, bei der die Dermis in Kontakt mit dem Nährmedium steht, die Epidermis jedoch der Luft zugewandt ist (*Air-Liquid Interface*), werden die natürlichen Umgebungsbedingungen humaner Haut maximal widergespiegelt: Die Dermis des *Ex-vivo*-Modells, in normaler Haut mit Blutgefäßen ausgestattet, steht in Kontakt mit dem Nährmedium, während der Nährstofftransport in die Epidermis analog zur Situation *in vivo* nur per Diffusion erfolgt.

Die Eignung dieses diabetischen *Ex-vivo*-Wundheilungsmodells zur Testung von Substanzen, die die diabetische Wundheilung positiv beeinflussen, wurde mit Hilfe von PDGF getestet. Ein positiver Effekt von PDFG auf diabetische Wunden wurde *in vivo* (Nagai und Embil, 2002) und *in vitro* (Blom *et al.*, 2001) beschrieben. Auch in meinen Versuchen wirkte es sich signifikant positiv auf die Wundheilung des diabetischen Wundheilungsmodells aus.

Als weiteres Merkmal zeigte sich bei Kultivierung des porcinen Gewebes unter hyperglykämischen Bedingungen eine Gelbfärbung der Haut. Dieses Phänomen beobachteten Lehman und Franz (2014) ebenfalls an diabetischen Ratten und Yokota und Tokudome (2015) in murinen *Ex-vivo*-Hautmodellen. Darüber hinaus wird auch eine Gelbfärbung der Haut von Diabetikern beobachtet, wenn auch selten (**Abbildung 5.1**)

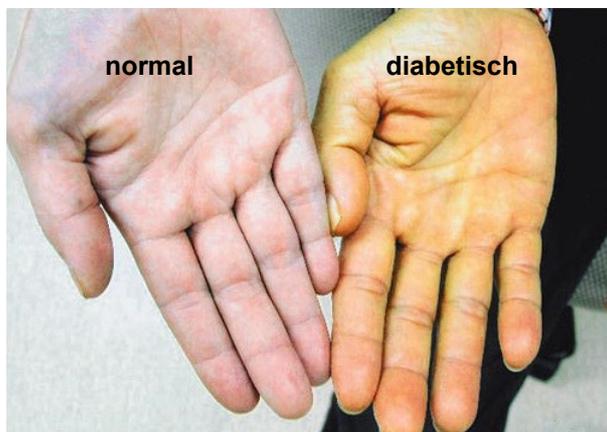


Abbildung 5.1: Gelbfärbung der Haut von Diabetikern. (Abbildung modifiziert nach Lin, 2006).

Die Ursache hierfür könnten *advanced glycation endproducts* sein, deren Entstehung in einer gelblich-braunen Pigmentierung der Haut mit einem charakteristischen Fluoreszenzspektrum resultieren kann (Wautier und Guillausseau, 1998). So hat sich die Messung der Hautfluoreszenz, die ein Maß für das Vorhandensein von AGEs ist, als elegante, weil nicht-invasive, Methode etabliert, um das Risiko zur Entwicklung einer *Diabetes*-Erkrankung einschätzen zu können (Gerrits *et al.*, 2008).

Im Vergleich zur *In-vivo*-Wundheilung weist das porcine *Ex-vivo*-Wundheilungsmodell jedoch auch Limitierungen auf. Bei der Wundheilung *in vivo* werden ebenfalls Zellen, wie neutrophile

Granulozyten, aus dem Blutkreislauf an den Ort der Verletzung rekrutiert, wo sie entscheidend zur Homöostase des Wundmilieus beitragen (Singer und Clark, 1999). Die *Ex-vivo*-Wundheilung ist dagegen auf die Zellen beschränkt, die sich in der Gewebebiopsie befinden. Damit können organtypische Modelle die tatsächlichen Wundheilungsdynamiken zwar besser als *In-vitro*-Zellkulturen, aber trotzdem nur in begrenztem Umfang widerspiegeln.

5.3.3.2 Hochosmotische, aber euglykämische Kulturbedingungen als Kontrolle für Hyperglykämie zeigten ebenfalls negative Auswirkungen auf die *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Wundheilung.

Die Etablierung von diabetischen Wundheilungsmodellen *in vitro* mit humanen infanten Keratinozyten und *ex vivo* mit porciner Haut zeigte unter Hochglukose- im Vergleich zu Normalglukosebedingungen einen signifikant verlangsamten Wundverschluss. Um festzustellen, ob dieser Effekt der erhöhten Stoffkonzentration geschuldet war, wurde eine osmotische Kontrolle mitgeführt, bei der die für hyperglykämische Bedingungen zusätzlich hinzugegebene Menge Glukose äquimolar durch Mannitol ersetzt wurde. Gemäß der Literatur ist dies gängige Praxis (Cunha *et al.*, 2014; Lan *et al.*, 2008; Villarroel *et al.*, 2009). Bei Mannitol handelt es sich um einen Zuckeralkohol, der von menschlichen Zellen nicht aufgenommen und daher metabolisch inert ist (Suzuki *et al.*, 1993). Infolgedessen sammelt sich Mannitol extrazellulär an. Im Rahmen meiner *In-vitro-Scratch-Assay-Analyse* zeigte sich 12 Stunden nach Verwundung für die osmotische Kontrolle eine ebenso starke Beeinträchtigung des Wundverschlusses wie für die erhöhte Glukosekonzentration. Nach 24 Stunden wurde sogar eine tendenzielle Verlangsamung gegenüber hyperglykämischen Bedingungen beobachtet. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass die verlangsamte Migration unter hyperglykämischen Bedingungen *in vitro* tatsächlich der veränderten Osmolarität geschuldet ist. Wie bereits unter **5.3.3.2** erwähnt, zeigten Lan *et al.* unter Verwendung des Kulturmediums K-SFM der Firma *Thermo Fisher Scientific* ebenfalls eine verlangsamte *In-vitro*-Wundheilung von humanen primären Keratinozyten aus Vorhäuten unter hyperglykämischen Bedingungen (25 mM Glukose) (Lan *et al.*, 2008). Allerdings wurde keine osmotische Kontrolle berücksichtigt. In einer folgenden Publikation wiesen sie erneut eine verlangsamte Migration von primären infanten Keratinozyten bei erhöhter Glukosekonzentration nach (Lan *et al.*, 2009). Im Methodenteil gaben sie an, als Kontrollagens L-Glukose, die eine Alternative zu Mannitol darstellt, verwendet zu haben, um Osmose- oder Glykierungseffekte ausschließen zu können. Allerdings wurden im Ergebnisteil die Auswirkungen der hyperosmolaren Bedingungen mit L-Glukose auf das Wundheilungsverhalten der Zellen nicht dargestellt. In der Diskussion wurde

hierzu auch nicht Stellung bezogen. Daher ist die Bewertung dieser Daten und ihr Vergleich mit meinen Ergebnissen nicht möglich. Auf der Grundlage meines Resultates muss ich einen osmotischen Effekt durch die erhöhte Stoffkonzentration annehmen, der zur verlangsamten Wundheilung unter hyperglykämischen Bedingungen führt. Dies steht in Übereinstimmung mit Publikationen, die hyperosmotischen Stress als Mitursache für pathologische Symptome des *Diabetes mellitus* postulieren (Brocker *et al.*, 2012). So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass erhöhte Glukose-Level durch die Freisetzung von Zytokinen – induziert durch hyperosmotischen Stress – die Entzündung bei Infektion verstärken. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass hyperosmotischer Stress die Expression von Interferon- γ in Blutlymphozyten inhibiert und daher für das erhöhte Infektionsrisiko von Diabetikern mitverantwortlich sein könnte (Otto *et al.*, 2008). Außerdem könnte hyperosmotischer Stress mit der Insulinresistenz bei Typ-2-*Diabetes* in Verbindung stehen (Gual *et al.*, 2003a; Gual *et al.*, 2003b).

Zur Etablierung des diabetischen *Ex-vivo*-Wundheilungsmodells wurde ebenfalls eine osmotische Kontrolle berücksichtigt. Hierbei zeigte sich zwar auch eine tendenziell verminderte Reepithelialisierung im Vergleich zu Normalglukosebedingungen, sie war aber weniger ausgeprägt als unter hyperglykämischen Bedingungen und nicht signifikant. Dieser Unterschied zu den Ergebnissen der *In-vitro-Scratch-Assay*-Untersuchung, bei der hyperosmolare Bedingungen die Wundheilung im selben Ausmaß und signifikant verlangsamten wie hyperglykämische Bedingungen, könnte auf das komplexere *Ex-vivo*-Modell zurückgeführt werden. Die tendenziell beeinträchtigte Reepithelialisierung mit hyperosmolaren Bedingungen deutet daraufhin, dass osmotisch-bedingter Stress auch in diesem System ein beitragender Faktor sein könnte. Die zusätzliche Verschlechterung der Wundheilung unter hyperglykämischen Bedingungen deutet aber auf weitere Mechanismen hin, die spezifisch Glukose-vermittelt waren. Unter anderem wurde ausschließlich unter hyperglykämischen Bedingungen eine Gelbfärbung der porcinen Haut beobachtet (**siehe Kapitel 4: Ergebnisse 4.4.3.3.1**). Unter der Annahme, dass hierfür AGEs verantwortlich waren, reichen die möglichen zu erwartenden Auswirkungen auf die Haut von Modifikationen der Bindegewebsfasern, über direkte Schädigungen der Fibroblasten und Keratinozyten bis hin zur Induktion von oxidativem Stress (Gkogkolou und Böhm, 2012 als Übersichtsartikel).

5.3.3.3 Der Effekt von TE und Betulin auf die Wundheilung im diabetischen Kontext.

Neben vielversprechenden Effekten auf den Heilungsprozess von Spalthautwunden (Metelmann *et al.*, 2012 und 2015) wurde der TE erfolgreich zur Behandlung von akuten Läsionen bei Patienten mit aktinischer Keratose eingesetzt (Huyke *et al.*, 2006). Eine Emulsion

mit Betulin, der Hauptkomponente des TE, zeigte bei Spalthautwunden und bei nekrotisierendem *Herpes zoster* ebenfalls wundheilungsfördernde Eigenschaften (Metelmann *et al.*, 2013; Weckesser *et al.*, 2010).

Ex-vivo-Wundheilung

Wie in normaler Wundheilung *in vivo* (Metelmann *et al.*, 2012 und 2015) und *ex vivo* (Ebeling *et al.*, 2014) zeigte TE auch eine positive Wirkung auf die Wundheilung im diabetischen *Ex-vivo*-Modell 48 Stunden nach Applikation. In der Absicht, den TE für die Behandlung diabetischer Ulzera einzusetzen, erscheint hinsichtlich der vornehmlich älteren Patientenschaft von Typ-2-Diabetikern ein anwendungsfreundliches Therapeutikum als essenziell, um von den Patienten angenommen zu werden. In diesem Zusammenhang bietet sich eine Schaumformulierung an, die nahezu berührungs- und schmerzfrei aufzutragen ist. Da das wasserfreie Oleogel nicht zu einem Schaum aufbereitet werden kann, wurde der TE als aktiver Wirkstoff in eine alternative galenische Formulierung auf Wasser-in-Öl (W/O)-Basis eingearbeitet. Es zeigte sich, dass die Emulsion unter Hochglukosebedingungen einen statistisch signifikant positiven Effekt auf die Wundheilung ausübte. Das TE-Oleogel wies einen vergleichbar positiven, aber aufgrund der höheren Standardabweichung nicht signifikanten Effekt auf die Wundheilung auf. Da beide Systeme Suspensionen sind, bei denen ein Überschuss an gelöstem Wirkstoff in einer gesättigten Lösung/Emulsion vorliegt, besteht zwischen den beiden galenischen Formulierungen kein Unterschied bezüglich der Wirkstoffkonzentration. Das heißt, dass sowohl das Oleogel als auch die W/O-Emulsion und daraus hergestellte Schäume wesentlich mehr Wirkstoff enthalten, als während der Zeitdauer eines Experimentes freigesetzt werden kann. Hinsichtlich der Wirkstofffreisetzung gibt es zwischen den Zubereitungen keine relevanten Unterschiede, da in beiden Fällen der Wirkstoff in der Außenphase vorliegt. Somit wurden zum ersten Mal Hinweise darauf erhalten, dass der betulinreiche Triterpenextrakt aus dem Birkenkork zur Verbesserung der beim Diabetiker beeinträchtigten Wundheilung beitragen könnte.

In-vitro-Wundheilung

Bei Verwendung von diabetischen Zellen beziehungsweise von Zellen unter hyperglykämischen Bedingungen konnte ich hinsichtlich der Wirkung von Triterpenen zu frühen Zeitpunkten (4 und 8 Stunden nach Verwundung) einen positiven Effekt für TE und/oder Betulin feststellen, der aber nur mit dem *IncuCyte-Zoom*[®]-System nachweisbar war und somit kein robustes Ergebnis darstellt. Für nicht-diabetische adulte Zellen unter euglykämischen Bedingungen, die als Vergleich mituntersucht wurden, wurde kein Effekt beobachtet. Ab 12 Stunden wirkte sich die Behandlung mit TE negativ auf die Wundheilung von diabetischen Keratinozyten sowie von

adulten und infanten Keratinozyten unter euglykämischen und hyperglykämischen Bedingungen aus, ab 24 Stunden auch die Behandlung mit Betulin.

Im Unterschied zu meinen Ergebnissen zeigten Ebeling *et al.*, dass unter euglykämischen Bedingungen die Behandlung von humanen infanten Keratinozyten mit TE zu einer signifikant beschleunigten Wundheilung nach 8 Stunden führte (Ebeling *et al.*, 2014). Der unmittelbare Vergleich beider Ergebnisse ist jedoch aus mehreren Gründen schwierig. Zum einen war der früheste Zeitpunkt meiner Analyse für infanten Keratinozyten 12 Stunden nach Verwundung, demnach lagen keine Informationen zum Wundheilungsfortschritt nach 8 Stunden vor. Allerdings war der Zeitpunkt zu 8 Stunden nach Verwundung der einzige, der von Ebeling *et al.* gezeigt wurde. Es ist also nichts über den langfristigen Effekt von TE bekannt. Weiterhin bestanden methodische Unterschiede zwischen den Untersuchungen. Zum einen wurde der Zellrasen bei Ebeling *et al.* nicht, wie bei meinen Versuchen, mit einer Pipettenspitze verletzt, sondern durch die Entnahme eines Ibidi[®]-Einsatzes, der vor der Aussaat der Keratinozyten in das *Well* eingesetzt worden war, eine zellfreie Fläche generiert, ohne die bei einer Verwundung übliche Schädigung einzelner Zellen des *Monolayers* vorzunehmen. Die zahlreichen Unterschiede in der Versuchsdurchführung könnten demnach sowohl das Wundheilungsverhalten der Zellen als auch ihr Ansprechen auf die zugegebenen Substanzen maßgeblich beeinflusst haben. Wie bereits oben diskutiert, und wie auch durch den Vergleich der zwei *Scratch-Assay*-Varianten zu sehen ist, sind die Ergebnisse in diesen *In-vitro*-Versuchen stark von den Versuchsbedingungen abhängig, was ihre Gesamtaussagekraft einschränkt.

Die *In-vitro*-Wundheilung ist ein Prozess, der zu frühen Zeitpunkten nach Verwundung überwiegend von der Migration der Zellen getragen wird, während erst zu späteren Zeitpunkten die Proliferation als weiteres Element hinzukommt. Die beschleunigte Wundheilung zu frühen Zeitpunkten im *IncuCyte-Zoom*[®]-System war daher vermutlich mit einem positiven Effekt von TE und Betulin auf die Migration assoziiert. Der negative Einfluss von TE und Betulin zu späten Zeitpunkten nach Verwundung ist vermutlich überwiegend die Folge einer stark beeinträchtigten Proliferation, da zu späten Zeitpunkten ein negativer Einfluss von TE und Betulin auf die mitotische Aktivität beobachtet wurde. Interessanterweise zeigten zehnfach geringere Konzentrationen von TE und Betulin zu späten Zeitpunkten weder auf die *In-vitro*-Wundheilung noch auf die Proliferation allein einen negativen Effekt. Diese Beobachtungen deuten einen Konzentrationseffekt der getesteten Substanzen auf kultivierte Keratinozyten an, der auch hinsichtlich der Proliferationskapazität einer immortalisierten Keratinozytenzelllinie (HaCaT-Zellen) gezeigt werden konnte (Jäger *et al.*, 2008; Laszczyk *et al.*, 2006).

Die Untersuchungen zur Wirkung von TE in organotypischen Wundheilungsmodellen zeigten keine negativen Effekte auf die Reepithelialisierung, obwohl eine zehnfach höhere

Konzentration als bei den *Scratch-Assay*-Analysen verwendet wurde. Da die im *Ex-vivo*-Modell getestete Konzentration identisch war mit der bei erfolgreichen *In-vivo*-Wundheilungsstudien, müssen die zweidimensionalen *In-vitro*-Modelle als Untersuchungssystem in Frage gestellt werden. Ferner sind diese Ergebnisse ein weiterer Hinweis dafür, dass die Wirkungsweise von TE im Wundheilungskontext nicht auf eine Komponente beschränkt sein kann, sondern deutlich komplexer ist.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

Admiraal WM, van Valkengoed GM, de Munter JSL, Stronks K, Hoekstra JBL *et al.* *The association of physical inactivity with type 2 diabetes among different ethnic groups.* *Diabetic Medicine* (2011) 28: 668-672.

Aiken C und Chen CH. *Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals.* *Trends in Molecular Medicine* (2005) 11: 31-36.

Akhtar R, Cruickshank JK, Gardiner NJ, Derby B und Sherratt MJ. *The effect of type 1 diabetes on the structure and function of fibrillin microfibrils.* *MRS Online Proceedings Library Archive* (2010) 1274: DOI: 10.1557/PROC-1274-QQ05-17.

Alakurtti S, Mäkelä T, Koskimies S und Yli-Kauhaluoma J. *Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin* (2006). *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 29: 1-13.

Ancelin M, Chollet-Martin S, Herve MA, Legrand C, El Benna J *et al.* *Vascular endothelial growth factor VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism* (2004). *Laboratory Investigation* 84: 502-512.

Anderson JM und Van Itallie CM. *Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability.* *American Journal of Physiology* (1995) 269: G467-475.

Anderson JM. *Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport.* *Physiology* (2001) 16: 126-130.

Andrews KL, Houdek MT und Kiemele LJ. *Wound management of chronic diabetic foot ulcers: from the basics to regenerative medicine.* *Prosthetics and Orthotics International* (2015) 39: 29-39.

Apodaca G, Gallo LI und Bryant DM. *Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry.* *Nature Cell Biology* (2012) 14: 1235-1243.

Armstrong DG und Jude EB. *The role of matrix metalloproteinases in wound healing.* *Journal of the American Podiatric Medical Association* (2002) 92: 12-18.

Avery NC und Bailey AJ. *The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen.* *Pathologie Biologie* (2006) 54: 387-395.

Baggiolini M, Dewald B und Moser B. *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines.* *Advances in Immunology* (1994) 55: 97-179.

- Balda MS**, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M et al. *Functional dissociation of paracellular permeability from electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant membrane protein of tight junctions. The Journal of Cell Biology* (1996) 134: 1031-1049.
- Bainbridge P**. *Wound healing and the role of fibroblasts. Journal of Wound Care* (2013) 22: 407-408, 410-412.
- Ballotti R**, Le Marchand-Brustel Y, Gammeltoft S und Van Obberghen E. *Insulin receptor: tyrosine kinase activity and insulin action. Reproduction Nutrition Development* (1989) 29: 653-661.
- Basavaraj GV**, Uppin IV und Raghavendra BYP. *Chronic diabetic wound healing: recombinant PDGF v/s normal saline dressing. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences* (2012) 24: 118-120.
- Bastaki S**. *Diabetes mellitus and its treatment. International Journal of Diabetes & Metabolism* (2005) 13: 111-134.
- Batista DI**, Perez L, Orfali RL, Zaniboni MC, Samorano LP et al. *Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (2015) 29: 1091-1095.
- Bauer H**, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, Lametschwandtner A und Bauer HC. *The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2010): Artikel-Nummer: 402593.
- Baynes JW**. *Perspectives in diabetes: role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes* (1991) 40: 405-412.
- Becker DL**, Thrasivoulou C und Phillips ARJ. *Connexins in wound healing; perspectives in diabetic patients. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (2012) 1818: 2068-2075.
- Bennouna S**, Bliss SK, Curiel TJ und Denkers EY. *Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. The Journal of Immunology* (2003) 171: 6052-6058.
- Bermudez DM**, Herdrich BJ, Xu J, Lind R, Beason DP et al. *Impaired biomechanical properties of diabetic skin implications in pathogenesis of diabetic wound complications. The American Journal of Pathology* (2011) 178: 2215-2223.
- Blom IE**, van Dijk AJ, Wieten L, Duran K, Ito Y, et al. *In vitro evidence for differential involvement of CTGF, TGF β , and PDGF-BB in mesangial response to injury. Nephrology Dialysis Transplantation* (2001) 16: 1139-1148.
- Blum G**, Gazit A und Levitzki A. *Substrate competitive inhibitors of IGF-1 receptor kinase. Biochemistry* (2000) 39: 15705-15712.

- Böhm BO**, Dreyer M, Fritsche A, Füchtenbusch M und Gölz S. Therapie des Typ-1-Diabetes. *Diabetologie und Stoffwechsel* (2015) 10, *Suppl. 2*: 129-139.
- Brandner JM**, Kief S, Grund C, Rendl M, Houdek P *et al.* *Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. European Journal of Cell Biology* (2002) 81: 253-63.
- Brandner M**, Houdek P, Hüsing B, Kaiser C und Moll I. Connexins 26,30, and 43: *Differences among spontaneous, chronic, and accelerated human wound healing. Journal of Investigative Dermatology* (2004) 122: 1310-1320.
- Brandner JM**, Houdek P, Quitschau T, Siemann-Harms U, Ohnemus U *et al.* *An ex-vivo model to evaluate dressings & drugs for wound healing. Example: Influence of lucilia sericata extracts on wound healing progress. European Wound Management Association Journal* (2006) 6: 11-15.
- Brandner JM**, Zacheja S, Houdek P, Moll I und Lobmann R. *Expression of matrix metalloproteinases, cytokines, and connexins in diabetic and nondiabetic human keratinocytes before and after transplantation into an ex vivo wound-healing model. Diabetes Care* (2008) 31: 114-120.
- Brandner JM.** *The role of tight junctions and aquaporins in skin dryness. Textbuch: Treatment of dry skin syndrome - The art and science of moisturizers, Springer-Verlag* (2012) Kapitel 14: 215-232.
- Brem H** und Tomic-Canic M. *Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. The Journal of Clinical Investigation* (2007) 117: 1219-1222.
- Brisette JL**, Kumar NM, Gilula NB, Hall JE und Dotto GP: *Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (1994) 91: 6453-6457.
- Brocker C**, Thompson DC und Vasiliou V. *The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease. Biomolecular Concepts* (2012) 3: 345-364.
- Buck E**, Gokhale PC, Koujak S, Brown E und Eyzaguirre A. *Compensatory Insulin receptor (IR) activation on inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R): Rationale for cotargeting IGF-1R and IR in cancer. Molecular Cancer Therapeutics* (2010) 9: 2652-2664.
- Candi E**, Schmidt R und Melino G. *The cornified envelope: a model of cell death in the skin. Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2005) 6: 328-340.
- Cassatella MA.** *The production of cytokines by neutrophils. Immunology Today* (1995) 16: 21-26.
- Chertov O**, Ueda H, Xu LL, Tani K, Murphy WJ *et al.* *Identification of human neutrophil derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. The Journal of Experimental Medicine* (1997) 186: 739-747.

- Cogen AL**, Nizet V und Gallo RL. *Skin microbiota: a source of disease or defence? British Journal of Dermatology* (2008) 158: 442-455.
- Coutinho P**, Qiu C, Frank S, Tamber K und Becker D. *Dynamic changes in connexin expression correlate with key events in the wound healing process. Cell Biology International* (2003) 27: 525-541.
- Cusi K**, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME et al. *Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. Journal of Clinical Investigation* (2000) 105: 311-320.
- Dale BA**, Holbrook KA und Steinert PM. *Assembly of stratum corneum basic protein and keratin filaments in macrofibrils. Nature* (1978) 276: 729-731.
- De Benedetto A**, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN et al. *Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2011) 127: 773-786.
- de Kerdanet M**, Caron-Debarle M, Nivot S, Gaillot T, Lascols O et al. *Ten-year improvement of insulin resistance and growth with recombinant human insulin-like growth factor 1 in a patient with insulin receptor mutations resulting in leprechaunism. Diabetes & Metabolism* (2015) 41: 331-337.
- de la Puerta R**, Martínez-Domínguez E und Ruíz-Gutiérrez V. *Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. Zeitschrift für Naturforschung C* (2000) 55: 814-819.
- De Meyts P**, Roth J, Neville DM Jr, Gavin JR 3rd und Lesniak MA. *Insulin interactions with its receptors: experimental evidence for negative cooperativity. Biochemical and Biophysical Research Communications* (1973) 55: 154-161.
- Demirseren DD**, Emre S, Akoglu G, Arpacı D, Arman A et al. *Relationship between skin diseases and extracutaneous complications of diabetes mellitus: clinical analysis of 750 patients. American Journal of Clinical Dermatology* (2014) 15: 65-70.
- DiPietro LA** und Polverini PJ. *Role of the macrophage in the positive and negative regulation of wound neovascularization. Behring Institute Mitteilungen* (1993) 92: 238-247.
- Djalilian AR**, McGaughey D, Patel S, Seo EY, Yang C et al. *Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. The Journal of Clinical Investigation* (2006) 116: 1243-1253.
- Dresner A**, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S et al. *Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. The Journal of Clinical Investigation* (1999) 103: 253-259.
- Driver VR**, Fabbi M, Lavery LA und Gibbons G. *The costs of diabetic foot: The economic case for the limb salvage team. Journal of Vascular Surgery* (2010) 52: S17-S22.

- D'Souza T**, Sherman-Baust CA, Poosala S, Mullin JM und Morin PJ. *Age-related changes of claudin expression in mouse liver, kidney, and pancreas. The Journals of Gerontology, Series A® – Biological Sciences & Medical Sciences* (2009) 64: 1146-1153.
- Dunning T**. Textbuch: *Care of people with diabetes: A manual of nursing practice*, 3. Auflage. Wiley-Blackwell (2009).
- Ebeling S**, Naumann K, Pollok S, Wardecki T, Vidal-y-Sy S et al. *From a traditional medicinal plant to a rational drug: Understanding the clinically proven wound healing efficacy of birch bark extract. PLoS ONE* (2014) 9: e86147.
- Ebnet K**, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG und Vestweber, D. *Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. The Journal of Biological Chemistry* (2000) 275: 27979-27988.
- Ekman R**. *The submarine monomers and triterpenoids from the outer bark of Betula verrucosa EHRH. Holzforschung* (1983) 37: 205-211.
- Elfgang C**, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Butterweck A, Traub O et al. *Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. The Journal of Cell Biology* (1995) 129: 805-817.
- Elias PM**. *Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix. Journal of Investigative Dermatology* (2012) 132: 2131-2133.
- Falanga V**. *Wound healing and its impairment in the diabetic foot. The Lancet* (2005) 366: 1736-1743.
- Falk MM**, Buehler LK, Kumar NM und Gilula NB. *Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. The EMBO Journal* (1997) 16: 2703-2716.
- Fanning AS**, Jameson BJ, Jesaitis LA und Anderson JM. *The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. The Journal of Biological Chemistry* (1998) 273: 29745-29753.
- Faries PL**, Rohan DI, Takahara H, Wyers MC, Contreras MA et al. *Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration. Journal of Vascular Surgery* (2001) 33: 601-607.
- Federici M**, Lauro D, D'Adamo M, Giovannone B, Porzio O et al. *Expression of insulin/IGF-I hybrid receptors is increased in skeletal muscle of patients with chronic primary hyperinsulinemia. Diabetes* (1998) 47: 87-92.
- Federici M**, Giaccari A, Hribal ML, Giovannone B, Lauro D et al. *Evidence for glucose/hexosamine in vivo regulation of insulin/IGF-I hybrid receptor assembly. Diabetes* (1999) 48: 2277-85.

- Feldmeyer L**, Huber M, Fellmann F, Beckmann JS, Frenk E *et al.* *Confirmation of the origin of NISCH syndrome. Human Mutation* (2006) 27: 408-410.
- Fraser R.** *Metabolic disorders in diabetes. British Medical Journal* (1972) 4: 591-596.
- Fukuyama K** und Epstein WL. *Ultrastructural autoradiographic studies of keratohyalin granule formation. Journal of Investigative Dermatology* (1967) 49: 595-604.
- Furuse M**, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K und Tsukita S. *Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. The Journal of Cell Biology* (1998) 141: 1539-1550.
- Furuse M**, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A *et al.* *Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. Journal of Cell Biology* (2002) 156: 1099-1111.
- Gaikwad AB**, Gupta J und Tikoo K. *Epigenetic changes and alteration of Fbn1 and Col3A1 gene expression under hyperglycaemic and hyperinsulinaemic conditions. Biochemical Journal* (2010) 432: 333-341.
- Galli SJ**, Maurer M und Lantz CS. *Mast cells as sentinels of innate immunity. Current Opinion in Immunology* (1999) 11: 53-59.
- Gavin JR 3rd**, Roth J, Neville DM Jr., de Meyts P und Buell DN. *Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (1974) 71: 84-88.
- Gebäck T**, Schulz MM, Koumoutsakos P und Detmar M. *TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. Biotechniques* (2009) 46: 265-274.
- Geetha T** und Varalakshmi P. *Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. Journal of Ethnopharmacology* (2001) 76: 77-80.
- Gerrits EG**, Lutgers HL, Kleefstra N, Graaff R, Groenier KH *et al.* *Skin autofluorescence: a tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications. Diabetes Care* (2008) 31: 517-521.
- Ghazaryan AA**, Hu PS, Chen SJ, Tan HY und Dong CY. *Spatial and temporal analysis of skin glycation by the use of multiphoton microscopy and spectroscopy. Journal of Dermatological Science* (2012) 65: 189-195.
- Gkogkolou P** und Böhm M. *Advanced glycation end products - Key players in skin aging? Dermato-Endocrinology* (2012) 4: 259-270.
- Goliger JA** und Paul DL. *Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. Molecular Biology of the Cell* (1995) 6:1491-1501.

- Goodenough DA** und Paul DL. *Gap Junctions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (2009) 1: a002576.
- Grant MB** und Guay C. *Plasminogen activator production by human retinal endothelial cells of nondiabetic and diabetic origin. Investigative Ophthalmology & Visual Science* (1991) 32: 53-64.
- Greenhalgh DG.** *The role of apoptosis in wound healing. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (1998) 30: 1019-1030.
- Greenhalgh DG.** *Wound healing and diabetes mellitus. Clinics of Plastic Surgery* (2003) 30: 37-45.
- Gruber R**, Elias PM, Crumrine D, Lin TK, Brandner JM et al. *Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function. The American Journal of Pathology* (2011) 178: 2252-2263.
- Gruber R**, Börnchen, C, Rose K, Daubmann A, Volksdorf T et al. *Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis. The American Journal of Pathology* (2015) 185: 2777-2789.
- Gual P**, Gonzalez T, Grémeaux T, Barrés R, Le Marchand-Brustel Y et al. *Hyperosmotic stress inhibits insulin receptor substrate-1 function by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. The Journal of Biological Chemistry* (2003) 278: 26550-26557.
- Gual P**, Le Marchand-Brustel Y und Tanti JF. *Positive and negative regulation of glucose uptake by hyperosmotic stress. Diabetes & Metabolism* (2003) 29: 566–575.
- Guillemot L**, Paschoud S, Pulimeno P, Foglia A und Citi S. *The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. Biochimica et Biophysica Acta* (2008) 1778: 601-613.
- Günzel D** und Yu ASL. *Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiological Reviews* (2013) 93: 525-569.
- Gurtner GC**, Werner S, Barrandon Y und Longaker MT. *Wound repair and regeneration. Nature* (2008) 453: 314-321.
- Hadj-Rabia S**, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E et al. *Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. Gastroenterology* (2004) 127: 1386-1390.
- Haftek M**, Callejon S, Sandjeu Y, Padois K, Falson F et al. *Compartmentalization of the human stratum corneum by persistent tight junction-like structures. Experimental Dermatology* (2011) 20: 617-621.
- Harish BG**, Krishna V, Santosh Kumar HS, Khadeer Ahamed BM, Sharath R et al. *Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3- β -protein with isolated triterpenoid lupeol in rats. Phytomedicine* (2008) 15: 763-767.

- Helfrich I**, Schmitz A, Zigrino P, Michels C, Haase I, et al. *Role of aPKC isoforms and their binding partners Par3 and Par6 in epidermal barrier formation. Journal of Investigative Dermatology* (2007) 127: 782-791.
- Hendrixson DR**, Qiu J, Shewry SC, Fink DL, Petty S et al. *Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves Haemophilus surface proteins at arginine-rich sites. Molecular Microbiology* (2003) 47: 607-617.
- Hillier TA** und Pedula KL. *Complications in young adults with early-onset type 2 diabetes - losing the relative protection of youth. Diabetes Care* (2003) 26: 2999-3005.
- Huang C**, Liao R, Wang F und Tang S. *Characteristics of reconstituted tight junctions after corneal epithelial wounds and ultrastructure alterations of corneas in type 2 diabetic rats. Current Eye Research* (2015) 19: 1-8.
- Huyke C**, Laszczyk M, Scheffler A, Ernst R und Schempp CM. *Treatment of actinic keratoses with birch bark extract: a pilot study. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* (2006) 4: 132-136.
- Inai T**, Kobayashi J und Shibata Y. *Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. European Journal of Cell Biology* (1999) 78: 849-855.
- Ito M** und Cotsarelis G. *Is the hair follicle necessary for normal wound healing? Journal of Investigative Dermatology* (2008) 128: 1059-1061.
- Jäger S**, Laszczyk MN und Scheffler A. *A preliminary pharmacokinetic study of betulin, the main pentacyclic triterpene from extract of outer bark of birch (Betulae alba cortex) (2008). Molecules* 13: 3224-3235.
- Kanety H**, Moshe S, Shafrir E, Lunenfeld B und Karasik A. *Hyperinsulinemia induces a reversible impairment in insulin receptor function leading to diabetes in the sand rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (1994) 91: 1853-1857.
- Katsuno T**, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M et al. *Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. Molecular Biology of the Cell* (2008) 19: 2465–2475.
- Kaufman FR**. *Type 2 diabetes in children and young adults: A “New Epidemic”. Clinical Diabetes* (2002) 20: 217-218.
- Kawabata K**, Yoshikawa H, Saruwatari K, Akazawa Y, Inoue T et al. *The presence of N(ε)-(Carboxymethyl) lysine in the human epidermis. Biochimica et Biophysica Acta* (2011) 1814: 1246-1252.
- Kerner W** und Brückel J. Definition, Klassifikation und Diagnostik des *Diabetes mellitus*. *Diabetologie und Stoffwechsel* (2015) 10, Suppl. 2: 98-101.

- Keswani SG**, Katz AB, Lim FY, Zoltick P, Radu A *et al.* *Adenoviral mediated gene transfer of PDGF-B enhances wound healing in type I and type II diabetic wounds. Wound Repair and Regeneration* (2004) 12: 497-504.
- Kirkman MS**, Jones Briscoe V, Clark N, Florez H, Haas LB *et al.* *Diabetes in older adults. Diabetes Care* (2012) 35: 2650-2664.
- Kirschner N**, Poetzl C, von den Driesch P, Wladykowski E, Moll I *et al.* *Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis. The American Journal of Pathology* (2009) 175: 1095-1106.
- Kirschner N**, Bohner C, Rachow S und Brandner JM. *Tight junctions: is there a role in dermatology? Archives of Dermatological Research* (2010) 302: 483-493.
- Kirschner N** und Brandner JM. *Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. Annals of the New York Academy of Science* (2012) 1257: 158-166.
- Kirschner N**, Rosenthal R, Furuse M, Moll I, Fromm M *et al.* *Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology* (2013) 133: 1161-1169.
- Klare WR** und Eder S. Erfolgreiches Therapiekonzept des Diabetischen Fußsyndroms. www.bbraun.de (2012).
- Klinke R**, Pape HC, Kurtz A. und Silbernagl S. Textbuch: Physiologie, 6. Auflage. Thieme-Verlag (2009).
- Knaś M**, Niczyporuk M, Zalewska A und Car H. *The unwounded skin remodeling in animal models of diabetes types 1 and 2. Physiological Research* (2013) 62: 519-526.
- Koh TJ** und DiPietro LA. *Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. Expert Reviews in Molecular Medicine* (2011) 13: e23.
- Kolbe M**, Kaufman JL, Friedman J, Dinerstein C, Mackenzie JW *et al.* *Changes in steady-state levels of mRNAs coding for type IV collagen, laminin and fibronectin following capillary basement membrane thickening in human adult onset diabetes. Connective Tissue Research* (1990) 25: 77-85.
- Kranke P**, Bennett MH, Martyn-St James M, Schnabel A und Debus SE. *Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. Cochrane Database of Systematic Reviews* (2012): Artikel-Nummer: CD004123.
- Kretz M**, Euwens C, Hombach S, Eckardt D, Teubner B *et al.* *Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. Journal of Cell Science* (2003) 116: 3443-3452.
- Kubo T**, Sugimoto K, Kojima T, Sawada N, Sato N *et al.* *Tight junction protein claudin-4 is modulated via ΔNp63 in human keratinocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications* (2014) 455: 205-211.

- Kumar R**, Ouyang F, Story RE, Pongracic JA, Hong X *et al.* *Gestational diabetes, atopic dermatitis and allergen sensitization in early childhood. Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2009) 124: 1031-1038.
- Kumar N**, Kumar P, Badagabettu SN, Prasad K, Kudva R *et al.* *Quantitative fraction evaluation of dermal collagen and elastic fibres in the skin samples obtained in two orientations from the trunk region. Dermatology Research and Practice* (2014): Artikel-Nummer: 251254.
- Kurtzhals P**, Schäffer L, Sørensen A, Kristensen C, Jonassen I *et al.* *Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. Diabetes* (2000) 49: 999-1005.
- Laemmli UK.** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature* (1970) 227: 680-685.
- Lan CC**, Liu IH, Fang AH, Wen CH und Wu CS. *Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes. British Journal of Dermatology* (2008) 159: 1103-1115.
- Lan CCE**, Wu CS, Kuo HY, Huang SM und Chen GS. *Hyperglycaemic conditions hamper keratinocyte locomotion via sequential inhibition of distinct pathways: new insights on poor wound closure in patients with diabetes. British Journal of Dermatology* (2009) 160: 1206-1214.
- Landgraf R**, Kellerer M, Fach E, Gallwitz B, Hamann A *et al.* *Therapie des Typ-2-Diabetes. Diabetologie und Stoffwechsel* (2015) 10, Suppl. 2: 140-151.
- Laszczyk M**, Jäger S, Simon-Haarhaus B, Scheffler A und Schempp CM. *Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (betulae cortex). Planta Medica* (2006) 72: 1389-1395.
- Laszczyk MN.** *Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. Planta Medica* (2009) 75: 1549-1560.
- Laszczyk MN**, Reitenbach-Blindt I und Gehring W. *Regenerative und anti-entzündliche Effekte von Betulin-Emulsionen bei gestörter epidermaler Barrierefunktion. Aktuelle Dermatologie* (2010) 36: 24-28.
- Lebovitz HE.** *Insulin resistance: definition and consequences. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* (2001) 109, Suppl. 2: 135-148.
- Lehman PA** und Franz TJ. *Effect of induced acute diabetes and insulin therapy on stratum corneum barrier function in rat skin. Skin Pharmacology and Physiology* (2014) 27: 249-253.
- Lenselink EA.** *Role of fibronectin in normal wound healing. International Wound Journal* (2015) 12: 313-316.

- Lerman OZ**, Galiano RD, Armour M, Levine JP und Gurtner GC. *Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. The American Journal of Pathology* (2003) 162: 303-312.
- Levin ME**. *Management of the diabetic foot: preventing amputation. Southern Medical Journal* (2002) 95: 10-20.
- Li A**, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ et al. *Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. Angiogenesis* (2005) 8: 63-71.
- Lin JN**. *Yellow palms and soles in diabetes mellitus. The New England Journal of Medicine* (2006) 355: 1486.
- Lucke T**, Choudhry R, Thom R, Selmer IS, Burden AD et al. *Upregulation of connexin 26 is a feature of keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis, vaginal epithelium, and buccal epithelium. Journal of Investigative Dermatology* (1999) 112: 354-361.
- Luttrell IP**, Swee M, Starcher B, Parks WC und Chitale K. *Erectile dysfunction in the type II diabetic db/db mouse: impaired venoocclusion with altered cavernosal vasoreactivity and matrix. American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* (2008) 294: 2204-2211.
- Madden JW** und Peacock EE, Jr. *Studies on the biology of collagen during wound healing: III. Dynamic metabolism of scar collagen and remodeling of dermal wounds. Annals of Surgery* (1971) 174: 511-518.
- Malminen M**, Koivukangas V, Peltonen J, Karvonen SL, Oikarinen A et al. *Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis. British Journal of Dermatology* (2003) 149: 255-260.
- Máñez S**, Recio MC, Giner RM und Ríos JL. *Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. European Journal of Pharmacology* (1997) 334: 103-105.
- McCarthy KM**, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S et al. *Occludin is a functional component of the tight junction. Journal of Cell Science* (1996) 109: 2287-2298.
- McNeil E**, Capaldo CT und Macara IG. *Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. Molecular Biology of the Cell* (2006) 17: 1922-1932.
- Meneilly GS** und Tessier D. *Diabetes in elderly adults. The Journals of Gerontology, Series A® - Biological Sciences & Medical Sciences* (2001) 56: M5-M13.
- Meşe G**, Richard G und White TW. *Gap junctions: basic structure and function. Journal of Investigative Dermatology* (2007) 127: 2516-24.
- Metelmann HR**, Brandner J, Schumann H, Bross F, Hoffmann M et al. *Accelerating the aesthetic benefit of wound healing by triterpene. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* (2012) 40: 150-154.

- Metelmann HR**, Podmelle F, Waite PD, Müller-Debus CF, Hammes S *et al.* *Conditioning in laser skin resurfacing - betulin emulsion and skin recovery.* *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* (2013) 41: 249-253.
- Metelmann HR**, Brandner JM, Schumann H, Bross F, Fimmers R *et al.* *Accelerated reepithelialization by triterpenes: proof of concept in the healing of surgical skin lesions.* *Skin Pharmacology and Physiology* (2015) 28: 1-11.
- Midwood KS**, Williams LV und Schwarzbauer JE. *Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix.* *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (2004) 36: 1031-1037.
- Molinari J**, Ruzsova E, Velebny V und Robert L. *Effect of advanced glycation endproducts on gene expression profiles of human dermal fibroblasts.* *Biogerontology* (2008) 9: 177-182.
- Moll I.** *Dermatologie.* Thieme Verlag (2010) Auflage 7.
- Mori R**, Power KT, Wang CM, Martin P und Becker DL. *Acute downregulation of connexin43 at wound sites leads to a reduced inflammatory response, enhanced keratinocyte proliferation and wound fibroblast migration.* *Journal of Cell Science* (2006) 119: 5193-5203.
- Morita K**, Tsukita S und Miyachi Y. *Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease.* *British Journal of Dermatology* (2004) 151: 328-334.
- Mrsny RJ**, Brown GT, Gerner-Smidt K, Buret AG, Meddings JB *et al.* *A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity.* *The American Journal of Pathology* (2008) 172: 905-915.
- Müller SL**, Portwich M, Schmidt A, Utebgerenov DI, Huber O *et al.* *The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1.* *The Journal of Biological Chemistry* (2005) 280: 3747-3756.
- Muller LMAJ**, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG *et al.* *Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus* (2005). *Clinical Infectious Diseases* 41: 281-288.
- Nagai MK** und Embil JM. *Becaplermin: recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers.* *Expert Opinion on Biological Therapy* (2002) 2: 211-218.
- Niessen CM.** *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function.* *Journal of Investigative Dermatology* (2007) 127: 2525-2532.
- Niu Y**, Cao X, Song F, Xie T, Ji X *et al.* *Reduced dermis thickness and AGE accumulation in diabetic abdominal skin.* *The International Journal of Lower Extremity Wounds* (2012) 11: 224-230.
- Odland GF.** *A submicroscopic granular component in human epidermis.* *Journal of Investigative Dermatology* (1960) 34: 11-15.

- Oppenheim JJ**, Zachariae COC, Mukaida N und Matsushima K. *Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. Annual Review of Immunology* (1991) 9: 617-648.
- Otto NM**, Schindler R, Lun A, Boenisch O, Frei U *et al.* *Hyperosmotic stress enhances cytokine production and decreases phagocytosis in vitro. Critical Care* (2008) 12: R107.
- Ovaere P**, Lippens, S, Vandenabeele, P und Declercq W. *The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. Cell* (2009) 34: 453-463.
- Paris L**, Tonutti L, Vannini C und Bazzoni G. *Structural organization of the tight junctions. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* (2008) 1778: 646-659.
- Park HY**, Kim JH, Jung M, Chung CH und Hasham R. *A long-standing hyperglycaemic condition impairs skin barrier by accelerating skin ageing process. Experimental Dermatology* (2011) 20: 969-974.
- Pavlova NI**, Savinova OV, Nikolaeva SN, Boreko EI und Flekhter OB. *Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. Fitoterapia* (2003) 74: 489-492.
- Paz K**, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E *et al.* *A molecular basis for insulin resistance: elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. The Journal of Biological Chemistry* (1997) 272: 29911-29918.
- Pellerin L**, Henry J, Hsu CY, Balica S, Jean-Decoster C *et al.* *Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2013) 131: 1094-1102.
- Perez-Gutierrez RM** und Vargas-Solis R. *Wound healing properties of triterpenes from *Buddleia scordioides* in diabetic rats. Pharmaceutical Biology* (2008) 46: 647-653.
- Pitts JD**, Hamilton AE, Kam E, Burk RR und Murphy JP. *Retinoic acid inhibits junctional communication between animal cells. Carcinogenesis* (1986) 7: 1003-1010.
- Pollok S**, Pfeiffer AC, Lobmann R, Wright CS, Moll I, Martin PEM *et al.* *Connexin 43 mimetic peptide Gap27 reveals potential differences in the role of Cx43 in wound repair between diabetic and non-diabetic cells. Journal of Cellular and Molecular Medicine* (2011) 15: 861-873.
- Pummi K**, Malminen M, Aho H, Karvonen SL, Peltonen J *et al.* *Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology* (2001) 117: 1050-1058.
- Rachow S**, Zorn-Kruppa M, Ohnemus U, Kirschner N, Vidal-y-Sy S *et al.* *Occludin is involved in adhesion, apoptosis, differentiation and Ca²⁺-homeostasis of human keratinocytes: implications for tumorigenesis. PLoS ONE* (2013) 8: e55116.

- Reihnsner R**, Melling M, Pfeiler W und Menzel EJ. *Alterations of biochemical and two-dimensional biomechanical properties of human skin in diabetes mellitus as compared to effects of in vitro non-enzymatic glycation. Clinical Biomechanics* (2000) 15: 379-386.
- Reinke JM** und Sorg H. *Wound repair and regeneration. European Surgical Research* (2012) 49: 35-43.
- Reiser K**, McCormick RJ und Rucker RB. *Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. The FASEB Journal* (1992) 6: 2439-2449.
- Riazuddin S**, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S et al. *Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. The American Journal of Human Genetics* (2006) 79: 1040-1051.
- Riccardi G**, Giacco R und Rivellese AA. *Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. Clinical Nutrition* (2004) 23: 447-456.
- Rice RH** und Green H. *The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked protein* (1977). *Cell* 11: 417-422.
- Richard JL**, Sotto A und Lavigne JP. *New insights in diabetic foot infection. World Journal of Diabetes* (2011) 2: 24-32.
- Risek B**, Klier FG und Gilula NB. *Developmental regulation and structural organization of connexins in epidermal gap junctions. Developmental Biology* (1994) 164:183-196.
- Risek B**, Pozzi A und Gilula NB. *Modulation of gap junction expression during transient hyperplasia of rat epidermis. Journal of Cell Science* (1998) 111: 1395-1404.
- Roberts AC**, Gohil J, Hudson L, Connolly K, Warburton P et al. *Aberrant phenotype in human endothelial cells of diabetic origin: Implications for saphenous vein graft failure? Journal of Diabetes Research* (2015): Artikel-Nummer: 409432.
- Robson MC**, Stenberg BD und Heggors JP. *Wound healing alterations caused by infection. Clinics in Plastic Surgery* (1990) 17: 485-492.
- Robson MC**, Stead DL und Franz MG. *Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. Current Problems in Surgery* (2001) 38: 72-140.
- Rosenberg CS**. *Wound healing in the patient with diabetes mellitus. Nursing Clinics of North America* (1990) 25: 247-61.
- Safayhi H** und Sailer ER. *Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. Planta Medica* (1997) 63: 487-493.
- Saitoh M**, Oyamada M, Oyamada Y, Kaku T und Mori M: *Changes in the expression of gap junction proteins (connexins) in hamster tongue epithelium during wound healing and carcinogenesis. Carcinogenesis* (1997) 18: 1319-1328.

- Saitou M**, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M *et al.* *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. Molecular Biology of the Cell* (2000) 11: 4131-4142.
- Sakai S**, Kikuchi K, Satoh J, Tagami H und Inoue S. *Functional properties of the stratum corneum in patients with diabetes mellitus: similarities to senile xerosis. British Journal of Dermatology* (2005) 153: 319-323.
- Salomon D**, Masgrau E, Vischer S, Chanson M, Saurat JH *et al.* *Gap-junction proteins and communication in human epidermis. Progress in Cell Research* (1993) 3: 225–231.
- Saltiel A R** und Kahn C R. *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature* (2001) 377: 527-529.
- Sandilands A**, Sutherland C, Irvine AD und McLean WHI. *Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. Journal of Cell Science* (2009) 122: 1285-1294.
- Schnider SL** und Kohn RR. *Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and non enzymatic glucosylation of human skin collagen. Journal of Clinical Investigation* (1980) 67: 1630-1635.
- Schnider SL** und Kohn RR. *Effects of age and diabetes-mellitus on the solubility of collagen from human-skin, tracheal cartilage and dura mater. Experimental Gerontology* (1982) 17: 185-194.
- Schmidt A**, Utepbergenov DI, Mueller SL, Beyermann M, Schneider-Mergener J *et al.* *Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. Cellular and Molecular Life Sciences* (2004) 61: 1354-1365.
- Schruefer R**, Lutze N, Schymeinsky J und Walzog B. *Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* (2005) 288: 1186-1192.
- Schulzke JD**, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U *et al.* *Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. Biochimica et Biophysica Acta* (2005) 1669: 34-42.
- Seino S** und Bell GI. *Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. Biochemical and Biophysical Research Communications* (1989) 159: 312-316.
- Seirafi H**, Farsinejad K, Firooz A, Davoudi SM, Robati RM *et al.* *Biophysical characteristics of skin in diabetes: a controlled study. Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology* (2009) 23: 146-149.
- Seité S**, Khemis A, Rougier A und Ortonne JP. *Importance of treatment of skin xerosis in diabetes. Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology* (2011) 25: 607-609.
- Sell DR** und Monnier VM. *Aging of long-lived proteins: Extracellular matrix (collagens, elastins, proteoglycans) and lens crystallins. Comprehensive Physiology* (2011).

- Serban MA**, Liu Y und Prestwich GD. Effects of extracellular matrix analogues on primary human fibroblast behavior. *Acta Biomaterialia* (2008) 4: 67-75.
- Sesti G**, Federici M, Lauro D, Sbraccia P und Lauro R. *Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms*. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* (2001) 17: 363-373.
- Shanik MH**, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y *et al.* *Insulin resistance and hyperinsulinemia - Is hyperinsulinemia the cart or the horse?* *Diabetes Care* (2008) 31, Suppl. 2: 262-268.
- Shaw JE** und Boulton AJM. *The Charcot foot*. *Foot* (1995) 5: 65-70.
- Shen L**, Weber CR, Raleigh DR, Yu D und Turner JR. *Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo*. *Annual Review of Physiology* (2011) 73: 283-309.
- Shuster S**, Black MM und McVitie E. *The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density*. *British Journal of Dermatology* (1975) 93: 639-643.
- Silhi N**. *Diabetes and wound healing*. *Journal of Wound Care* (1998) 7: 47-51.
- Singer AJ** und Clark RA. *Cutaneous wound healing*. *The New England Journal of Medicine* (1999) 341: 738–746.
- Singh VP**, Bali A, Singh N und Jaggi AS. *Advanced glycation end products and diabetic complications*. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology* (2014) 18: 1-14.
- Smith FJ**, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE *et al.* *Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris*. *Nature Genetics* (2006) 38: 337-342.
- Sonoda N**, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J *et al.* *Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands*. *The Journal of Cell Biology* (1999) 147: 195-204.
- Spurgeon SL**, Jones RC und Ramakrishnan R. *High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array*. *PLoS ONE* (2008) 3: e1662.
- Steinbrenner I**, Houdek P, Pollok S, Brandner JM und Daniels R. *Influence of the oily phase and topical formulation on the wound healing ability of a birch dry extract*. *PLoS ONE*: In Revision.
- Sternberg M**, Cohen-Forterre L und Peyroux J. *Connective tissue in diabetes mellitus: biochemical alterations of the intercellular matrix with special reference to proteoglycans, collagens and basement membranes*. *Diabetes & Metabolism* (1985) 11: 27-50.
- Sterry W**. *Kurzlehrbuch Dermatologie*. Thieme-Verlag (2011) Auflage 1.
- Sudhahar V**, Kumar SA und Varalakshmi P. *Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic–oxidative stress in experimental hypercholesterolemia*. *Life Sciences* (2006) 78: 1329 -1335.

- Sugawara T**, Iwamoto N, Akashi M, Kojima T, Hisatsune J *et al.* *Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice.* *Journal of Dermatological Science* (2013) 70: 12-18.
- Sun T** und Green H. *Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope* (1976). *Cell* 9: 511-521.
- Suzuki K**, Miki M, Ono Y, Saito Y und Yamanaka H. *Acute renal failure following mannitol infusion.* *Hinyokika Kyo. Acta urologica Japonica* (1993) 39: 721-724.
- Takano K**, Kojima T, Sawada N und Himi T. *Role of tight junctions in signal transduction: an update.* *Experimental and Clinical Sciences* (2014) 13: 1145-1162.
- Tanaka S**, Avigad G, Brodsky B und Eikenberry EF. *Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen.* *Journal of Molecular Biology* (1988) 203: 495-505.
- Terranova A. *The effects of diabetes mellitus on wound healing.* *Plastic Surgical Nursing* (1991) 11: 20-25.**
- Thyssen JP**, Linneberg A, Carlsen BC, Johansen JD, Engkilde K *et al.* *A possible association between a dysfunctional skin barrier (filaggrin null-mutation status) and diabetes: a cross-sectional study.* *BMJ Open* (2011) 1: e000062.
- Toyama BH** und Hetzer MW. *Protein homeostasis: live long, won't prosper.* *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2013) 14: 55-61.
- Tsukita S** und Furuse M. *Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets.* *Current Opinion in Cell Biology* (2002) 14: 531-536.
- Tziotzios C**, Profyris C und Sterling J. *Cutaneous scarring: pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics.* *Journal of the American Academy of Dermatology* (2012) 66: 13-24.
- Uhoda E**, Debatisse B, Paquet P, Piérard-Franchimont C und Piérard GE. *The so-called dry skin of the diabetic patient.* *Revue Médicale de Liège* (2005) 60: 560-563.
- Umeda K**, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H *et al.* *Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1.* *The Journal of Biological Chemistry* (2004) 279: 44785-44794.
- Umeda K.**, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H *et al.* *ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation.* *Cell* (2006) 126: 741-754.
- Usui ML**, Mansbridge JN, Carter WG, Fujita M und Olerud JE. *Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds.* *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (2008) 56: 687-96.

Van Itallie CM, Fanning AS und Anderson JM. *Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. American Journal of Physiology - Renal Physiology* (2003) 285: F1078-F1084.

Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A und Anderson JM. *ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. Molecular Biology of the Cell* (2009) 20: 3930-3940.

Van Itallie CM, Fanning AS, Holmes J und Anderson JM. *Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. Journal of Cell Science* (2010) 123: 2844-2852.

Veenstra RD. *Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (1996) 28: 326-337.

Vikram A und Jena G. *S961, an insulin receptor antagonist causes hyperinsulinemia, insulin-resistance and depletion of energy stores in rats. Biochemical and Biophysical Research Communications* (2010) 398: 260-265.

Wang CM, Lincoln J, Cook JE und Becker DL. *Abnormal connexin expression underlies delayed wound healing in diabetic skin. Diabetes* (2007) 56: 2809-2817.

Watson RE, Poddar R, Walker JM, McGuill I, Hoare LM et al. *Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis. The Journal of Pathology* (2007) 212: 450-458.

Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I et al. *Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. The Journal of Biological Chemistry* (2004) 279: 53331-53337.

Werner S, Grose R. *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiological Reviews* (2003) 83: 835-870.

Wertheimer E, Trebicz M, Eldar T, Gartsbein M, Nofeh-Moses S et al. *Differential roles of insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor in differentiation of murine skin keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology* (2000) 115: 24-29.

van der Pijl JW, Daha MR, van den Born J, Verhagen NAM, Lemkes HHPJ et al. *Extracellular matrix in human diabetic nephropathy: reduced expression of heparan sulphate in skin basement membrane. Diabetologia* (1998) 41: 791-798.

Veves A, Murray HJ, Young MJ und Boulton AJM. *The risk of foot ulceration in diabetic patients with high foot pressure: a prospective study. Diabetologia* (1992) 35: 660-663.

Vijaykumar H, Pai SA, Pandey V und Kamble P. *Comparative study of collagenase and papain-urea based preparations in the management of chronic nonhealing limb ulcers. Indian Journal of Science and Technology* (2011) 4: 1096-1100.

- Villarroel M**, García-Ramírez M, Corraliza L, Hernández C und Simó R. *Effects of high glucose concentration on the barrier function and the expression of tight junction proteins in human retinal pigment epithelial cells. Experimental Eye Research* (2009) 89: 913-920.
- Vlassara H** und Uribarri J. *Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? Current Diabetes Reports* (2014) 14: 453. DOI: 10.1007/s11892-013-0453-1.
- Volksdorf T**, Lentfer J, Eming SA, Schawjinski K, Zorn-Kruppa M *et al.* *Tight junction proteins claudin-1 and occludin are important for cutaneous wound healing. Journal of Investigative Dermatology*: Eingereicht.
- Walter MNM**, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S und Johnson WEB. *Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. Experimental Cell Research* (2010) 316: 1271-1281.
- Wautier JL** und Guillausseau PJ. *Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. Vascular Medicine* (1998) 3: 131-137.
- Webb PG**, Spillman MA und Baumgartner HK. *Claudins play a role in normal and tumor cell motility. BMC Cell Biology* (2013) 14: 19.
- Weckesser S**, Laszczyk MN, Müller ML, Schempp CM und Schumann H. *Topical treatment of necrotising herpes zoster with betulin from birch bark. Forschende Komplementärmedizin* (2010) 17: 271-273.
- Weinstein D**, Sarfstein R, Laron Z und Werner H. *Insulin receptor compensates for IGF1R inhibition and directly induces mitogenic activity in prostate cancer cells. Endocrine Connections* (2014) 3: 24-35.
- Whiting DR**, Guariguata L, Weil C und Shaw J. *IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes Research and Clinical Practice* (2011) 94: 311-321.
- Wilcox G**. *Insulin and insulin resistance. The Clinical Biochemist Reviews* (2005) 26: 19-39.
- Wilgenbus KK**, Kirkpatrick CJ, Knüchel R, Willecke K und Traub O. *Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. International Journal of Cancer* (1992) 51: 522-529.
- Woldemichael GM**, Singh MP, Maiese WM und Timmermann BN. *Constituents of antibacterial extract of Caesalpinia paraguariensis Burk. Zeitschrift für Naturforschung C* (2003) 58: 70-75.
- Wolf R** und Wolf D. *Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of atopic dermatitis. Clinics in Dermatology* (2012) 30: 329-334.
- Wong V**. *Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. American Journal of Physiology* (1997) 273: C1859-1867.

- Wright CS**, van Steensel MAM, Hodgins MB und Martin PEM. *Connexin mimetic peptides improve cell migration rates of human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro*. *Wound Repair and Regeneration* (2009) 17: 240-249.
- Wright CS**, Pollok S, Flint DJ, Brandner JM und Martin PE. *The connexin mimetic peptide Gap27 increases human dermal fibroblast migration in hyperglycemic and hyperinsulinemic conditions in vitro*. *Journal of Cellular Physiology* (2012) 227: 77-87.
- Wright CS**, Berends RF, Flint DJ und Martin PE. *Cell motility in models of wounded human skin is improved by Gap27 despite raised glucose, insulin and IGFBP-5*. *Experimental Cell Research* (2013) 319: 390-401.
- Yamamoto T**, Saeki Y, Kurasawa M, Kuroda S, Arase S et al. *Effect of RNA interference of tight junction-related molecules on intercellular barrier function in cultured human keratinocytes*. *Archives of Dermatological Research* (2008) 300: 517-524.
- Yang YH**, Fu XB und Wang YP. *Determination of fibronectin mRNA expression in patients with diabetic ulcers by quantitative polymerase chain reaction technique*. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery* (2000) 14: 20-23.
- Yasui T**, Tohno Y und Araki T. *Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light*. *Applied Optics* (2004) 43: 2861-2867.
- Ye J**. *Mechanisms of insulin resistance in obesity*. *Frontiers in Medicine* (2013) 7: 14-24.
- Yokota M** und Tokudome Y. *Permeation of hydrophilic molecules across glycated skin is differentially regulated by the stratum corneum and epidermis-dermis*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (2015) 38: 1383-1388.
- Yokouchi M**, Kubo A, Kawasaki H, Yoshida K, Ishii K et al. *Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum*. *Journal of Dermatological Science* (2015) 77: 28-36.
- Yoon HS**, Baik SH und Oh CH. *Quantitative measurement of desquamation and skin elasticity in diabetic patients*. *Skin Research and Technology* (2002) 8: 250-254.
- Yoshida K**, Yokouchi M, Nagao K, Ishii K, Amagai M et al. *Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis*. *Journal of Dermatological Science* (2013) 71: 89-99.
- Yoshinaga E**, Kawada A, Ono K, Fujimoto E, Wachi H et al. *N(ε)-(carboxymethyl)lysine modification of elastin alters its biological properties: implications for the accumulation of abnormal elastic fibers in actinic elastosis*. *Journal of Investigative Dermatology* (2012) 132: 315-323.

Yu AS, McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J *et al.* *Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. The American Journal of Physiology - Cell Physiology* (2005) 288: C1231-1241.

Yuki T, Haratake A, Koishikawa H, Morita K, Miyachi Y *et al.* *Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. Experimental Dermatology* (2007) 16: 324-330.

Yuki T, Komiya A, Kusaka A, Kuze T und Sugiyama Y. *Impaired tight junctions obstruct stratum corneum formation by altering polar lipid and profilaggrin processing. Journal of Dermatological Science* (2013) 69: 148-158.

Zick Y. *Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. Trends in Cell Biology* (2001) 11: 437-441.

Zorn-Kruppa M, Volksdorf T, Ueck C, Zöller E, Reinshagen K *et al.* *Major cell biological parameters of keratinocytes are predetermined by culture medium and donor source. Experimental Dermatology* (2015): DOI: 10.1111/exd.12922.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1.1	Schematischer Querschnitt der menschlichen Haut. (Abbildung modifiziert nach Winslow, 2008)	5
1.2	Schematischer Querschnitt der Epidermis. (Abbildung modifiziert nach Ovaere <i>et al.</i> , 2009)	7
1.3	HE-Färbung eines Querschnittes von humaner Haut.	8
1.4	Lokalisation und Aufbau von <i>Tight Junctions</i> in humaner Haut. (Abbildung modifiziert nach Brandner, 2012 und Niessen, 2007)	12
1.5	Ablauf der kutanen Wundheilung. (Abbildung modifiziert nach Gurtner <i>et al.</i> , 2008)	18
1.6	Zusammensetzung von <i>Gap Junctions</i> und ihrer Untereinheiten. (Abbildung modifiziert nach Goodenough und Paul, 2003)	19
1.7	Wirkung von TE auf die normale Wundheilung. (Abbildung modifiziert nach Metelmann <i>et al.</i> , 2012)	21
1.8	Insulin-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion. (Abbildung modifiziert nach Saltiel und Kahn, 2001)	23
1.9	Wahrscheinliche Lokalisation und dramatischer Verlauf des diabetischen Fußsyndroms. (Abbildung modifiziert nach http://www.webmd.com und Merfort, privat)	26
3.1	Fotografierte <i>Well</i> -Areale beim klassischen <i>Scratch-Assay</i> .	46
3.2	Schematische Darstellung eines <i>Transwells</i> mit Keratinozyten.	49
3.3	Schematische Darstellung eines <i>Ex-vivo</i> -Wundheilungsmodells.	55
3.4	Verteilung der <i>regions of interest</i> (ROIs) in humaner Epidermis.	60
3.5	Jablonski-Diagramme.	60
3.6	Lokalisierung der Fluoreszenzanregung bei der Einzel- gegenüber der Zwei-Photonen-Anregung.	61
3.7	Zeitliche Kompression von Photonen während der Femtosekunden-Pulse.	62
3.8	Mosaikfeld bestehend aus neun gleich großen Einzelfeldern mit dem Ausgangsquadrat in grau.	62
3.9	Auswertung der mikroskopischen Messdaten mithilfe der <i>Software Directionality</i> .	64
3.10	Darstellung der Chemilumineszenzreaktion.	70
3.11	Verwundung des <i>Monolayers</i> humaner diabetischer und nicht-diabetischer Keratinozyten.	72
3.12	Überprüfung der RNA-Integrität (Abbildung modifiziert nach http://www.agilent.com)	74
3.13	Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR mit <i>TaqMan</i> [®] -Sonden. (Abbildung modifiziert nach http://www.medizinische-genetik.de)	76
4.1	Immunlokalisation und -intensität von Claudin-1 in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut.	82
4.2	Immunlokalisation und -intensität von Claudin-4 in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut.	83
4.3	Immunlokalisation und -intensität von Occludin in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut.	84
4.4	Immunlokalisation und -intensität von ZO-1 in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut.	85
4.5	Genexpression von TJ-Proteinen in humanen Keratinozyten.	86
4.6	Immunlokalisation und -intensität sowie die Genexpression von Filaggrin in nicht-diabetischem und diabetischem humanem Gewebe.	87
4.7	Permeabilität von Keratinozyten diabetischen Ursprungs für Ionen und für größere Moleküle im Vergleich zu Keratinozyten nicht-diabetischen Ursprungs.	89
4.8	Einfluss von Hyperglykämie auf den TER von adulten, nicht-diabetischen Keratinozyten.	91

4.9	Auswirkungen der Antagonisierung des Insulin-Rezeptors auf den TER von humanen Keratinozyten mittels S961.	92
4.10	Auswirkungen der Antagonisierung des Insulin-Rezeptors mittels S961 auf die intrazelluläre Signaltransduktion von primären humanen Keratinozyten.	93
4.11	Auswirkungen der gleichzeitigen Antagonisierung des Insulinrezeptors und des IGF- <i>I</i> -Rezeptors auf den TER von humanen Keratinozyten mittels AG538.	94
4.12	Auswirkungen einer gleichzeitigen Antagonisierung des Insulin- und IGF- <i>I</i> -Rezeptors mittels AG538 auf die intrazelluläre Signaltransduktion von primären humanen Keratinozyten.	95
4.13	Orientierung von Kollagenfasern in humanem Gewebe.	99
4.14	Orientierung von Elastinfasern in humanem Gewebe.	100
4.15	Orientierung von Kollagenfasern in porcinem Gewebe.	102
4.16	Orientierung von Elastinfasern in porcinem Gewebe.	103
4.17	Genexpression von TJ-Proteinen während der <i>Scratch</i> -Wundheilung.	105
4.18	Immunlokalisation und -intensität von Cx26 in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut.	108
4.19	Immunlokalisation und -intensität von Cx43 in humaner nicht-diabetischer und diabetischer Haut.	109
4.20	Genexpression von Connexin-Molekülen während der <i>Scratch</i> -Wundheilung.	110
4.21	Einfluss des diabetischen Charakters von humanen adulten Keratinozyten auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung.	112
4.22	Einfluss der <i>Scratch</i> -Assay-Methode auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung von humanen diabetischen Keratinozyten.	113
4.23	Einfluss von hyperglykämischen Bedingungen auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung humaner infanter Keratinozyten in verschiedenen Kulturmedien.	115
4.24	Einfluss von hyperglykämischen Bedingungen auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung humaner infanter Keratinozyten in K-SFM ohne und mit Zusatzstoffen.	117
4.25	Auswirkungen verschiedener <i>Scratch</i> -Assay-Varianten und verschiedener Glukosekonzentrationen auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung adulter nicht-diabetischer Keratinozyten.	119
4.26	Einfluss von hyperglykämischen Bedingungen auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung von humanen, diabetischen Keratinozyten.	120
4.27	Einfluss des diabetischen Charakters von humanen adulten Keratinozyten auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung.	120
4.28	Einfluss von hyperglykämischen Bedingungen auf die Wundheilung und auf den Phänotyp von porcinen <i>Ex-vivo</i> -Wundheilungsmodellen.	122
4.29	Einfluss von W/O-Emulsionen mit unterschiedlichem Wassergehalt auf die Wundheilung im porcinen <i>Ex-vivo</i> -Wundheilungsmodell.	124
4.30	Einfluss von TE in verschiedenen galenischen Formulierungen auf die porcine <i>Ex-vivo</i> -Wundheilung unter hyperglykämischen Bedingungen.	125
4.31	Auswirkungen einer TE- und Betulin-Behandlung auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung infanter Keratinozyten unter verschiedenen Glukosebedingungen im klassischen <i>Scratch</i> -Assay.	127
4.32	Klassischer <i>Scratch</i> -Assay: Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von TE und Betulin auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung von adulten, nicht-diabetischen Keratinozyten unter verschiedenen Glukosebedingungen.	130
4.33	<i>Scratch</i> -Assay-Analyse im <i>IncuCyte-Zoom</i> [®] -System: Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von TE und Betulin auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung von adulten nicht-diabetischen Keratinozyten unter verschiedenen Glukosebedingungen.	131
4.34	<i>Scratch</i> -Assay-Analyse im <i>IncuCyte-Zoom</i> [®] -System: Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von TE und Betulin auf die <i>In-vitro</i> -Wundheilung von diabetischen Keratinozyten unter verschiedenen Glukosebedingungen.	133
4.35	Einfluss verschiedener Konzentrationen von TE und Betulin auf die Proliferation adulter, nicht-diabetischer Keratinozyten unter hyperglykämischen Bedingungen	135
5.1	Gelbfärbung der Haut von Diabetikern. (Abbildung modifiziert nach Lin, 2006)	154

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
2.1	Übersicht der verwendeten Geräte	30
2.2	Übersicht der verwendeten Chemikalien	32
2.3	Prozentuale Anteile der TE-Einzeltriterpene in DMSO	33
2.4	Zusammensetzung des TE-Oleogels	34
2.5	Zusammensetzung der Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsionen	34
2.6	Übersicht der verwendeten <i>Kits</i>	34
2.7	Übersicht der verwendeten Peptide	35
2.8	Übersicht der verwendeten Primärantikörper für die immunhistochemische Analyse von humanem kryokonserviertem Gewebe und ihre Anwendungsparameter	35
2.9	Übersicht der verwendeten Antikörper-Isotypen als Negativkontrollen für die immunhistochemische Analyse von humanem kryokonserviertem Gewebe	36
2.10	Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundärantikörper für die immunhistochemische Analyse von humanem kryokonserviertem Gewebe und ihre Verdünnung	36
2.11	Übersicht der verwendeten Primärantikörper für <i>Western-Blot</i> -Analysen von humanen Proteinproben und ihre Anwendungsparameter	36
2.12	Übersicht der verwendeten MRP-gekoppelten Sekundärantikörper für <i>Western-Blot</i> -Analysen von Proteinproben aus primären humanen Keratinozyten und ihre Verdünnungen	37
2.13	Übersicht der analysierten Gene mit Gensymbol, zugehörigem Gen- und Proteinnamen sowie Identifikationsnummer der verwendeten <i>TaqMan</i> [®] -Sonden	37
2.14	Übersicht der verwendeten humanen Gewebe diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs	39
2.15	Übersicht der verwendeten humanen Keratinozyten aus dem Hautgewebe adulter Diabetiker und gesunder Individuen	40
2.16	Übersicht der verwendeten <i>Software</i> -Programme und ihr Verwendungszweck	41
3.1	Parametereinstellungen zur Messung der Fluoreszenzintensität von FD-4 und FD-40	52
3.2	Pipettierschema für die Ansätze zur Proteinbestimmung	66
3.3	Zusammensetzung des Trenn- und des Sammelgels	68
3.4	Reaktionsansatz für die Reverse Transkription von 3 µg RNA in cDNA	75
3.5	Zusammensetzung des <i>Master-Mixes</i>	76
3.6	PCR-Reaktionsansatz	76
3.7	<i>Master-Mix</i> für die Reverse Transkription	78
3.8	Reaktionsansatz für die Reverse Transkription von 100 ng RNA in cDNA	78
3.9	<i>Master-Mix</i>	79
3.10	Proben-Mix	79
3.11	Mix aus <i>Primern</i> und <i>TaqMan</i> [®] -Sonden (10x <i>Assays</i>)	80
4.1	Genexpression ausgewählter Strukturproteine in der Dermis von diabetischem im Vergleich zu nicht-diabetischem Gewebe	97
4.2	Genexpression von Cx26 und Cx43 in der Epidermis von diabetischem verglichen mit gesundem Gewebe	109
4.3	Vergleich der zwei <i>Scratch-Assay</i> -Varianten	111

6.4 Formelverzeichnis

Formel	Verwendungszweck	Seite
3.1	Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten	52
3.2	Formel zur Berechnung der NK-Verdünnung im Rahmen immunhistochemischer Färbungen	58
3.3	Normalisierung der Zielgen-Expression gegen die des Referenzgens zur Berechnung von ΔC_t	77
3.4	Subtraktion des normalisierten Expressionsunterschiedes des Kontrollansatzes von dem des Probenansatzes zur Berechnung von $\Delta\Delta C_t$	77
3.5	Berechnung des relativen Genexpressionsunterschiedes (R)	77

6.5 Abkürzungsverzeichnis

AD	Atopische Dermatitis
AGE	<i>Advanced glycation endproduct</i>
AiF	Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen
AK	Antikörper
Akt	<i>AKT8 virus oncogene cellular homolog</i>
AMP	Antimikrobielles Peptid
aPKC	<i>Atypical protein kinase C</i>
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C3G	<i>Crk SH3-binding GMRP</i>
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CAP	<i>Catabolite activator protein</i>
Cbl	<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Cl ⁻	Chlorid-Ionen
Cldn	Claudin
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Crk	<i>CT10 regulator of kinase</i>
C _t	<i>Cycle threshold</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cx	Connexin
DE	Deutschland
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F(ab') ₂	<i>Fragment antigen binding</i>
FAM TM	Fluorescein
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FD	FITC-Dextran
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
fs	Femtosekunden
g	Erdbeschleunigung
Gab-1	<i>GRB2-associated-binding protein b1</i>
GLUT	Glukose-Transporter
GJ	<i>Gap Junction</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
GUK	<i>Guanylate kinase</i>
h	<i>hora</i>
H ₂ O	Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HKGS	<i>Human keratinocyte growth supplement</i>
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HbA1c	Hämoglobin A1c
IFN	Interferon
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IGF-R	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
IL	Interleukin
IR	Insulin-Rezeptor
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
J.	Jahre
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
kDa	Kilodalton
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
K-SFM	<i>Keratinocyte serum-free medium</i>
lat.	lateinisch
MAGI	<i>Membrane-associated guanylate kinase-like protein inverted</i>
MAGUK	<i>Membrane-associated guanylate kinases</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHz	Megahertz
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter

mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRP	Meerrettich-Peroxidase
MUPP	<i>multi-PDZ domain protein</i>
n	Anzahl der unabhängigen Experimente
n. a.	<i>Not available</i>
Na ⁺	Natrium-Ionen
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
ns	Nanosekunden
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NISCH	Neonatale Ichthyose - Sklerosierende Cholangitis
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NMF	<i>Natural moisturizing factor</i>
nmol	Nanomol
NP	Nonidet P
N-Terminus	Amino-Terminus
Ocln	Occludin
Ω	Ohm
P	Permeabilitätskoeffizient
p	<i>Probability</i>
p110	<i>Polypeptide of 110,000 kDa (Proteinuntereinheit der PI(3)K)</i>
p70 ^{rsk}	<i>Polypeptide of 70,000 kDa (ribosomal S6 kinase)</i>
p85	<i>Polypeptide of 85,000 kDa (Proteinuntereinheit der PI(3)K)</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>Postsynaptic density, disc-large, ZO-1</i>
PI(3)K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP1	<i>Protein phosphatase 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTP1β	<i>Protein tyrosine phosphatase 1β</i>
qRT-PCR	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
R	Relativer Expressionsunterschied
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rh	<i>Recombinant human</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of interest</i>
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg
S ₀	Energetischer Grundzustand
S ₁	Angeregter Zustand
SB	<i>Stratum basale</i>
SC	<i>Stratum corneum</i>

SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Ser	Serin
SG	<i>Stratum granulosum</i>
SH	Thiolgruppe
SH3	<i>Src homology 3</i>
Shc	<i>Src homology 2 domain containing</i>
SHG	<i>Second harmonic generation</i>
SHIP2	<i>SH2-containing inositol phosphatase 2</i>
SHP2	<i>Src homology phosphatase 2</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SS	<i>Stratum spinosum</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> und <i>Tween 20</i>
TC10	<i>Tetracarcinoma 10</i>
TE	Triterpenextrakt
TER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Thr	Threonin
TJ	<i>Tight Junction</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
UK	Unbehandelte Kontrolle oder <i>United Kingdom</i>
U	<i>Unique</i> oder <i>unit</i>
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolettstrahlung
USA	<i>United States of America</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHM	Wundheilungsmodell
www	<i>World Wide Web</i>
ZO	<i>Zonula occludens protein</i>
ZONAB	<i>Zonula occludens 1 (ZO-1)-associated nucleic acid binding protein</i>

Publikationen

Erstautorenschaft

Zorn-Kruppa M*, Volksdorf T*, **Ueck C***, Zöller E, Reinshagen K, Ridderbusch I, Bruning G, Houdek P, Moll I, Brandner JM. *Major cell biological parameters of keratinocytes are predetermined by culture medium and donor source. Experimental Dermatology* (2015): DOI: 10.1111/exd.12922.

*gleichberechtigte Erstautorenschaft

Publikation mit Beteiligung

Volksdorf T, Lentfer J, Eming SA, Schawjinski K, Zorn-Kruppa M, **Ueck C**, Vidal-y-Sy S, Moll I, Johanna M. Brandner JM. *Tight junction proteins claudin-1 and occludin are important for cutaneous wound healing. Journal of Investigative Dermatology*: Eingereicht.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Johanna M. Brandner für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas und die engagierte sowie kompetente Betreuung meiner Doktorarbeit. Insbesondere möchte ich die immerwährende Bereitschaft, wissenschaftliche Problemstellungen gemeinsam zu diskutieren, hervorheben. Darüber hinaus haben mir ihre wertvollen Anregungen und Ratschläge immer sehr weitergeholfen.

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

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Prof. Dr. Ingrid Moll für die Möglichkeit, im Zell- und Molekularbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie meine Doktorarbeit durchführen zu können.

Weiterhin möchte ich mich in besonderem Maße bei meinen aktuellen Kollegen bedanken. Zum einen sind hier die technischen Assistentinnen Pia Houdek, Sabine Vidal-y-Sy und Ewa Wladykowski zu nennen, von deren praktischer Expertise und Unterstützung ich in umfassender Weise profitiert habe. Zum anderen danke ich meinen Mitdoktoranden Katja Bäsler, Sophia Bergmann, Mutiha Pandjaitan, Janine Radtke und Thomas Volksdorf für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Auch eure Hilfsbereitschaft wusste ich immer sehr zu schätzen. Thomas Volksdorf, der mir bei statistischen Fragestellungen stets mit Rat und Tat zur Seite stand, möchte ich an dieser Stelle besonders danken. Ebenso danke ich Dr. Michaela Zorn-Kruppa für die freundliche Zusammenarbeit und ihre hilfreichen Ratschläge.

Außerdem danke ich meinem ehemaligen Arbeitskollegen Dr. Christian Börnchen für seine Anleitung zur eigenständigen Nutzung des Zwei-Photonen-Mikroskops sowie für seinen gewichtigen Beitrag zur Entwicklung des Versuchs-*Settings*, mit dem die Orientierung von Kollagen- und Elastinfasern in humaner und porciner Haut bestimmt wurde. Meinem ehemaligen Kollegen PD Dr. Thomas Tilling möchte ich für die gute Zusammenarbeit, seine Diskussionsbereitschaft und die gemeinsame Zeit als Bürokollegen danken.

Im Rahmen des AiF-geförderten Kooperationsprojektes möchte ich allen Beteiligten für den wissenschaftlichen Austausch und das freundliche Miteinander auf den gemeinsamen Treffen danken. Ein großer Dank gilt ebenfalls Dr. Bernhard Ellinger, der mich im Rahmen der *IncuCyte-Zoom[®]-Scratch-Assay-Analysen* sowohl praktisch als auch bei der Auswertung intensiv unterstützt hat.

Ebenso danke ich allen Kliniken, von denen ich Hautgewebe und Hautzellen diabetischen und nicht-diabetischen Ursprungs bezogen habe, da meine Analysen ohne dieses Material nicht möglich gewesen wären.

Schließlich möchte ich meiner Familie für ihre großartige Unterstützung von Anbeginn des Studiums bis heute sehr herzlich danken.