

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

**Die Rolle der Tight-Junction-Proteine
Claudin-1, Occludin und ZO-1
in nativer und gestörter epidermaler Wundheilung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Department Biologie der Fakultät für Mathematik,

Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Thomas Volksdorf

aus Stralsund

Hamburg 2017

Gutachter

Prof. Dr. Johanna Brandner

Prof. Dr. Jörg Ganzhorn

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Jörg Ganzhorn

Datum der Disputation: 12.05.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Haut.....	1
1.2. Ablauf der kutanen Wundheilung	2
1.2.1. Inflammationsphase	3
1.2.2. Regenerationsphase.....	3
1.2.3. Remodellierungsphase	5
1.3. Tight Junctions.....	7
1.3.1. Tight Junctions und Tight Junction-Proteine.....	7
1.3.1.1. Claudin-1.....	7
1.3.1.2. Occludin.....	10
1.3.1.3. ZO-1.....	12
1.3.2. TJ-Proteine in der Wundheilung.....	13
1.4. Chronische Wunden.....	17
1.5. Zielsetzung.....	18
2. Material und Methoden.....	20
2.1. Material	20
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.2. Antikörper	21
2.1.3. siRNA.....	22
2.1.4. Primer für real-time PCR.....	22
2.1.5. Medien und Lösungen für Zell- und Gewebekultur	22
2.1.6. Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie.....	23
2.1.7. Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie	26
2.1.8. Gewebe	28
2.1.8.1. Porzine <i>ex vivo</i> Wundheilungsmodelle	28
2.1.8.2. Humane <i>ex vivo</i> Wundheilungsmodelle.....	28
2.1.8.3. Humane akute Wunden.....	28

2.1.8.4. Humane chronische Wunden	28
2.1.8.5. Humane Keratinozyten	29
2.1.9. Apparaturen und Hilfsmittel	29
2.1.10. Software	30
2.2. Methoden	31
2.2.1. Gewebekultur	31
2.2.1.1. Herstellung und Kultivierung der <i>ex vivo</i> Wundmodelle	31
2.2.2. Zellkultur	32
2.2.2.1. Anzucht von humanen Keratinozyten aus Preputia	32
2.2.2.2. Kultivierung und Passagierung	33
2.2.2.3. Kryokonservierung	33
2.2.2.4. Rekultivierung von eingefrorenen Zellen	34
2.2.2.5. Scratch-Wundheilungsversuch	34
2.2.2.6. optionale Vorbehandlungen im Scratch-Wundheilungsversuch	35
2.2.2.7. gestresster Scratch-Wundheilungsversuch	36
2.2.2.8. siRNA-Behandlung (Protein-Knockdown)	36
2.2.2.9. Ki67-Färbung auf Deckgläschen	37
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	38
2.2.3.1. Proteinextraktion	38
2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	38
2.2.3.3. 1D-Gelelektrophorese nach Laemmli	39
2.2.3.4. Western Blot	41
2.2.3.5. Western-Blot-Analyse	42
2.2.3.6. Coomassie-Färbung der Gele nach Maniatis	43
2.2.3.7. RNA-Isolation	44
2.2.3.8. Herstellung cDNA	46
2.2.3.9. real-time PCR	46
2.2.4. Histologische Methoden	47
2.2.4.1. Anfertigung von Gefrierschnitten	47
2.2.4.2. Anfertigung von Paraffinschnitten	47

2.2.4.3. HE-Färbung.....	49
2.2.4.4. Immunfluoreszenz-Färbung.....	49
2.2.4.5. Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen	51
2.2.5. statistische Auswertung.....	51
3. Ergebnisse	53
3.1. Untersuchung von chronischen Wunden im Vergleich zu normal heilenden Wunden.....	53
3.1.1. Lokalisation und Expression der TJ-Moleküle in normalen und chronischen Wunden.....	53
3.1.1.1. Claudin-1.....	53
3.1.1.2. Occludin.....	56
3.1.1.3. ZO-1.....	58
3.2. Auswirkungen des Knockdowns von TJ-Proteinen.....	62
3.2.1. Einfluss des Mediums auf die Keratinozyten	62
3.2.2. Einfluss der Negativ-siRNA-Kontrollen auf die Keratinozyten.....	64
3.2.2.1. Einfluss auf die Proliferation und Scratchwundheilung	64
3.2.2.2. Einfluss auf die untersuchten TJ-Proteine	67
3.2.2.3. Einfluss auf Proteinkinasen	68
3.2.2.4. Zusammenfassung der beobachteten Unterschiede und Fazit.....	71
3.2.3. Knockdown von Claudin-1.....	74
3.2.3.1. Effekt auf die Scratch-Wundheilung	76
3.2.3.2. Effekt auf die Migration.....	78
3.2.3.3. Effekt auf die Proliferation	79
3.2.3.4. Effekt auf die Differenzierung	80
3.2.3.5. Effekt auf Proteinkinasen.....	81
3.2.3.6. Bedeutung der AKT-Kinase.....	89
3.2.3.7. Zusammenfassung der Effekte des Claudin-1-Knockdowns.....	91
3.2.4. Knockdown von Occludin	92
3.2.4.1. Effekt auf die Scratch-Wundheilung	94
3.2.4.2. Effekt auf die Proliferation	96

3.2.4.3. Effekt auf Scratch-Wundheilung unter mechanischem Stress	97
3.2.4.4. Zusammenfassung der Effekte des Occludin-Knockdowns	99
3.2.5. Knockdown von ZO-1.....	101
3.2.5.1. Effekt auf die Scratch-Wundheilung	102
3.2.5.2. Effekt auf die Proliferation	103
3.2.5.3. Zusammenfassung der Effekte des ZO-1-Knockdowns.....	104
4. Diskussion.....	105
4.1. Lokalisation und Expression der TJ-Moleküle während der Wundheilung und die daraus resultierenden Effekte	105
4.1.1. Lokalisation der TJ-Moleküle in der Epidermis in humanen akuten Wunden sowie <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> WHM	105
4.1.2. Vergleich der Lokalisation der TJ-Moleküle in der Epidermis zwischen akuten und chronischen Wunden	106
4.1.2.1. Unterschiede in der Verteilung von Claudin-1 und mögliche Effekte.	107
4.1.2.2. Unterschiede in der Verteilung von Occludin und mögliche Effekte ..	112
4.1.2.3. Unterschiede in der Verteilung von ZO-1 und mögliche Effekte.....	115
4.1.2.4. Zusammenfassung der Effekte.....	118
4.1.3. Vergleich mit den Daten zur Lokalisation der TJ-Proteine in porzinen <i>ex vivo</i> WHM.....	119
4.2. Anmerkungen zum Einfluss von Medium, Keratinozyten-Ursprung und Negativkontrollen auf die Ergebnisse.....	122
4.2.1. Einfluss des Mediums	122
4.2.2. Einfluss des Spenders	125
4.2.3. Einfluss der Behandlung mit den Negativ-Kontroll-siRNAs.....	125
4.2.4. Vergleich der Effekte der für den KD der verschiedenen Proteine eingesetzten siRNAs	126
5. Zusammenfassung.....	128
Kurzfassung // Summary	130
Veröffentlichungen	132
Abbildungsverzeichnis.....	133
Tabellenverzeichnis.....	135

Anhang.....	136
Literaturverzeichnis	137
Danksagung	164
Eidesstattliche Versicherung	165

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

%	Prozent
≈	ist ungefähr gleich
<	kleiner als
>	größer als
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
&	und
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
AP-1	<i>activator protein 1</i>
aPKC	atypische Proteinkinase C
AS	AllStars Negative Control
ASH1	<i>asymmetric synthesis of HO</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion
Cldn-1	Claudin-1
cm	Zentimeter
CRB(3)	<i>crumbs protein homolog (3)</i>
C-terminal	carboxy-terminal

d. h.	das heißt
DL	DermaLife
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alii (lat.: und andere)
FCS	<i>fetal calf serum</i>
ff.	und die folgenden
FNB	<i>fibronectin binding protein</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
h	Stunde
HO	<i>homothallic switching endonuclease</i>
IF	Immunfluoreszenz
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
K ⁺	Kalium-Ion
KD	Knockdown
kDa	Kilodalton
l	Liter
lat.	Lateinisch
mech.	mechanisch
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MMP	Matrixmetalloprotease

MTOC	<i>microtubule organizing center</i>
N-terminal	amino-terminal
Na ⁺	Natrium-Ion
NB2	<i>Nutrient Broth No. 2</i>
NeKo	Negative Control
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Ocln	Occludin
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
Pals1	<i>protein associated with Lin-7 1</i>
PAR	<i>protease-activated receptor</i>
PATJ	<i>protein associated to tight junctions</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC γ	Phosphoinositid-Phospholipase γ
Ras	<i>rat sarcoma</i>
rH	relative Luftfeuchtigkeit
Rho	<i>Ras homologue</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.	Stratum
Tab.	Tabelle
TGF- α	<i>transforming growth factor alpha</i>
TJ	<i>tight junction</i>
u. a.	unter anderem
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
v. l. n. r.	von links nach rechts

v. o. n. u.	von oben nach unten
WB	Western Blot
WHM	Wundheilungsmodell
x	mal (multiplizieren)
ZONAB	<i>ZO-1 associated nucleic acid-binding</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1. Die Haut

Die Haut, das größte Organ des Menschen, übt eine Vielzahl von Funktionen aus, zu denen neben der Sinneswahrnehmung und einem geringen, aber wichtigen Beitrag zum Stoffwechsel vor allem die Schutz- und Abgrenzungsfunktion gehören. Verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Spezialisierungen, organisiert in einer grob dreischichtigen Struktur (siehe Abb. 1.1 **A**), sind daran beteiligt, diese Aufgaben zu erfüllen. Die unterste Schicht, die Subcutis, ist aufgrund der hier zahlreich vorhandenen Adipozyten bedeutend für den Wärmehaushalt und schützt außerdem die inneren Organe vor Verletzungen. Ebenso liegen hier die sogenannten Vater-Pacini-Körperchen, bei denen es sich um schnell adaptierende Mechanorezeptoren handelt. Je nach Körperregion und in Abhängigkeit vom Ernährungsstatus ist die Subcutis mehr oder weniger stark ausgeprägt.

Die dem subkutanen Fettgewebe aufgelagerte Dermis dient der Verankerung und Versorgung der äußersten Grenzschicht der Haut, der Epidermis, weswegen sie von vielen Blut- und Lymphgefäßen durchzogen ist (Jung, 1995), die außerdem zur Thermoregulation genutzt werden können. Die dermale Matrix wird von den Fibroblasten bereitgestellt, welche den Hauptanteil der Zellen in der Dermis stellen. Zudem liegen hier die Talg- und Schweißdrüsen sowie weitere Rezeptoren, beispielsweise die freien Nervenendigungen zur Aufnahme mechanischer sowie thermaler Reize.

Als direkte Barriere zur Umwelt fungiert die Epidermis, die hauptsächlich durch Keratinozyten aufgebaut wird. Diese Zellen werden im untersten Bereich der Epidermis, dem *Stratum basale* (Basalschicht), ständig nachgebildet und beginnen dann einen Differenzierungsprozess, in dessen Verlauf sie sich durch die verschiedenen Schichten der Epidermis (siehe Abb. 1.1 **B**) bewegen, um schließlich als abgestorbene Korneozyten das *Stratum corneum* (Hornschicht) zu bilden und dort letztlich abgeschilfert zu werden. Auf dem Weg dorthin werden durch die verschiedenen Differenzierungsstufen der Keratinozyten die unterschiedlichen Schichten der Epidermis geprägt. Das *Stratum basale* ist das Stammzellreservoir der Epidermis und versorgt diese mit immer neuen Keratinozyten. Diese werden dann durch nachfolgende neugebildete Zellen hinauf in das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) geschoben; hier beginnen die Zellen bereits mit der Synthese der Vorstufen epidermaler Lipide. Als nächstes folgt der Übergang in das *Stratum granulosum* (Granularzellschicht), in dem die Keratinozyten u. a. *tight junctions* (TJs)

ausbilden, wichtige Zell-Zell-Verbindungen für die Etablierung einer parazellulären Barriere. Im Übergang zum *Stratum corneum* flachen die Keratinozyten ab und unterlaufen einem massiven, geordneten Umbau, sodass im *Stratum corneum* schließlich die toten, von einer Hornhülle umgebenen und in eine lipidreiche Matrix eingebetteten Korneozyten der Umwelt als physikalische Barriere gegenüberstehen. Neben den Keratinozyten kommen in der Epidermis außerdem die Melanozyten vor, die durch Synthese des Farbstoffs Melanin die Hautfärbung bestimmen und dem Schutz vor UV-Strahlen dienen. Desweiteren finden sich die neuroendokrinen Merkelzellen, die u. a. als langsam adaptierende Mechanorezeptoren fungieren, sowie die dem Immunsystem angehörenden Langerhanszellen.

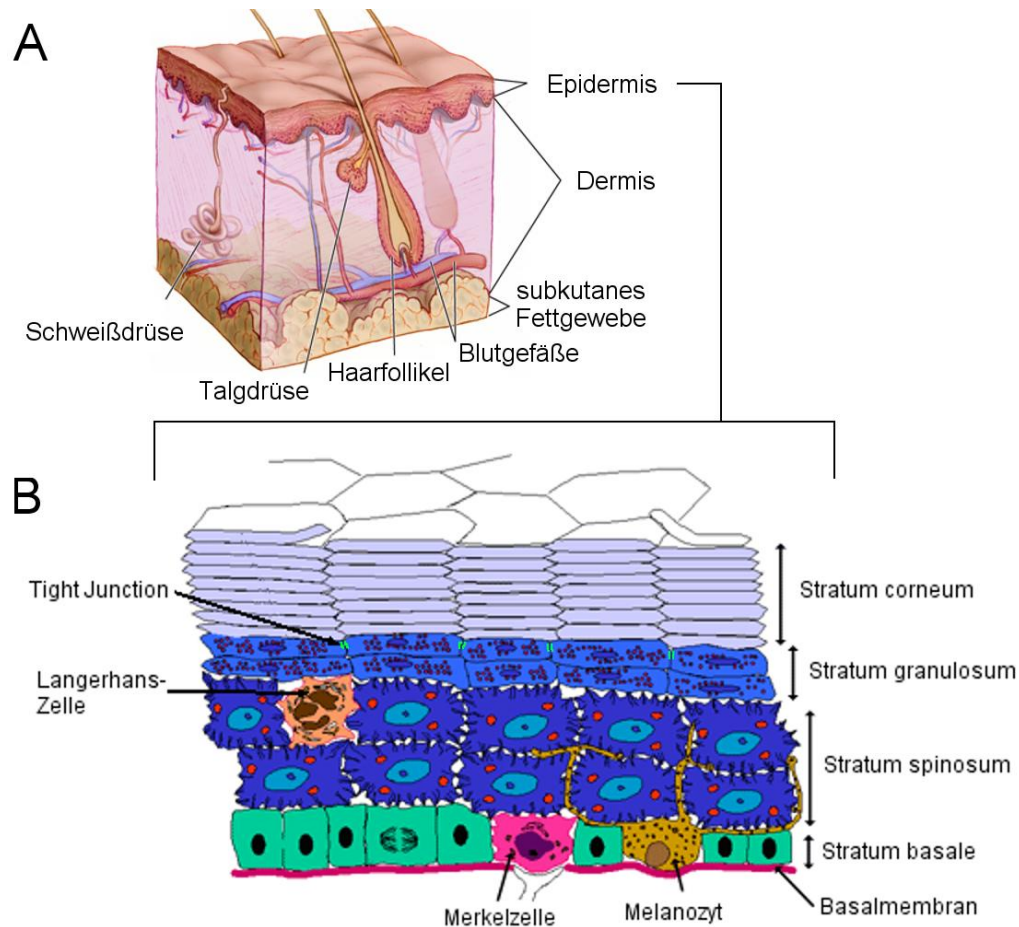


Abb. 1.1 schematischer Querschnitt der Haut

(A) Querschnitt durch die Haut (modifiziert nach einem Original (ID: 4604) von Don Bliss, erstellt 2010 für das National Cancer Institute, Public Domain); (B) Übersicht zur Gliederung der Epidermis in die vier Schichten *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* mit TJs im *Stratum granulosum* (modifiziert mit Erlaubnis von (Peckham et al., 2003)).

1.2. Ablauf der kutanen Wundheilung

In die Heilung kutaner Wunden sind eine Vielzahl von Zellen sowie zahlreiche molekulare Faktoren einbezogen (Singer & Clark, 1999), die in einem dreiphasigen

Prozess miteinander interagieren, um die differenzierte Struktur der Haut soweit wie möglich wieder herzustellen. Den Anfang markiert die Inflammationsphase, gefolgt von der Regenerations- und schließlich der Remodellierungsphase, wobei die einzelnen Phasen fließend ineinander übergehen (Gurtner et al, 2008).

1.2.1. Inflammationsphase

Direkt nach erfolgter Verletzung kommt es, sofern Blutgefäße verletzt wurden, zu einer Aggregation von Thrombozyten, desweiteren startet die Gerinnungskaskade, sodass schließlich ein dichtes Netzwerk aus Fibrin mit eingelagerten Thrombozyten und Erythrozyten entsteht, welches die Wunde provisorisch verschließt (siehe Abb. 1.2 A). Zusätzlich fördern diverse freigesetzte Mediatoren den Eintritt von Immunzellen aus den Blutgefäßen in die Wunde (Grose & Werner, 2004). Neutrophile Granulozyten säubern die Wunde durch den Abbau zellulärer Überreste sowie eventuell eingedrungener Pathogene, wobei sie unterstützt werden durch ebenfalls einwandernde Monozyten, die zu Makrophagen differenzieren. Neben der Reinigung der Wunde setzen die eingewanderten Immunzellen Wachstumsfaktoren und Zytokine frei, um die Wundheilung durch Fibroblasten und Keratinozyten zu stimulieren (Martin, 1997; Phillips, 2000).

1.2.2. Regenerationsphase

Für die Versorgung des neu aufzubauenden Gewebes ist die Bildung neuer Blutgefäße, die sogenannte Neovaskularisierung, notwendig und bildet damit einen wichtigen Teil der Regenerations- bzw. Granulationsphase (siehe Abb. 1.2 B). Desweiteren wird in der Regenerationsphase die Erneuerung des dermalen Gewebes induziert. Die von den Neutrophilen und Makrophagen freigesetzten Wachstumsfaktoren stimulieren die Einwanderung der an den Wundrand grenzenden Fibroblasten, die das in der Wunde vorhandene Fibrinnetzwerk als Orientierung nutzen, es auf ihrem Weg in die Wunde aber gleichzeitig abbauen und durch ein ungeordnetes Netzwerk aus kollagenen Fasern ersetzen. Die eingewanderten Fibroblasten führen zudem eine Kontraktion der Wunde herbei, was die zu regenerierende Fläche verkleinert und somit die Wundheilung beschleunigt (Ryan et al., 1974), wobei dieser Mechanismus für humane Wunden, bis auf einige Ausnahmen, nur eine begrenzte Rolle zu spielen scheint (Ehrlich & Hunt, 2012). Ob für diesen Vorgang eine Differenzierung zu Myofibroblasten erforderlich ist oder auch Proto-

Myofibroblasten eine Verkleinerung der Wundfläche bewirken können, wird aktuell noch diskutiert (Rittié, 2016).

Ebenfalls ausgehend von den Wundrändern, u. a. stimuliert durch den *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor- α* (TGF- α) und *keratinocyte growth factor* (KGF) starten auch die Keratinozyten die Einwanderung in die Wunde. Sofern im Wundareal Haarfollikel verortet sind, beteiligen sich deren multipotente Stammzellen ebenfalls am Heilungsprozess (Taylor et al., 2000; Ito et al., 2005), alternativ erfolgt die Ausbildung der neuen Epidermis nur vom Wundrand aus, wobei neben der Migration auch die Proliferation der Zellen ihren Teil zum raschen Verschluss der Wunde beiträgt (Martin, 1997). Jahrzehntelange Diskussionen um den genauen Mechanismus der Migration mehrschichtiger Epithelien wurden lange Zeit von zwei Modellen geprägt, dem *leap-frog-* bzw. *rolling-*Mechanismus (Krawczyk, 1971) sowie dem *tractor-tread* bzw. *sliding-*Mechanismus (Buck, 1979). Das *rolling-*Modell sieht vor, dass die suprabasalen Zellen für die Reepithelialisierung verantwortlich sind und sich in einer lawinenartigen Bewegung, bei der sich die vordersten Zellen am Wundboden absetzen und von den nachfolgenden Zellen überrollt werden, in die freie Wundfläche schieben. Im Gegensatz dazu steht die Annahme des *sliding-*Modells, wonach die basalen Zellen am Wundrand aktiv in die Wunde einwandern und die suprabasalen Epithelschichten mit sich ziehen. Vor rund 10 Jahren wurden dann, nach Untersuchungen der Expressionsmuster verschiedener Keratine in humanen *in vivo* Hautwunden, beide Vorstellungen in einem dritten Modell vereint (Usui et al., 2005), wobei den suprabasalen Zellen die gewichtigere Rolle zugesprochen wurde. Allerdings war bereits zuvor in einer Studie an *in vivo* Maus-Cornea-Wunden gezeigt worden, dass die Zellen der *leading edge*, dem vordersten Bereich der regenerierenden Epidermis, nicht dauerhaft in dieser verbleiben, was somit den Vorstellungen des *sliding-*Modells widersprach. Im Gegensatz zu den Erwartungen aus dem alternativen *rolling-*Modell wurden die ehemals führenden Zellen allerdings auch nicht im basalen, sondern im apikalen Bereich des regenerierten Epithels gefunden (Danjo & Gipson, 2002). Aufgrund der auf nur einen Zeitpunkt beschränkten Analyse wurden von den Autoren keine Spekulationen zum genauen Ablauf der Bewegung der Zellen angestellt. Trotzdem lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass zumindest im cornealen Epithel und möglicherweise auch in anderen mehrschichtigen Epithelien wie beispielsweise der Epidermis die Zellen in einer Art die Reepithelialisierung von Wunden vollziehen, die weder dem *rolling-*, noch dem *sliding-*Modell entspricht, da sich die Beobachtungen von Danjo und Gipson mit keinem der beiden Modelle erklären lassen. Das wenige Jahre später von Usui vorgeschlagene Modell (Usui et al., 2005) ignorierte die Ergebnisse von Danjo und Gipson und liefert auch keine Erklärung für

deren Beobachtungen. Eine Bestätigung und Erläuterung dieser Beobachtungen erfolgte erst kürzlich durch von Computersimulationen begleitete Experimente an epidermalen Vollhautmodellen. Diese Versuche zeigten, dass tatsächlich die basalen Zellen der Epidermis in die Wunde einwandern und dabei die jeweils vorderste Zelle zum Aufbau einer schützenden Deckschicht nach oben geschoben wird. Im Modell genügte dabei bereits der Druck der durch Proliferation neu entstandenen Zellen, um den Vorschub des regenerierenden Epithels zu gewährleisten (Safferling et al., 2013), was eine aktive Migration der basalen Keratinozyten allerdings nicht ausschließt.

Ein wichtiger Faktor für den Verlauf der Reepithelialisierung ist zudem die Feuchtigkeit im Wundareal. In Abhängigkeit von der über bzw. auf der Wundoberfläche herrschenden Feuchtigkeit kann die Wundzunge auch in die Dermis bzw. das, wie zuvor beschrieben, frisch gebildete Granulationsgewebe einwandern bis zu einer Tiefe, in der die Keratinozyten ein physiologisch feuchtes Umfeld vorfinden und dann auf dieser Ebene, unterhalb der ursprünglichen Lage der Epidermis, die Wundfläche verschließen (Winter & Scales, 1963). Um diese Verzögerung der Wundheilung zu vermeiden und den migrierenden Keratinozyten optimale Bedingungen zu gewähren, wird in der Wundtherapie zumeist das Konzept der feuchten Wundheilung verfolgt, wobei z. B. hydrokolloide Wundauflagen zur Anwendung kommen.

Neben dem Vorschub der neugebildeten Epidermis wird durch die am Wundrand und in der Wundzunge ablaufende Proliferation auch der Aufbau der regulären Zellschichten vorangetrieben. Nachdem die Wundzungen der gegenüberliegenden Wundränder sich getroffen haben und somit die Wunde vollständig bedeckt ist, stoppt die Migration der Keratinozyten durch Kontaktinhibition. Durch weitere Proliferation und die reguläre Differenzierung der Keratinozyten wird schließlich wieder der strukturelle und funktionelle Normzustand der Epidermis erreicht. Die Neubildung eventuell durch die Verwundung verlorener Epidermisanhänge wie Schweißdrüsen und Haarfollikel scheint bei Säugetieren im Allgemeinen nicht möglich zu sein, allerdings wurden bereits Mitte des letzten Jahrhunderts Ausnahmen in Ratten (Dann et al., 1941), Kaninchen (Breedis, 1954) und auch humaner Haut berichtet (Kligman & Strauss, 1956). Nach einigen Jahrzehnten der Nichtbeachtung begann in diesem Jahrhundert erneut eine Untersuchung des Phänomens, zunächst beschränkt auf Tierversuche (Ito et al., 2007).

1.2.3. Remodellierungsphase

In der Remodellierungsphase (siehe Abb. 1.2 **C**) verlassen die Immunzellen und Myofibroblasten das Wundareal oder gehen in die Apoptose. Die nun folgende, je nach

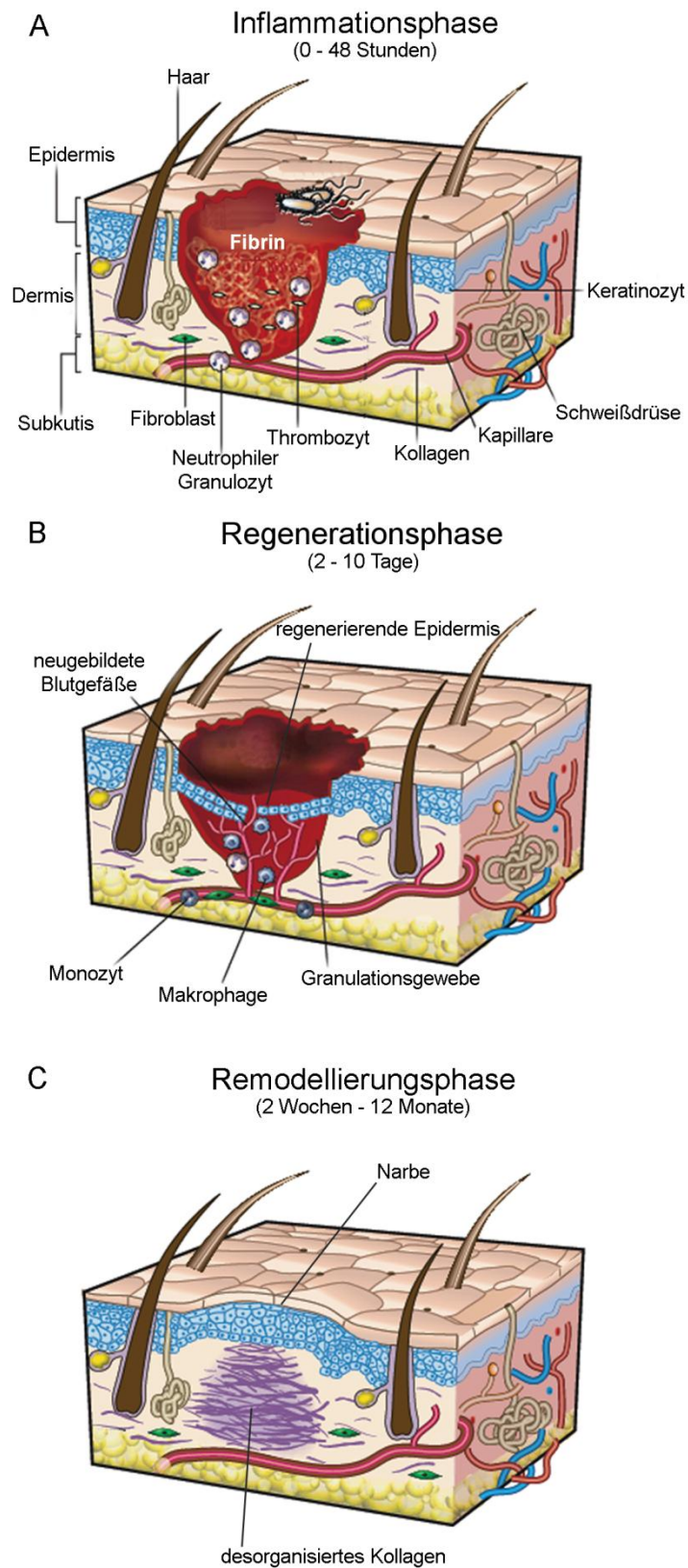


Abb. 1.2 Ablauf der kutanen Wundheilung

Übersicht der drei teilweise überlappend ablaufenden Phasen der Wundheilung (modifiziert mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd.: Nature (Gurtner et al., 2008)).

ursprünglicher Wundgröße bis zu mehreren Jahren dauernde Remodellierung des Gewebes erfolgt durch Matrixmetalloproteasen (MMP), welche die von den Fibroblasten im Wundbereich abgelagerten kollagenen Fasern vom Typ III zu Fasern des Typ I umwandeln und damit die Zugfestigkeit des neu gebildeten Gewebes erhöhen. Freigesetzt werden die MMPs von Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen im Wundareal (Gurtner et al., 2008).

1.3. Tight Junctions

1.3.1. Tight Junctions und Tight Junction-Proteine

Tight Junctions (TJs) sind Zell-Zell-Verbindungen, die in einem fortlaufenden Netzwerk, gleich einem Gürtel, in den Membranen benachbarter Zellen vorkommen und eine selektive Barriere für den parazellulären Transport von Ionen und Molekülen bilden (Anderson, 2001). Ermöglicht wird dies durch die extreme Annäherung der beiden benachbarten Membranen im Bereich der TJs, welche daher auch als *kissing points* bezeichnet werden. Durch diese durchgängige Unterteilung der Zellmembran in einen apikalen und einen basolateralen Teil ermöglichen die TJs den Zellen zudem die Ausbildung einer Polarität, wobei sie quasi wie ein Zaun als Grenzstruktur dienen (Schneeberger & Lynch, 2004). Die Vielzahl von Proteinen, die am Aufbau der TJs beteiligt sind (siehe Abb. 1.3), haben zudem oft weitere Funktionen in Bereichen wie Proliferation, Differenzierung und Vesikeltransport (Matter et al., 2005).

Obwohl bereits zuvor TJ-Proteine in der Epidermis nachgewiesen worden waren (Morita et al., 1998; Pummi et al., 2001; Yoshida et al., 2001; Brandner et al., 2002), erfolgte erst 2002 der Nachweis von funktionellen TJs mittels einer Claudin-1-defizienten Maus, die aufgrund eines starkes transepidermalen Wasserverlustes starb (Furuse et al., 2002). Nachfolgende Forschungen belegten schließlich die Existenz von funktionellen TJs auch in der humanen Epidermis (Kirschner et al., 2010). Die TJ-Barriere wurde im Zuge der Untersuchungen in der obersten vitalen Schicht der Epidermis, dem *Stratum granulosum*, lokalisiert, auch wenn einzelne TJ-Proteine durchaus in weiteren epidermalen Schichten nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 1.4).

1.3.1.1. Claudin-1

Als erste für die vorliegende Arbeit wichtige Proteinfamilie im Zusammenhang mit TJs sind die Claudine zu nennen, bei denen es sich um Transmembranproteine handelt.

Entdeckt wurden die ersten beiden Claudine, Claudin-1 und Claudin-2, im Jahr 1998, aktuell sind 27 verschiedene Claudine bekannt (Furuse et al., 1998; Mineta et al., 2011).

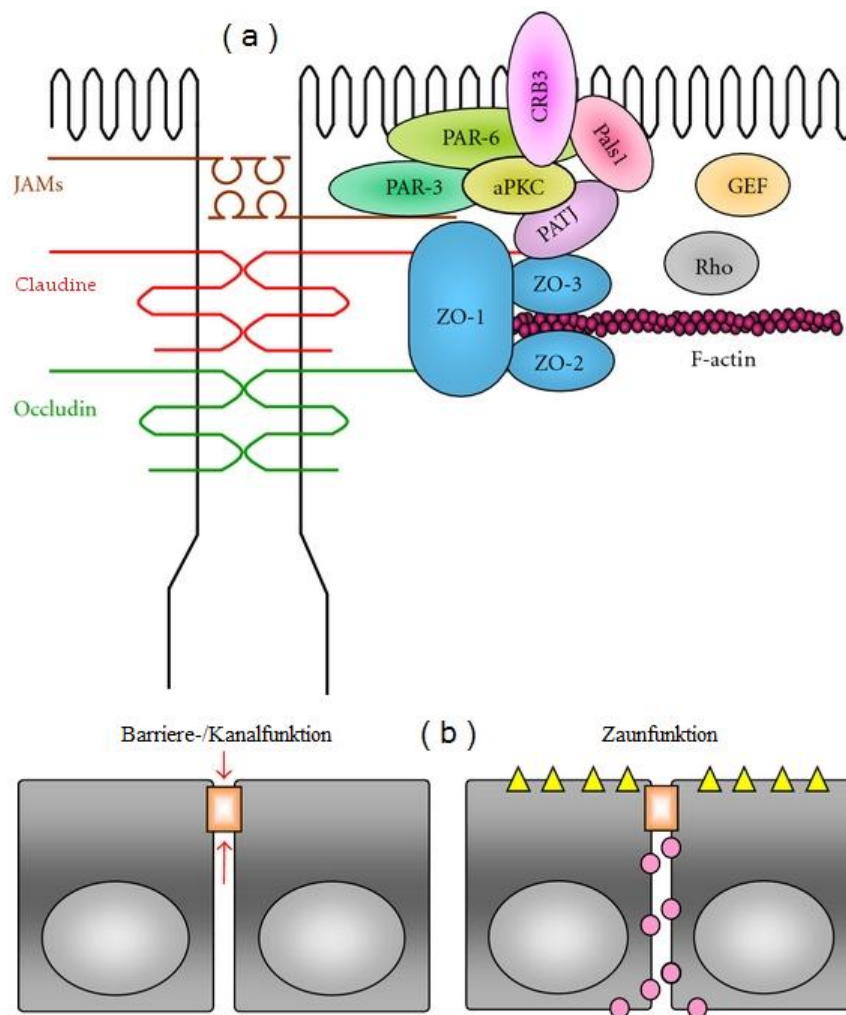


Abb. 1.3 Aufbau und Funktion der TJs

(a) Hauptkomponenten der TJs. (b) Schematische Darstellung der TJ-Funktionen (modifiziert im Rahmen der CC BY 3.0 Lizenz nach (Ichikawa-Tomikawa et al., 2011)).

Der strukturelle Aufbau der Claudine zeichnet sich durch zwei extrazelluläre Loops und insgesamt vier Transmembrandomänen aus. Einem kurzen N-terminalen Ende folgen die zwei extrazellulären Schleifen, von denen die erste größer bzw. länger ist als die zweite, und letztlich das C-terminale Endstück, welches je nach Claudin eine deutlich unterschiedliche Länge hat. Claudine sind wichtige Bausteine der TJs und es wird vermutet, dass der erste extrazelluläre Loop den parazellulären Bereich abdeckt und damit die Ladungsselektivität der TJ-Barriere beeinflusst (Angelow et al., 2008). Daher sind für Claudine vor allem Funktionen bezüglich des *pore-pathway*, dem parazellulären Fluss von Ionen bzw. kleinen geladenen Molekülen, beschrieben worden, wobei zwischen Poren-formenden und abdichtenden Claudinen unterschieden wird

(Lingaraju et al., 2015), auch wenn die genaue Funktionsweise der zweiten Gruppe aktuell noch nicht geklärt ist. Die Regulation des alternativen *leak-pathway*, also dem parazellulären Fluss von Makromolekülen, wird derzeit vor allem zwei anderen TJ-Proteinen, Occludin und ZO-1, zugeschrieben. Eine Beteiligung von Claudinen ist allerdings nicht auszuschließen (Lingaraju et al., 2015).

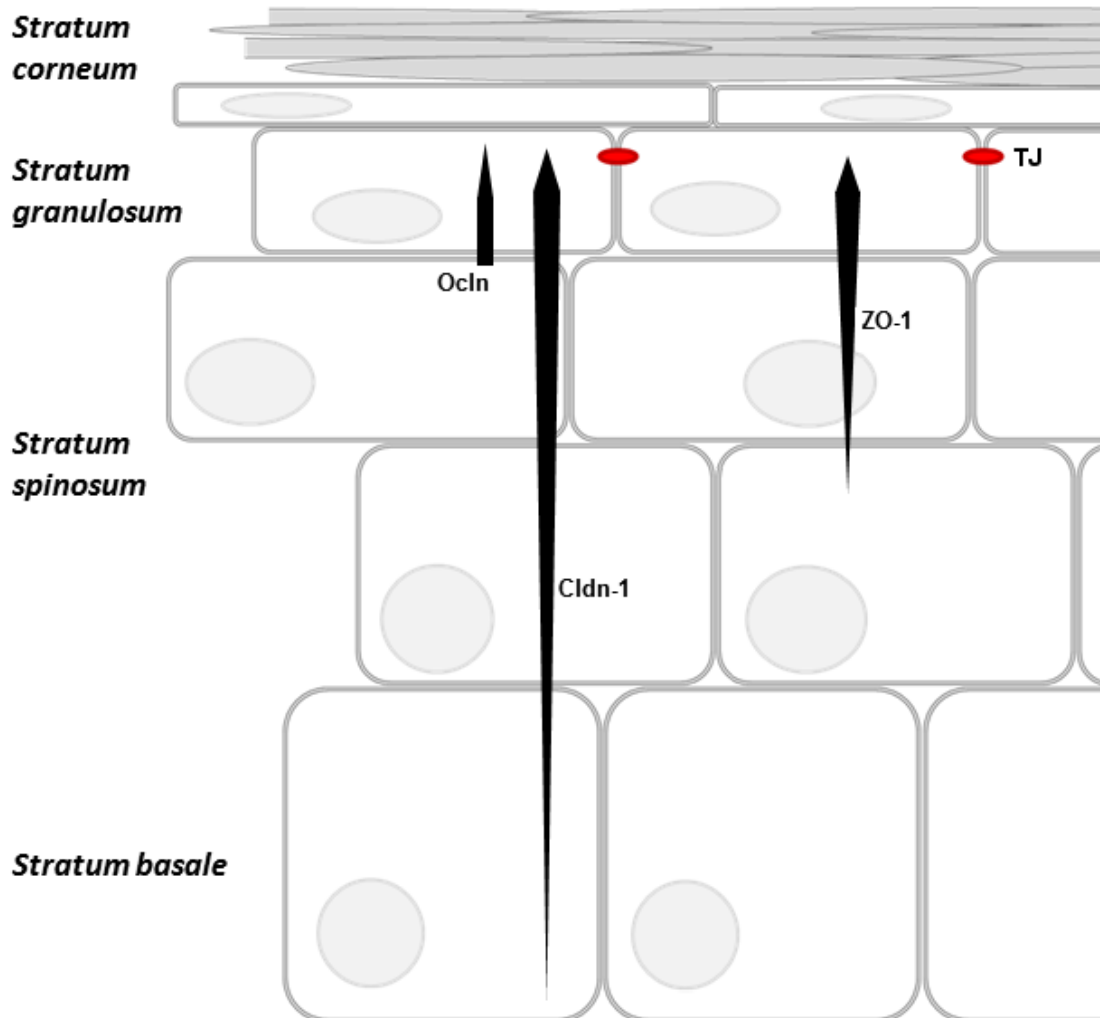


Abb. 1.4 Verteilung der TJ-Proteine in der Epidermis

Schematischer Schnitt durch die vier Schichten der Epidermis. Die Lokalisation der TJ-Proteine Occludin (Ocln), Claudin-1 (Cldn-1) und ZO-1 ist durch den jeweiligen vertikalen Pfeil gekennzeichnet, die TJs sind durch rote Ellipsen im *Stratum granulosum* symbolisiert (modifiziert mit Erlaubnis nach (Bäsler & Brandner, 2016)).

Die zweite extrazelluläre Schleife ist für cis- und trans-Interaktionen zwischen Claudinen verantwortlich (Krause et al., 2015), wobei trans-Interaktionen zwischen verschiedenen Claudinen deutlich seltener zu sein scheinen als cis-Interaktionen (Van Itallie & Anderson, 2013). Zudem scheint für trans-Interaktionen auch die erste extrazelluläre Schleife eine wichtige Funktion zu haben. Darüber hinaus dient die zweite extrazelluläre Schleife einiger Claudine als Rezeptor für das *Clostridium*

perfringens Enterotoxin (CPE), welches zytotoxisch wirkt und die gastrointestinalen Symptome einer *C. perfringens*-vermittelten Lebensmittelvergiftung verursacht (Krause et al., 2015).

Das C-terminale Ende enthält ein PDZ-bindendes Motiv, wodurch eine direkte Interaktion unter anderem mit den drei ZO-Proteinen ermöglicht wird. Über diese Interaktion wird wiederum eine indirekte Verbindung zum Aktinzytoskelett realisiert, wodurch Claudine in den TJs stabilisiert werden können. Darüber hinaus enthält der C-terminale Endteil mehrere Phosphorylierungsstellen und ist auch Ziel einer möglichen Palmitoylierung. Über diese posttranslationalen Modifikationen kann die Funktion und Lokalisation des Claudins reguliert werden (Lal-Nag & Morin, 2009, Günzel & Yu, 2013). Das Trafficking zur Membran scheint zumindest bei einigen Claudinen allerdings nicht von der PDZ-Domäne oder der Möglichkeit zur Palmitoylierung abhängig zu sein (Günzel & Yu, 2013).

In der Epidermis verteilen sich die verschiedenen Claudine unterschiedlich über die drei vitalen Schichten, wobei beispielsweise Claudin-4 auf das *Stratum granulosum* beschränkt ist (Morita et al., 2004), während Claudin-1, wenn auch basal in geringerer Dichte bzw. Häufigkeit, in allen drei Schichten nachgewiesen wurde (Brandner, 2009). Bezogen auf die intrazelluläre Lokalisation sind Claudine überwiegend in der lateralen Membran, und dort vor allem im TJ-Komplex verortet (Günzel & Yu, 2013). Es gibt allerdings auch Fälle, in denen Claudine in der Zellmembran, aber außerhalb der TJs gefunden wurden. Claudin-2 zum Beispiel fungiert während der Leber-Metastasierung von Brustkrebszellen als Adhäsionsmolekül für die Interaktion zwischen Tumor- und Leberzellen (Tabariès et al., 2012). Auch Interaktionen mit anderen Oberflächenrezeptoren wie Tetraspaninen, Integrinen und sogar dem T-Zell-Rezeptor wurden bereits nachgewiesen (Günzel & Yu, 2013), was beispielsweise beim Eindringen des Hepatitis-C-Virus (Harris et al., 2010) oder für die Progression von kolorektalem Krebs (Kuhn et al., 2007) eine Rolle spielt. In verschiedenen Krebszellen wurde zudem eine cytoplasmatische und teilweise sogar nukleäre Lokalisation für Claudin-1, 2, 3 und 4 beobachtet (French et al., 2009; Jian et al., 2015; Blanchard et al., 2013; Ikari et al., 2014; Rangel et al., 2003), allerdings wird auch in gesunder Haut Claudin-1 zum Teil cytoplasmatisch gefunden (Rachow et al., 2013).

1.3.1.2. Occludin

Das in dieser Arbeit ebenfalls genauer untersuchte TJ-Protein Occludin wurde 1993 zum ersten Mal beschrieben und gehört, wie auch die Claudine, zu den Transmembranproteinen (Furuse et al., 1993). In gesunder Haut ist es ausschließlich

im *Stratum granulosum* lokalisiert (siehe Abb. 1.4), kann aber bei verschiedenen Erkrankungen zum Teil auch in tieferen Schichten gefunden werden (Rachow et al., 2013). Vier Transmembrandomänen verankern das Protein in der Zellmembran, das lange C-terminale und das kurze N-terminale Ende liegen beide intrazellulär. Zu beachten ist, dass der C-Terminus trotz seiner Lage im Cytoplasma an der Regulation der Zaun- und Barrierefunktion beteiligt zu sein scheint (Balda et al., 1996; Chen et al., 1997; Nusrat et al., 2000). Über die Vermittlung der Interaktion mit ZO-1 wird zudem der Transport zur Membran gewährleistet (Cummins, 2012), wobei für die Integration in TJs auch die Phosphorylierung des Proteins eine Rolle zu spielen scheint (Wong, 1997). Occludin hat darüber hinaus offenbar selbst die Aufgabe, das TJ-Protein Tricellulin aus normalen, bizellulären TJs herauszuhalten und dessen Lokalisation somit auf trizelluläre TJs zu beschränken (Ikenouchi et al., 2008). Zu den wichtigen Aufgaben, die Occludin erfüllt, gehört weiterhin die Beteiligung an der Barrierefunktion der TJs sowie die Stabilisierung eben dieser (Cummins, 2012). Dabei scheint Occludin sowohl an der Regulation des *leak-pathway* beteiligt zu sein (Wachtel et al., 1999; Murakami et al., 2009; Buschmann et al., 2013), als auch im *pore-pathway* eine Aufgabe zu haben (Murakami et al., 2009; Dörfel et al., 2013). Wie eine Studie mit Occludin Knockout-Mäusen zeigte, hat Occludin aber auch darüber hinaus verschiedenste Funktionen. Bei Geburt noch phänotypisch unauffällig, zeigte sich postnatal ein signifikant verzögertes Wachstum. Die TJs schienen weder morphologisch noch funktionell, getestet im intestinalen Epithel über Impedanzmessung, beeinträchtigt zu sein, und dennoch manifestierte sich eine chronische Magenschleimhautentzündung mit nachfolgender Hyperplasie des Magenepithels, eine fortschreitende Ablagerung von Mineralien im Gehirn sowie Abnormalitäten im Hoden, der Speicheldrüse und den Knochen. Zudem stillten weibliche Occludin-Knockout-Mäuse ihre Nachkommen nicht, während männliche Tiere keine Nachkommen zeugen konnten (Saitou et al., 2000). Da die Untersuchung von Urin- und Blutproben keine Auffälligkeiten zeigte und somit zumindest in einigen Geweben erneut auf funktionelle TJs hindeutet, sind für die beobachteten Effekte Funktionen von Occludin im intrazellulären Signalling spekuliert worden (Saitou et al., 2000). In Mausepithelzellen wurde Occludin als notwendiges Signalmolekül für die Vermittlung einer durch Störung von Claudin-Claudin-Interaktionen induzierten Apoptose ermittelt (Beeman et al., 2012), und ebenso konnte in Leberzellen von Mäusen ein Einfluss auf die Signalisierung von Apoptose nachgewiesen werden (Murata et al., 2005). In Nierenzellen von Hunden wurde des Weiteren gezeigt, dass Occludin im Cytoplasma an das Centrosom binden und darüber Einfluss auf die Zellteilung nehmen kann (Runkle et al., 2011). Bei der Untersuchung von humanen

Gewebeproben aus primären Brusttumoren zeigte sich die Metastasierung in Knochen korreliert mit einer niedrigeren Occludin-Expression, und der Knockdown (KD) von Occludin führte zu einer reduzierten Adhäsion der Zellen an ein humanes Knochenmatrix-Extrakt bei gleichzeitig verringertem Wachstum auf diesem Substrat (Martin et al., 2016). Und auch in humanen Keratinozyten konnte zwischenzeitlich gezeigt werden, dass Occludin auch Funktionen in der Zell-Zell-Adhäsion, Differenzierung und Apoptose-Induktion hat (Rachow et al., 2013), also außerhalb der klassischen TJ-Barriere.

1.3.1.3. ZO-1

Als drittes Protein, dass im Rahmen der Arbeit untersucht wurde, ist ZO-1 zu nennen, welches erstmals 1986 beschrieben wurde (Stevenson et al., 1986) und zusammen mit ZO-2 und ZO-3 die Gruppe der Zonula Occludens-Proteine bildet. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Plaque- bzw. Gerüstproteine, welche die Transmembranproteine der TJs mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbinden (Fanning et al., 1998) und den Aufbau der TJs regulieren (Fanning und Anderson, 2009). In der Haut ist ZO-1 vor allem im *Stratum granulosum* lokalisiert, lässt sich aber auch regelmäßig im oberen *Stratum spinosum* nachweisen (siehe Abb. 1.4). Charakteristisch für die ZO-Proteine sind die drei N-terminalen PDZ-Domänen, die SH3- sowie die GUK-Domäne, welche die Interaktion mit Occludin und den Claudinen ermöglichen (Anderson, 1996; Schneeberger & Lynch, 2004). Das C-terminale Ende hingegen stellt die Bindung an das Aktinzytoskelett her (Schneeberger & Lynch, 2004). Zumindest ZO-1 und ZO-2 sind daher wichtig für die Zusammenlagerung von Claudinen sowie die Ausbildung von TJ-Strängen und der damit einhergehenden Barrierefunktion (Umeda et al., 2006). ZO-1 interagiert allerdings auch mit dem Transkriptionsfaktor ZONAB, der wiederum unter anderem an die Promotoren für die Rezeptor-Tyrosinkinase erbB-2 sowie die Zellzyklus-Regulatoren p21^{WAF1/CIP1} und p27^{KIP1} bindet, was einen regulatorischen Einfluss von ZO-1 auf die Expression dieser Gene nahelegt (Balda & Matter, 2000). Des Weiteren wurde für mehrere Connexine eine Interaktion mit ZO-1, in einigen Fällen auch mit ZO-2 bzw. ZO-3 (Hervé et al., 2014) vorhergesagt und teilweise nachgewiesen, wobei ZO-1 offenbar zumindest für einige Connexine ein Regulator für die Größe des aufgebauten Gap-Junction-Plaques ist (Thévenin et al., 2013), aber auch in die Regulation der Kanal-Aktivität und den Abbau involviert zu sein scheint (Hervé et al., 2014). Auch in den Aufbau der Adhärenzverbindungen (*adherens junctions*) sind die ZO-1 Proteine involviert (Fanning & Anderson, 2009). Eine Proteomanalyse von „ZO-1-nahen“ Proteinen, d.h. Proteine in direkter Interaktion mit

ZO-1, fand neben den zu erwarteten Zytoskelett- und TJ-Proteinen auch mehrere Proteine, die an verschiedenen Signalwegen beteiligt sind, und stellte darüber hinaus teilweise Unterschiede zwischen den Interaktionspartnern mit dem N- und den C-terminalen Bereich von ZO-1 fest (Van Itallie et al., 2013), wodurch sich in Zukunft weitere Erkenntnisse über Interaktionen und damit eventuell auch Funktionen für ZO-1 ergeben könnten.

1.3.2. TJ-Proteine in der Wundheilung

Nach einer Verletzung der Haut mit Zerstörung bzw. Entfernung eines Teils der Epidermis muss diese, wie zuvor beschrieben, wieder aufgebaut werden (siehe Kapitel 1.2). Dabei ist auch der erneute Aufbau der TJ-Barriere zu bewerkstelligen, was zum Gegenstand einiger Untersuchungen wurde. Dabei zeigte sich zum Teil eine von den bekannten Lokalisationsmustern abweichende Expression der verschiedenen TJ-Proteine (Brandner et al., 2002; Malminen et al., 2003), was möglicherweise auf TJ-unabhängige Funktionen der einzelnen Proteine im Rahmen der Reepithelialisierung hindeutet. Schon in den ersten Untersuchungen konnte eine verbreiterte Expression der TJ-Proteine Occludin und ZO-1 am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis beobachtet werden (Brandner et al., 2002; Malminen et al., 2003). Darauf aufbauend beschäftigte sich Dr. Janina Stephanie Heilmann geb. Lentfer in ihrer Dissertation, die ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Brandner angefertigt wurde, mit der Expression der vier TJ-Proteine Claudin-1 und 4, Occludin und ZO-1 im Verlauf der normalen Wundheilung, wobei Sie für Ihre Untersuchungen porcine WHM benutzte. Für Claudin-1 konnte am Wundrand mit fortschreitender Wundheilung ein zunehmend häufigerer, im Maximum ein Drittel aller Proben betreffender Verlust der Expression in den Keratinozyten des *Stratum granulosum* und des oberen *Stratum spinosum* beobachtet werden, in der regenerierenden Epidermis hingegen zeigte sich im Laufe des Heilungsprozesses in bis zu einem Drittel der Fälle eine komplette Abwesenheit des Proteins. Bei Betrachtung der epidermalen Verteilung von Occludin fiel bereits im Bereich hinter dem Wundrand eine verbreiterte Expression auf, die in einem kleinen Teil der Proben im späteren Verlauf des Wundheilungsprozesses beobachtet werden konnte. Auch am Wundrand zeigte sich vor allem zu diesem späteren Punkt eine gehäufte Verbreiterung der Occludin-Expression in die oberen Schichten des *Stratum spinosum*, und besonders deutlich wurden die Veränderungen in der regenerierenden Epidermis sichtbar, wo während des gesamten Wundheilungsprozesses stets mindestens ein Drittel der Proben eine zum Teil deutlich verbreiterte Lokalisation von Occludin zeigte, was besonders in noch einschichtigen

Abschnitten der regenerierenden Epidermis dazu führte, dass Occludin auch in basalen Zellen exprimiert war. Das TJ-Protein ZO-1 zeigte sich, ähnlich wie Occludin, am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis während der Wundheilung zum Teil stark verbreitert lokalisiert, wobei mit zunehmendem Wundheilungsfortschritt die verbreiterte Lokalisation häufiger und in stärkerem Ausmaß beobachtet wurde. Am Wundrand konnte ZO-1 häufig im *Stratum granulosum* und dem gesamten *Stratum spinosum* nachgewiesen werden, in der regenerierenden Epidermis sogar bis in das *Stratum basale*.

Die frühe und umfassende Expression der TJ-Proteine deutet auf einen schnellen Wiederaufbau der verlorengegangenen TJ-Barriere hin, der die Neoepidermis im Wundgebiet dazu befähigt, auch ohne die erst nach vollständiger Differenzierung der Keratinozyten ausbildbare *Stratum-corneum*-Barriere zum Schutz des Körpers vor Wasserverlust und dem Eindringen von pathogenen Stoffen beizutragen. Darüber hinaus drängen sich durch die vom Normalzustand in unverwundeter Haut abweichende Lokalisation der TJ-Proteine erneut Überlegungen zu TJ-unabhängigen Funktionen dieser Proteine auf. Die direkte Bedeutung von TJ-Verbindungen zwischen Zellen für die Migrationsfähigkeit ist bislang nicht eindeutig geklärt. Einerseits wird argumentiert, dass Zellen ihre Zell-Zell-Kontakte für eine erfolgreiche Migration auflösen müssen (Pastar et al., 2014), andererseits zeigten verschiedene Experimente die Bedeutung von Zell-Zell-Verbindungen für die einheitliche, zielgerichtete Migration eines Zellverbandes (Vedula et al., 2012; Hirashima et al., 2013), wobei auch das Vorhandensein von mindestens Occludin keinen negativen Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit hatte (Hirashima et al., 2013). In einer weiteren Arbeit wurde die Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen im Rahmen der Wundheilung zwar auf TJs und Adherens Junctions eingeschränkt, gleichzeitig aber angemerkt, dass dieser Prozess fein ausbalanciert sein müsse, da sowohl eine fehlende als auch eine übermäßig stark ausgeweitete Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen zu Störungen in der Wundheilung führt (Nunan et al., 2015). Gemäß dem Modell von Safferling und Kollegen (Safferling et al., 2013) für die Migration von Keratinozyten in einem mehrschichtigen Epithel spielt membranständiges Occludin zudem eine wichtige Rolle im Aufbau der suprabasalen Schichten der regenerierenden Epidermis, wobei leider nicht untersucht wurde, ob vollständig ausgebildete TJs für die Erfüllung dieser Funktion nötig sind. Über die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie ZONAB, ASH1 und AP-1 oder auch Signalmolekülen wie GEF-H1/Lfc können TJs zudem auch Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation nehmen (Farkas et al., 2012).

Zu TJ-unabhängigen Funktionen von TJ-Proteinen bezüglich der Wundheilung wurden bereits ebenfalls einige Forschungsergebnisse veröffentlicht. In Monolayern aus Nierenzellen von Menschen und Hunden wurde für Occludin während der Migration im Rahmen eines Scratch-Wundheilungsversuchs eine Lokalisation in der leading edge nachgewiesen, die durch Vermittlung der leading-edge-Lokalisation von aPKC und Par3/PATJ sowie einer Reorientierung des MTOC für eine schnelle *in vitro* Wundheilung verantwortlich war (Du et al., 2010). In einer weiteren Arbeit wurde die Bedeutung von Occludin in der TJ-freien, zur Wundfläche orientierten Zellmembran für die Migrationsgeschwindigkeit von Hunde-Nierenzellen bestätigt (Fletcher et al., 2012), ohne auf eventuelle Mechanismen einzugehen.

Ohne eine Untersuchung des Mechanismus, und daher ohne Aussage zur TJ-Abhängigkeit, zeigten Studien zur Wundheilung der Hornhaut von Ratten eine verlangsamte Heilung bei Induktion eines Typ 2 Diabetes, begleitet mit einer verringerten Expression von Occludin (Huang et al., 2016). Ebenso führte auch der Knockout des Vitamin-D-Rezeptors zu einer beeinträchtigten Wundheilung der Hornhaut, bei gleichzeitig verringerter Expression von Occludin und ZO-1 (Elizondo et al., 2014). Im Gegenzug führte die Behandlung von porzinen intestinalen Epithelzellen mit Butyrat zu einer verbesserten *in vitro* Wundheilung, assoziiert mit einer gesteigerten Expression von Occludin und ZO-1 (Ma et al., 2012). Auch bezüglich der Regulation der Proliferation konnte, wie bereits erwähnt, für Occludin eine Rolle in Nierenzellen von Hunden nachgewiesen werden (Runkle et al., 2011).

Für eine Beteiligung von Claudin-1 an der Regulation der proliferativen Aktivität von Zellen spricht eine Reihe von Arbeiten, wobei für humane bzw. murine Keratinozyten ein positiver Einfluss verminderter Claudin-1 Proteinlevel auf die Proliferation gezeigt wurde (De Benedetto et al., 2011; Gruber et al., 2015). Im Gegensatz dazu konnte in zwei humanen Zelllinien der glatten Atemwegsmuskulatur, einer humanen endometrialen Karzinomzelllinie sowie zwei humanen Magenkrebszelllinien (Fujita et al., 2011; Fortier et al., 2013; Huang et al., 2015) eine umgekehrte Assoziation gefunden werden, d. h. der Knockdown von Claudin-1 führte hier zu verminderter Proliferation. Auch für die Migration von Zellen wurde ein Einfluss von Claudin-1 gefunden. So zeigte sich in einer humanen Lungenadenokarzinom-zelllinie, dass Claudin-1 für die Vermittlung von gut 75 % der durch die Stimulation mit TNF α induzierten Genexpression verantwortlich ist, wofür auch die Expression von Claudin-1 selbst durch TNF α induziert und Claudin-1 vermehrt im Cytoplasma lokalisiert wurde (Shiozaki et al., 2012). Der Knockdown von Claudin-1 führte in diesen Zellen zu einer verlangsamten Scratchwundheilung und negierte darüber hinaus auch den wundheilungsfördernden Effekt von TNF α (Shiozaki et al., 2012). In einer humanen,

endometrialen Karzinomzelllinie zeigte sich für Claudin-1 schließlich sowohl für die Migrationsfähigkeit als auch für die Proliferation der Zellen eine wichtige Rolle, wobei Claudin-1 als mitverantwortlich für die Lokalisation von p-AKT an der TJ-freien *leading edge* gefunden wurde und es auch, über eine Beeinflussung von NF- κ Bp65, an der Regulation der Expression von MMP-2 und MMP-9 beteiligt war (Fortier et al., 2013). Bei der Untersuchung von Keratin-76-Knockout-Mäusen zeigte sich ein ähnliches Krankheitsbild wie bei Claudin-1-Knockout-Mäusen, allerdings in abgeschwächter Form, sodass die Tiere im Median 32 und maximal rund 90 Tage lang überlebten. Einhergehend mit dem Knockout von Keratin 76 ließ sich eine veränderte Lokalisation von Claudin-1 beobachten, die unter anderem mit einer gestörten Barrierefunktion sowie spontaner Wundentstehung begleitet von beeinträchtigter Wundheilung einherging. Weitere Auffälligkeiten waren eine starke Verdickung der interfollikulären Epidermis, die Infiltration von Immunzellen in die Dermis und eine Hyperpigmentierung der Dermis und Epidermis (DiTommaso et al., 2014).

Für Claudin-4 konnte eine Rolle in der Zellmigration im Rahmen eines *in vitro* Wundheilungsversuches von Maus-Brustdrüsenepithelzellen nachgewiesen werden, sofern sich die Zellen auf einer Collagen-Matrix bewegten (Webb et al., 2013), wobei für Claudin-4 extrazelluläre Interaktionen vermutet wurden. In Nierenzellen von Hunden wurde wiederum für Claudin-2 eine Rolle in der Regulation der Migration gefunden, die nach den Erkenntnissen der Autoren über eine Beeinflussung der Expression und Aktivität von MMP-9 erfüllt wird (Ikari et al., 2011). In einer humanen Brustepithelzelllinie konnte für wiederum ein anderes Claudin, Claudin-6, ebenfalls ein Einfluss auf die Migration und Proliferation nachgewiesen werden, wobei zudem ein Zusammenhang mit der Expression und Aktivität von MMP-2 gezeigt wurde (Ren et al., 2013).

Für ZO-1 fand sich, neben dem bereits erwähnten potentiellen Einfluss auf die Proliferation von Zellen über den Transkriptionsfaktor ZONAB, auch eine Rolle in der Migration. In der *leading edge* migrierender humaner Lungenkrebszellen wurde ZO-1 co-lokalisiert mit α 5-Integrin nachgewiesen und über den spezifischen Knockdown eine Bedeutung von ZO-1 sowohl für die Chemotaxis, als auch für die Direktionalität bzw. Persistenz der Migration aufgezeigt (Tuomi et al., 2009). Ebenso führte ein Knockdown von ZO-1 in humanen, alveolären Adenokarzinomzellen sowie dermalen mikrovaskulären Endothelzellen zu einer beeinträchtigten Migration in Scratchwundheilungsversuchen (Lee et al., 2015; Tornavaca et al., 2015).

1.4. Chronische Wunden

Eine chronische Wunde ist definiert als eine Wunde, die im Gegensatz zu einer akuten Wunde keinen zeitlich und ordnungsgemäß korrekten Wundheilungsverlauf erkennen lässt (Lazarus et al., 1994), wobei die zeitlichen Vorgaben oft eher relativ gesehen werden. Vereinzelt finden sich konkrete Angaben, beispielsweise mehr als 6 Wochen für Beinulzera (Cullum et al., 1997), aber auch mehr als 15 Wochen (Jung et al., 2016). In der aktuellen Forschung sind vor allem drei Hauptursachen für chronische Wunden von Bedeutung, nach denen auch die Einteilung der Wunden in eine von drei Kategorien – Druckgeschwüre, diabetische Ulzera bzw. vaskulär bedingte Ulzera – erfolgt. Weitere Faktoren wie beispielsweise altersbedingte Veränderungen auf zellulärer und systemischer Ebene und die bakterielle Besiedlung der Wunde spielen in diesen Wunden ebenfalls eine Rolle (Mustoe, 2004; Eming et al., 2014). Darüber hinaus gibt es allerdings noch weitere, zumindest in westlichen Gesundheitssystemen weniger beachtete Ursachen für chronische Wunden, wie beispielsweise die Infektionskrankheiten Lepra und Leishmaniose sowie immunologische Erkrankungen, z. B. Pyoderma gangraenosum (für weitere Beispiele siehe Panuncialman & Falanga, 2010).

Wie bereits dargelegt ist die Wundheilung ein komplexer, mehrphasiger Vorgang (siehe Kapitel 1.2), und ein klassisches Merkmal chronischer Wunden ist das Verharren in der inflammatorischen Phase der Heilung. Verursacht wird dies unter anderem durch eine fehlregulierte Ausschüttung entzündungsfördernder Cytokine wie beispielsweise TNF α und IL-1 β . In normalen Wunden erreicht die Konzentration dieser Botenstoffe nach 24 Stunden ihren Höchstwert und sinkt im weiteren Verlauf wieder auf das physiologische Grundniveau, um den Übergang in die späteren Phasen der Wundheilung zu ermöglichen. In chronischen Wunden findet sich diese Regulation nicht, sodass die Cytokine durchgängig in hohen Konzentrationen vorliegen, eine überschießende Entzündungsreaktion fördern und somit den Heilungsprozess stören (Tregrove et al., 2000). Neben diesen veränderten Cytokinwerten zeichnen sich chronische Wunden auch durch ein verstärktes Vorkommen von MMPs bei gleichzeitig verringerten Mengen der dazugehörigen Inhibitoren (TIMPs) aus, was zu einer Störung des Aufbaus der extrazellulären Matrix führt (Shah et al., 2012). Folgerichtig zeigte sich beim Vergleich der Wundflüssigkeit von heilenden und nicht-heilenden Wunden, dass letztere im Gegensatz zu normal heilenden Wunden kein nachweisbares Collagen Typ I α 1 und α 2 sowie Typ III α 1 enthielt (Eming et al., 2010). Darüber hinaus wurden in chronischen Wunden auch seneszente Fibroblasten nachgewiesen, deren proliferative Aktivität signifikant eingeschränkt ist (Mendez et al., 1998), und mit

zunehmendem Alter des Ulkus scheint sich dieser Effekt noch zu verstärken (Agren et al., 1999). Wie Untersuchungen zeigten, scheinen bestimmte Bestandteile der Wundflüssigkeit chronischer Ulzera, wie beispielsweise TNF- α , eine Induktion dieser Seneszenz zu bewirken (Mendez et al., 1999). Ebenfalls als typisches Merkmal nicht-heilender Wunden beschrieben ist der hyperproliferative Wundrand, für den eine Fehlregulation verschiedener Zellzyklusregulatoren verantwortlich gemacht wird (Stojadinovic et al., 2008). Außerdem wurden im Wundrand erhöhte Level der Wachstumsfaktoren EGF und TGF- β gefunden (Galkowska et al., 2006), während in den Wunden selbst verschiedene Wachstumsfaktoren wie beispielsweise EGF, PDGF und TGF- β in verringerten Mengen nachgewiesen wurden (Cooper et al., 1994; Barrientos et al., 2008), was im Fall von TGF- β zudem noch von einer Herabregulation der dazugehörigen Rezeptoren in den Keratinozyten begleitet zu sein scheint (Pastar et al., 2010).

Seit mehreren Jahren werden die zunehmende Häufigkeit von chronischen Wunden und die damit verbundenen Kosten thematisiert. Für das englische Gesundheitssystem wurden die jährlichen Ausgaben für den Zeitraum 2005/2006 auf 2,3 bis 3,1 Milliarden Pfund (ca. 3,3 – 4,5 Milliarden Euro) und damit etwa 3 % des Gesamtbudgets geschätzt (Posnett & Franks, 2008), für die Vereinigten Staaten von Amerika wurde ein Jahr später die Zahl von 25 Milliarden US-Dollar (ca. 31,3 Milliarden Euro) veröffentlicht (Sen et al., 2009). Für Deutschland wurden 2008 Gesamtkosten von 8 Milliarden Euro angegeben (Janßen & Becker, 2008), vier Jahre später waren 6 Milliarden Euro im Gespräch (MDI GmbH, 2012). Neben diesen direkten Kosten für die Gesundheitssysteme haben chronische Wunden noch viel weitergehende Auswirkungen auf die Gesellschaft, da sie nicht nur die Lebensqualität der betroffenen Patienten zum Teil deutlich vermindern, sondern auch die Erwerbstätigkeit beeinträchtigt wird. Allein für venöse Ulcera lag die Schätzung bei 2 Millionen verlorenen Arbeitstagen pro Jahr im US-amerikanischen Arbeitsmarkt (Sen et al., 2009). Der fortschreitende demographische Wandel hin zu einer älteren Gesellschaft sowie die steigende Zahl von (morbid) adipösen und/oder an Diabetes erkrankten Menschen lässt zudem eine weitere Zunahme der Patienten mit chronischen Wunden erwarten (Sen et al., 2009).

1.5. Zielsetzung

Wie bereits gezeigt stellen die *tight junctions* einen wichtigen epidermalen Baustein dar, der vor allem durch seine Barrierefunktion von Bedeutung ist. Da verschiedene TJ-Proteine darüber hinaus aber auch in die Proliferation und Differenzierung der

Keratinocyten involviert sind, drängt sich die Frage nach einer möglichen Rolle dieser einzelnen TJ-Proteine in der Wundheilung auf, die möglicherweise auch unabhängig von funktionellen TJ-Strukturen wahrgenommen werden kann. Ein weiterer Anhaltspunkt für eventuelle Funktionen der TJs im Rahmen der epidermalen Wundheilung ergibt sich durch die beobachteten Unterschiede in der Lokalisation der TJ-Proteine im Laufe des regulären Heilungsprozesses porziner *ex vivo* WHM. Mit Hinblick auf die *in vivo* Situation, wo nach aktuellem Wissensstand vor allem basale und somit undifferenzierte Keratinocyten für die Reepithelialisierung verantwortlich sind, wird deutlich, dass hier TJ- und damit auch Barriere-unabhängige Funktionen besonders beachtet werden müssen.

Da die molekularen Pathomechanismen chronischer Wunden in Bezug auf die Keratinocyten noch ungeklärt sind, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Fortführung der Untersuchungen von Dr. Heilmann die Lokalisation der TJ-Proteine Claudin-1, Occludin und ZO-1 in chronischen Wunden untersucht und mit der Situation in akuten, spontan heilenden Wunden verglichen werden. Darüber hinaus sollen die Auswirkungen eines Knockdowns der drei TJ-Proteine auf das Verhalten von Keratinocyten während der Wundheilung anhand von Zellkultur-basierten Experimenten untersucht werden, um ihre individuellen Funktionen zu ergründen. Um den angesprochenen physiologischen Gegebenheiten, also den basalen Keratinocyten der regenerierenden Epidermis, näher zu kommen, werden die *in vitro* Experimente zum allergrößten Teil in einem Milieu mit niedriger Calcium-Konzentration durchgeführt. Dadurch soll eine Differenzierung der Keratinocyten und damit die Ausbildung von TJs unterbunden werden um so die Funktion der TJ-Proteine in diesem speziellen Umfeld zu untersuchen, d. h. außerhalb ihrer klassischen Rolle als Bausteine funktioneller TJs.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Aceton	Geyer Hamburg GmbH (Hamburg, DE)
Acrylamid	Serva (Heidelberg, DE)
Ammoniumsulfat (APS)	Serva (Heidelberg, DE)
Bacitracin	Sigma (Taufkirchen, DE)
β -Mercaptoethanol	Fluka (Taufkirchen, DE)
Bisacrylamid	Serva (Heidelberg, DE)
BSA (bovines Serum Albumin)	Roche (Mannheim, DE)
Calciumchlorid (CaCl_2)	Serva (Heidelberg, DE)
Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Scientific (Schwerte, DE)
Coomassie Brilliant Blau G250	Fluka (Taufkirchen, DE)
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)	Roche (Mannheim, DE)
DermaLife® K	Lifeline Cell Tech (Frederick, USA)
D-Glucose	Sigma (Taufkirchen, DE)
Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma (Taufkirchen, DE)
di-Natriumhydrogenphosphat-di-Hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck (Darmstadt, DE)
DMEM Zellkulturmedium	Biochrom AG (Berlin, DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck (Darmstadt, DE)
EDTA	Biochrom AG (Berlin, DE)
Essigsäure	Riedel-de Haen (Seelze, DE)
Ethanol 99,8 %	Merck (Darmstadt, DE)
Eukitt	Kindler GmbH (Freiburg, DE)
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
Fluoromount G	Southern Biotech (Eching, DE)
Formafix 4%, gepuffert	Grimm med. Logistik GmbH (Torgelow, DE)
Glycerin	Roth (Karlsruhe, DE)
Glycin	Roth (Karlsruhe, DE)
HiPerfect	Qiagen (Hilden, DE)
Hydrocortison	Sigma (Taufkirchen, DE)
Igepal	Sigma (Taufkirchen, DE)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, DE)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt, DE)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck (Darmstadt, DE)
KGM	PromoCell GmbH (Heidelberg, DE)
Kochsalzlösung, isoton	Baxter Deutschland GmbH (Unterschleißheim, DE)
Leupeptin	Sigma (Taufkirchen, DE)

Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe, DE)
Methanol	Mallinckrodt Baker (Deventer, NL)
Mitomycin C	Merck (Darmstadt, DE)
MK-2206	AbMole Bioscience (Kowloon, HK)
Natriumchlorid (NaCl)	Mallinckrodt Baker (Deventer, NL)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt, DE)
Natrium-deoxychelate	Sigma (Taufkirchen, DE)
Nitrocellulosemembran (0,45 µm)	Bio-Rad (München, DE)
PBS, steril	Biochrom AG (Berlin, DE)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG (Berlin, DE)
Pepstatin A	Sigma (Taufkirchen, DE)
Phosphorsäure (88 %)	Riedel-de Haen (Seelze, DE)
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Cell Signaling Technology (Denver, USA)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma (Taufkirchen, DE)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Bio-Rad (München, DE)
Spectra® Multicolor Broad Range	Bio-Rad (München, DE)
TEMED	Fluka (Taufkirchen, DE)
tri-Natriumcitrat C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	Merck (Darmstadt, DE)
tri-Natriumcitrat-Dihydrat C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O	Merck (Darmstadt, DE)
Tris (Trizma Base)	Sigma (Taufkirchen, DE)
Triton X-100	Sigma (Taufkirchen, DE)
Trypsin (2,5 %)	Biochrom AG (Berlin, DE)
Tween	Merck (Darmstadt, DE)
Xylol	Mallinckrodt Baker (Deventer, NL)
Xylolersatz XEM-200	Vogel (Giessen, DE)
Zitronensäure Monohydrat C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O	Merck (Darmstadt, DE)

2.1.2. Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen anti Akt	WB 1:600	Cell Signaling Technology
Kaninchen anti Claudin-1	IF 1:150	Thermo Scientific
Kaninchen anti Occludin	WB 1:1000	Zymed
Kaninchen anti p38	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
Kaninchen anti p-Akt	WB 1:300	Cell Signaling Technology
Kaninchen anti p-ERK 1/2	WB 1:500	Millipore
Kaninchen anti p-p38	WB 1:200	Cell Signaling Technology
Kaninchen anti ZO-1	WB 1:200	Zymed
Maus anti α-Tubulin (#CP06)	WB 1:250	Calbiochem
Maus anti β-Actin (#AC-15)	WB 1:30000	Sigma
Maus anti Claudin-1	WB 1:2000	Thermo Scientific
Maus anti ERK 1/2	WB 1:500	Millipore
Maus anti Ki67 (#M7240)	IF (Zellen) 1:20	Dako

Maus anti ZO-1	WB 1:100	Zymed
Ziege anti Maus Alexa-Fluor 594	IF 1:1250	MoBiTec
F(ab) ₂ (#A11020)		
Ziege anti Maus Alexa-Fluor 488	IF 1:600	MoBiTec
F(ab) ₂ (#A11017)		
Ziege anti Maus HRP	WB 1:5000	Dako
Ziege anti Kaninchen HRP	WB 1:5000	Dako

Als Negativkontrollen für IF-Färbungen wurden Antikörper-Isotypen der Firma Dako (Hamburg, DE) genutzt, die entsprechend der Proteinkonzentration des Primärantikörpers eingesetzt wurden.

2.1.3. siRNA

siRNA	Zielprotein	Hersteller
AllStars Negative Control	keines	Qiagen
Claudin-1 #5	Claudin-1	Qiagen
Claudin-1 #8	Claudin-1	Qiagen
Negative Control	keines	Qiagen
Occludin #7	Occludin	Qiagen
Occludin #11	Occludin	Qiagen
ZO-1 #6	ZO-1	Qiagen
ZO-1 #7	ZO-1	Qiagen

2.1.4. Primer für real-time PCR

Bei allen verwendeten Primern handelte es sich um FAMTM-markierte TaqMan[®]-Sonden von Applied Biosystems.

Ziel-mRNA	Katalognummer
humanes Claudin-1	Hs00221623_m1
humanes GAPDH	Hs02758991_g1
humanes Occludin	Hs00170162_m1
humanes ZO-1	Hs0155186_m1

2.1.5. Medien und Lösungen für Zell- und Gewebekultur

Zellkulturmedium DermaLife, Lagerung bei 4 °C

DermaLife	99 ml - in DermaLife gelöst
Pen/Strep	1 ml

Zellkulturmedium KGM, Lagerung bei 4 °C

KGM	99 ml	- in KGM gelöst
Pen/Strep	1 ml	- für Hoch-Calcium: 124,3 µl CaCl ₂ - Stocklösung (1,4 M) je 100 ml

Kryomedium, frisch angesetzt

Zellkulturmedium	3,5 ml	- in Zellkulturmedium gelöst
FCS	1 ml	
DMSO	0,5 ml	

Keratinocyten-Trypsin, Lagerung bei -20 °C bzw. 4 °C

PBS	94 ml	- in PBS gelöst, aliquotiert und
Trypsin	4 ml	gelagert bei -20 °C
EDTA	2 ml	

Gewebekulturmedium, Lagerung bei 4 °C

DMEM	96,6 ml	- in DMEM gelöst
FCS	2 ml	
Pen/Strep	1 ml	
Hydrocortison	0,4 ml	

MTT-Stammlösung, Lagerung bei 4 °C

MTT	250 mg	- ad 50 ml PBS
-----	--------	----------------

2.1.6. Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie**Protease-Inhibitor-Mix 100x, Lagerung bei -20 °C**

Leupeptin	1 mg	- ad 1 ml A. dest.
Pepstatin A	100 µl	
Bacitracin	10 mg	
PMSF	100 µl	

RIPA-Puffer, Lagerung bei 4 °C

Tris	0,605 g	- ad 100 ml A. dest.
NaCl	0,876 g	
Igepal	1,5 ml	
Na-deoxychelate	0,5 g	
SDS	0,1 g	

Protease-Inhibitor-Puffer, frisch angesetzt

RIPA-Puffer	990 µl
Protease-Inhibitor-Mix	10 µl

Protease-Phosphatase-Inhibitor-Puffer, frisch angesetzt

RIPA-Puffer	980 µl
Protease-Inhibitor-Mix	10 µl
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	10 µl

Acrylamidlösung, Lagerung bei 4 °C

Acrylamid	30 g	- ad 100 ml A. dest.
Bis	0,8 g	

Trenngelpuffer, Lagerung bei 4 °C

Tris	90,825 g	- ad 500 ml A. dest.
SDS	2 g	

Sammelgelpuffer, Lagerung bei 4 °C

Tris	30,3 g	- ad 500 ml A. dest.
SDS	2 g	

SDS-Probenpuffer 2x, Lagerung bei 4 °C

Tris	12 ml	- ad 100 ml A. dest.; zum Schluss
Glycerin	20 g	eine Spatelspitze Bromphenolblau
β-Mercaptoethanol	20 ml	hinzugeben
SDS	10 g	

Gelansatz für 6 Gele	Sammelgel	8 % Trenngel
A. dest.	5,9 ml	14,2 ml
Acrylamidlösung	1,3 ml	8 ml
Sammelgel-Puffer	2,5 ml	
Trenngel-Puffer		7,5 ml
APS (10 %)	300 µl	300 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Färbelösung, Lagerung bei RT

Methanol	400 ml	- ad 1000 ml A. dest., zum Schluss
Essigsäure	50 ml	eine Spatelspitze Coomassie Brilliant Blau G250 hinzugeben

Entfärbelösung, Lagerung bei RT

Methanol	400 ml	- ad 1000 ml A. dest.
Essigsäure	50 ml	

Konservierungslösung, Lagerung bei RT

Essigsäure	75 ml	- ad 1000 ml A. dest.
------------	-------	-----------------------

Laufpuffer 5x, Lagerung bei 4 °C

Glycin	72 g	- ad 1000 ml A. dest.; vor Gebrauch
Tris	15 g	1:5 mit A. dest. verdünnt
SDS	5 g	

Blotpuffer, Lagerung bei 4 °C

Methanol	800 ml	- ad 4000 ml A. dest.
Glycin	57,6 g	
Tris	12,1 g	
SDS	0,8 g	

TBS-T Puffer 10x, Lagerung bei RT

Tris	12,1 g	- ad 1000 ml A. dest.; vor Gebrauch
NaCl	87,66 g	1:10 mit A. dest. verdünnt
Tween	5 g	

RLT Lysis-Puffer, frisch angesetzt, Ansatz für eine 12-Well-Platte

RLT	3960 µl	- unter dem Abzug ansetzen
β-Mercaptoethanol	40 µl	

DNase Verdauung, frisch angesetzt, Ansatz für 12 Proben

RDD	875 µl
DNase I Stammlösung	125 µl

Master-Mix für cDNA-Synthese, frisch angesetzt, Ansatz für 3 µg RNA

Reaction Mix	12 µl
Enzyme Mix	6 µl

Mastermix-Mix für real-time PCR, frisch angesetzt, Einzelansatz

iMaxima™ Master Mix	12,50 µl	- Benötigtes Gesamtvolumen
Nuclease-freies Wasser	9,25 µl	anhand der Zahl der Ansätze berechnen

Primer-Mix für real-time PCR, Frisch angesetzt, Einzelansatz

Mastermix-Mix	21,75 µl	- Benötigtes Gesamtvolumen
TaqMan®-Sonde	1,25 µl	anhand der Zahl der Ansätze berechnen

2.1.7. Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie**PBS, pH 7,3-7,5, Lagerung bei RT (10x Stammlösung)**

NaCl	160 g	- in 2 l A. dest. gelöst
KCl	4 g	- Gebrauchslösung 1:10 mit
Na ₂ HPO ₄	23,2 g	A. dest. verdünnt
KH ₂ PO ₄	4 g	- pH-Wert kontrolliert und falls nötig mit HCl eingestellt

TEC, pH 7,8, Lagerung bei RT (20x Stammlösung)

Tris	5 g	- in 950 ml A. dest. gelöst
EDTA	10 g	- pH-Wert kontrolliert und falls nötig
tri-Natriumcitrat	6,4 g	mit HCl eingestellt - mit A. dest. auf 1 l aufgefüllt

Citrat-Puffer, Stammlsg. A, Lagerung bei RT

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 10,5 g - in 500 ml A. dest. gelöst

Citrat-Puffer, Stammlsg. B, Lagerung bei RT

$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 14,7 g - in 500 ml A. dest. gelöst

Citrat-Puffer, pH 6, Lagerung bei RT (Gebrauchslösung)

Stammlösung A 13,5 ml - beide Stammlösungen gemischt

Stammlösung B 61,5 ml - pH-Wert kontrolliert und falls nötig
mit HCl eingestellt

Tris-HCL, pH 7,4, Lagerung bei RT (0,5 M)

Tris 60,57 g - in 500 ml A. dest. gelöst
- pH-Wert mit 1 N HCl eingestellt
(ca. 400-500 ml)
- mit A. dest. auf 1 l aufgefüllt

Trypsin, Lagerung bei 4 °C max. 14 Tage (Stammlösung)

Tris-HCL 1 ml - Tris-HCL mit 9 ml A. dest.

Tris 10 g verdünnt

$CaCl_2 \cdot H_2O$ 0,013 g - restliche Chemikalien vollständig
gelöst

Trypsin, frisch angesetzt (Gebrauchslösung)

Tris-HCL 1 ml - Tris-HCL mit 9 ml A. dest.

Trypsin-Stammlösung 100 µl verdünnt
- 100 µl aus der Lösung entfernt
und mit 100 µl Trypsin-Stammlsg.
ersetzt

Triton, Lagerung bei RT (Stammlösung)

Triton X-100 1 g - in 99 ml PBS-Puffer gelöst

Triton, frisch angesetzt (Gebrauchslösung)

Triton-Stammlösung. 1 ml - in 9 ml PBS-Puffer gelöst

DAPI, Lagerung bei -25 °C (Stammlösung)

DAPI 5 mg - in 1 ml A. dest. gelöst
- Lagerung in 40 µl Aliquots; für
DAPI-Färbebad einen Aliquot in
200 ml PBS gelöst

Magermilchlösung, frisch angesetzt (2 bzw. 5 %)

Magermilchpulver 0,2 bzw. 0,5 g - in 10 ml PBS gelöst

2.1.8. Gewebe

2.1.8.1. Porzine *ex vivo* Wundheilungsmodelle

Das Gewebe für die porzinen WHM (Patentnummer DE10317400), bereitgestellt von einer lokalen Schlachtereier, stammte von ca. 6 Monate alten Hausschweinen (*Sus scrofa domestica*, Kreuzung zwischen Yorkshireschwein und deutschem Edelschwein).

2.1.8.2. Humane *ex vivo* Wundheilungsmodelle

Das Gewebe für die humanen *ex vivo* WHM stammte von Patienten, die einer Operation im Bereich der plastischen Chirurgie unterzogen wurden. Die Verwendung der Gewebeprobe erfolgte mit Zustimmung des Ethik-Komitees der Ärztekammer Hamburg (WF-028/12).

2.1.8.3. Humane akute Wunden

Die Proben von akuten humanen Wunden, die als Stanzbiopsie mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Tiefe von 5 mm auf dem unteren Rücken gesetzt wurden, stammten von freiwilligen, gesunden Spendern mit einem durchschnittlichen Alter von 56 Jahren und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Eming bereitgestellt (Buchstein et al., 2009).

2.1.8.4. Humane chronische Wunden

Die Proben von chronischen humanen Wunden stammten von den Wundrändern chronischer Bein-Ulzera Gefäß-bedingten (venöse und arterielle Ulzera, n = 9) und diabetischen (n = 4) Ursprungs. Die Proben der Patienten (4 männlich, 9 weiblich; 35-

83 Jahre alt) wurden verwendet, nachdem die notwendigen diagnostischen Untersuchungen abgeschlossen worden waren. Die Verwendung der Gewebeproben erfolgte mit Zustimmung des Ethik-Komitees der Ärztekammer Hamburg (OB-15/04).

2.1.8.5. Humane Keratinozyten

Zur Isolation von humanen Keratinozyten wurde die Vorhaut von infantilen Spendern (max. 5 Jahre alt) verwendet, die bei medizinisch notwendigen Zirkumzisionen anfiel. Ihre Nutzung erfolgte ebenfalls unter Zustimmung des Ethik-Komitees der Ärztekammer Hamburg (WF-061/12).

2.1.9. Apparaturen und Hilfsmittel

Gerätename	Hersteller
Brutschrank „BBD 6220“	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
Digitalkamera „EC 3“	Leica (Nussloch, DE)
Entwicklungsgerät „Curix 60“	Agfa (Berlin, DE)
Einbettautomat „Shandon Citadel 2000“	Thermo Scientific (Schwerte, DE)
Fluoreszenzmikroskop „Axioplan 2“	Zeiss (Göttingen, DE)
Heizmagnetrührer „MR 3001“	Heidolph (Schwabach, DE)
Kryostat „CM 3050“	Leica (Nussloch, DE)
Kühlplatte „TBS 88.420“	Medite (Burgdorf, DE)
Kühlzentrifuge „Multifuge 1 S-R“	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
Lichtmikroskop „DMLS“	Leica (Nussloch, DE)
Microplate-Reader „Sunrise“	Tecan (Crailsheim, DE)
Mikrotom „RM 2165“	Leica (Nussloch, DE)
Paraffin-Gießstation „EG 1150H“	Leica (Nussloch, DE)
pH-Meter „766 Calimatic“	Knick (Berlin, DE)
real-time PCR-System „StepOne Plus“	Applied Biosystems (Darmstadt, DE)
Reinstwasseranlage „Astacus LS TI“	Membrapure GmbH (Bodenheim, DE)
Schüttelinkubator „stedim Certomat BS-1“	Sartorius (Hannover, DE)
Spektrophotometer „NanoDrop 2000c“	Thermo Scientific (Schwerte, DE)
Spektrophotometer „SmartSpec™ 3000“	Bio-Rad (München, DE)
Sterilwerkbank „Hera Safe 12“	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
Thermocycler „UNO Thermoblock“	Biometra (Göttingen, DE)
Vortexer „REAXtop“	Heidolph (Schwabach, DE)
Waage „BI 3100“	Sartorius (Hannover, DE)
Wärmeschrank „B 5060“	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
Zentrifuge „Laborfuge 400e“	Heraeus Instruments (Hanau, DE)

2.1.10. Software

Name	Anwendung	Hersteller
LAS EZ	Steuerung und Datenaufnahme Leica EC3	Leica
Endnote	Datenbank	Thomson
Excel 2003/2007	Tabellenkalkulation	Microsoft
Fiji	Bildbearbeitung	Open Source
OpenLab 3.0.9	Datenaufnahme Fluoreszenzmikroskop	PerkinElmer
Photoshop	Bildbearbeitung	Adobe
Powerpoint 2003	Präsentation	Microsoft
SPSS 21	statistische Auswertung	IBM
TScratch	Bildanalyse	CSElab ETH Zürich
Word 2003/2007	Textverarbeitung	Microsoft

2.2. Methoden

Alle nachfolgend beschriebenen Tätigkeiten wurden, sofern laut SOP bzw. Sicherheitsvorschriften gefordert, unter Verwendung der entsprechenden Schutzkleidung, wie Handschuhe, Mundschutz und Sicherheitsbrille, durchgeführt.

2.2.1. Gewebekultur

2.2.1.1. Herstellung und Kultivierung der *ex vivo* Wundmodelle

Die Ohren frisch geschlachteter Schweine wurden unter fließendem Wasser gereinigt und mithilfe einer gebogenen Schere auf der Ohr-Innenseite von Haaren befreit. Zur Desinfektion wurde die Ohrinnenfläche anschließend mit einer sterilen Mullbinde bedeckt, die mit Sterilium getränkt wurde. Nach mindestens 10-minütiger Inkubation wurde die Desinfektionslösung mit isotonischer Kochsalzlösung abgespült und die Ohren in die sterile Werkbank überführt. Dort wurden entlang der Plicae 6 mm große Stanzen entnommen, die zunächst von eventuell verbliebenen Haaren und Fettgewebe befreit wurden. Die entnommenen Hautstanzen wurden in einer mit Medium gefüllten 65 mm-Zellkulturschale gesammelt. Alternativ zu porzinen *ex vivo* WHM wurden einige Untersuchungen auch an Modellen aus humanen Hautstanzen durchgeführt. Dazu wurden die steril aus dem Klinikum gelieferten Hautproben auf sterilen Mullbinden platziert und analog zu den Schweineohren 6 mm große Hautstanzen entnommen. Diese wurden ebenfalls in einer Zellkulturschale gesammelt. Anschließend wurde mithilfe einer 3 mm Stanze mittig ein runder Schnitt gesetzt, sodass in diesem Bereich die Epidermis und der obere Teil der Dermis mittels Skalpell entfernt werden konnte, um eine Wunde zu erzeugen. Die so gewonnen Wundmodelle wurden, je eines pro Well, in 12-Well-Platten überführt, deren Wells zuvor mit einem Stück Mullbinde und etwa 2 ml Medium vorbereitet worden waren. Die Wundmodelle wurden dann auf die Mullbinde gelegt, sodass die dermale Seite von Medium umspült wurde. Die Epidermis hingegen war nicht mit Medium bedeckt, sondern stand mit der Luft in Kontakt. Dieses Air-Liquid-Interface genannte Kultivierungsverfahren dient der Simulation der physiologischen Bedingungen.

Die anschließende Inkubation der Wundmodelle erfolgte standardmäßig im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte (rH). Während der Inkubationszeit, die maximal 96 Stunden betrug, setzte in den Wundmodellen ein Heilungsprozess ein, wodurch es zur Ausbildung einer neuen Epidermis im Bereich der Wunde kam. Zur Untersuchung der Wundheilung wurden die Wundmodelle nach

einem zuvor festgelegten Zeitplan abgestoppt, indem sie in mittels flüssigen Stickstoffs vorgekühltem Isopentan schockgefroren wurden. Die nachfolgende Lagerung bis zur Anfertigung der histologischen Schnitte (siehe Kapitel 2.2.4.1) erfolgte bei -80 °C. Alternativ wurden die Modelle über Nacht bei 4 °C in Formalin fixiert und anschließend im Einbettautomat entwässert, mit Paraffin durchtränkt und ausgehärtet. Danach wurden die Modelle jeweils einzeln in einen Paraffinblock eingebettet, um das Anfertigen von histologischen Schnitten zu ermöglichen (siehe Kapitel 2.2.4.2).

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Anzucht von humanen Keratinozyten aus Preputia

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank mit laminarer Strömung durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Medien vor der Verwendung im Wärmeschrank auf 37 °C erwärmt.

Die Preputia wurden in Zellkulturmedium mit Penicillin und Streptomycin angeliefert und zur möglichst vollständigen Desinfektion vor der Weiterverarbeitung einen Tag im Kühlschrank gelagert. Am Folgetag wurde mittels Skalpell das derbe Gewebe des äußeren Preputiums vom eher mukösen Innenteil getrennt. Der zur Anzucht von Keratinocyten genutzte derbe Gewebeteil wurde dann in zwei 60 mm Petrischalen mit PBS gespült und anschließend auf einen Objektträger überführt. Während der folgenden Zerkleinerung in etwa 1-2 mm² große Stücke wurde das Gewebe ständig mit PBS feucht gehalten, für optimale Verdaubedingungen erfolgte zudem vor Beginn der Zerkleinerung die Entfernung des der Haut unterliegenden Bindegewebes. Die Hautstückchen wurden dann in eine 35 mm Petrischale mit 2 ml 0,25%iger Trypsin-Lösung überführt, um anschließend für einen Tag im Kühlschrank bzw. zwei Stunden bei 37 °C inkubiert zu werden. Während dieser Inkubationszeit löste das Trypsin die Zell-Matrix-Verbindungen zwischen der Epidermis und der Basalmembran, sodass nachfolgend die Epidermis von der Dermis abgezogen werden konnte. Die abgelöste Epidermis wurde in einem Falcon-Röhrchen mit ca. 3 ml 10%igem FCS gesammelt und mittels mehrfachem Auf- und Abpipettieren wurden die Zellverbände mechanisch aufgebrochen. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 Minuten bei 1.100 rpm (= 800 g) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet seiner Größe entsprechend in 2,5 – 4 ml Zellkultur-Medium (siehe Kapitel 2.1.5) resuspendiert. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde nun die Zellzahl der Lösung der bestimmt, um anschließend die Zellen mit einer Dichte von etwa 100.000 Zellen je Milliliter Medium in Petrischalen auszusäen. Die ausgesäten Zellen wurden für etwa eine

Woche unberührt bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Nach ca. 5-7 Tagen erfolgte die optische Kontrolle der Kultivierung, bei guter Absetzungs- und Klonierungsrate erfolgte zuerst ein Wechsel des Mediums, um die in Suspension befindlichen Zellen und zellulären Überreste zu entfernen. Anschließend wurden die Keratinozyten weiter kultiviert. Nach dem Erreichen einer 70%igen Konfluenz wurde das Medium entfernt und die Zellen für etwa 5 Minuten mit 2 ml Keratinozyten-Trypsin (siehe Kapitel 2.1.5) im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Petrischale wurden diese in ein 15 ml Falcon-Tube mit 5 ml 10%igem FCS überführt und für 5 Minuten bei 1.100 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das Pellet dann entweder im entsprechenden Medium resuspendiert und danach erneut in Petrischalen ausgesät werden, um die Zellen weiter in Kultur zu halten, oder die Zellen wurden für eine spätere Nutzung weggefroren (siehe Kapitel 2.2.2.3).

2.2.2.2. Kultivierung und Passagierung

Nach Anzucht bzw. Rekultivierung der Keratinozyten erfolgte die Kultivierung im gewünschten Medium bei 37 °C mit 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Begasung im Zellkultur-Inkubator, bis die Zellen für Experimente benötigt wurden. Während der Kultivierung wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt, und sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 70 % erreicht hatten, wurde das Medium entfernt und anschließend die Zellen in der Petrischale mit ca. 5 ml PBS gewaschen, um sowohl tote Zellen als auch freigesetzte Proteasehemmer und andere Trypsin-beinträchtigende Stoffe zu entfernen. Im Folgenden wurden die Zellen für etwa 5 Minuten mit 2 ml Keratinozyten-Trypsin im Brutschrank inkubiert. Die so gelösten Zellen wurden nun in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml 10%igem FCS überführt und 5 Minuten bei 1.100 rpm zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet seiner Größe entsprechend in 2,5 – 4 ml Zellkultur-Medium resuspendiert und dann ausgesät.

2.2.2.3. Kryokonservierung

Die Kryokonservierung dient zum dauerhaften Lagern der Zellen und ermöglicht das Anlegen einer Reserve an Zellmaterial. Hierfür wurden Zellen direkt nach der Anzucht (siehe Kapitel 2.2.2.1) bis zu einer Konfluenz von etwa 70 % kultiviert, dann wie unter 2.2.2.2 beschrieben von der Zellkulturschale gelöst und das Pellet nach dem Zentrifugieren in 3 ml Kryomedium (siehe Kapitel 2.1.5) resuspendiert. Je 1 ml dieser Suspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt, diese wurden dann in einem

speziellen Behälter mit Isopropylalkohol bei -80 °C gelagert, wobei der Isopropylalkohol eine konstante Abkühlrate von 1 °C pro Minute ermöglichte. Am Folgetag konnten die Zellen dann für die dauerhafte Lagerung in Flüssigstickstofftanks überführt werden.

2.2.2.4. Rekultivierung von eingefrorenen Zellen

Um das bei Raumtemperatur zytotoxische DMSO aus der Zellkultur zu entfernen, wurden die Kryoröhrchen mit den gefrorenen Zellen im warmen Wasserbad aufgetaut, die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml PBS überführt, für fünf Minuten bei 1.100 rpm zentrifugiert und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes im entsprechenden Zellkultur-Medium resuspendiert. Abschließend konnten die Zellen in neue Petrischalen ausgesät werden, wobei der Inhalt eines Kryoröhrchens in jeweils eine 100 mm Petrischale ausgesät wurde.

2.2.2.5. Scratch-Wundheilungsversuch

Um neben dem komplexen *ex vivo* Wundheilungsmodell (siehe Kapitel 2.2.1.1) eine direktere Möglichkeit zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Bedingungen oder Substanzen auf den Wundheilungsvorgang zu haben, wurde ein Zellkultur-Wundmodell mit primären Keratinozyten entwickelt. Nach erfolgreicher Anzucht bzw. Rekultivierung aus der Kryolagerung (siehe Kapitel 2.2.2.2 bzw. 2.2.2.4) wurden die Zellen je nach benötigter Zellzahl in zwei bzw. drei 100 mm Petrischalen bis zu etwa 70%iger Konfluenz kultiviert, dann erfolgte die Aussaat in einer 24-Well-Schale mit 100.000 Zellen je Well in 0,5 ml Volumen.

Je nach Fragestellung wurden die Zellen direkt vor der Aussaat zusätzlich mit siRNA behandelt, um die Synthese eines bestimmten Proteins zu unterbinden (siehe Kapitel 2.2.2.8). Zusätzlich wurden weitere behandelte Zellen in einer 24-Well-Platte auf Deckgläschen ausgesät, um mittels einer Ki67-Färbung die Proliferationsfähigkeit zu überprüfen. Bei Bedarf wurde darüber hinaus noch eine 12-Well-Platte mit identisch behandelten Zellen beschickt, um eine RNA-Isolation (siehe Kapitel 2.2.3.7) vornehmen zu können. Zur Überprüfung der Kinase-Aktivität wurden die Zellen ebenfalls in die Wells einer 12-Well-Platte ausgesät. Bei der Aussaat in 24-Well-Platten wurden je Versuchsbedingung zwei technische Replikate angesetzt, in 12-Well-Platten wurde jede Versuchsgruppe nur einmal ausgesät. Nachdem die ausgesäten Zellen 48 Stunden bei 37 °C mit 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂-Begasung inkubiert worden waren und einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, erfolgte entweder direkt das Setzen der Wunde, oder das Medium der Zellen, in dieser Arbeit nur durchgeführt für

KGM, wurde erneuert und durch Zugabe der Calciumchlorid-Stammlösung auf eine Konzentration von 1,8 mM Calcium eingestellt, um eine Differenzierung der Zellen zu initiieren. Nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit unter diesen Bedingungen wurden die Zellmonolayer dann verwundet, und auch im weiteren Verlauf mit dem Hoch-Calcium-Medium inkubiert. Für die Verwundung des Monolayers wurde die Spitze einer sterilen 200 µl Pipettenspitze am oberen Rand des Wells auf dem Wellboden angesetzt und anschließend mit mäßigem Druck in einer geraden Linie einmal vertikal über den Wellboden gezogen, um die Zellen in einem schmalen Streifen vom Wellboden zu lösen und somit eine Wunde im Monolayer zu generieren. Für die Untersuchung der Kinase-Aktivität bzw. die Isolation von RNA aus den 12-Well-Platten wurden die Monolayer mit insgesamt vier Streifen verwundet, die horizontal, vertikal und von links oben nach rechts unten bzw. rechts oben nach links unten diagonal verlaufend gesetzt wurden. Anschließend wurden die Wells jeweils zweimal mit PBS gespült, mit frischem Medium befüllt und dann die Wunde von jedem Well an mindestens drei Positionen fotografiert. Nach zwölf und 24 Stunden wurde erneut das Medium gewechselt und der Heilungsfortschritt fotografisch dokumentiert, nach 36 Stunden erfolgte vor dem Fotografieren kein Mediumwechsel. Nach dem Fotografieren wurden die Zellen einer Proteinextraktion zugeführt (siehe Kapitel 2.2.3.1). Die Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgte durch die Software TScratch (Gebäck et al., 2009), mit deren Hilfe die von Zellen bedeckte Fläche jedes Bildes markiert wurde, um die Größe der Wunde über den zeitlichen Verlauf hinweg für die verschiedenen Behandlungen zu bestimmen. Die vom Programm ermittelte Wundfläche in Prozent der gesamten Bildfläche wurde anschließend in die tatsächliche Wundgröße in mm² umgerechnet. Basierend auf diesen Daten erfolgte die grundlegende Auswertung und Visualisierung in Microsoft Excel, die endgültige Auswertung der Daten aller Versuche erfolgte mit SPSS.

2.2.2.6. optionale Vorbehandlungen im Scratch-Wundheilungsversuch

Einige Fragestellungen der Arbeit erforderten eine zusätzliche Vorbehandlung der Keratinozyten vor dem Verwunden des Monolayers. Zur Unterbindung der Proliferation wurden die Keratinozyten drei Stunden vor Wundsetzung mit Mitomycin C in einer Konzentration von 15 µg/ml inkubiert. Nach dem Setzen der Wunde wurde der Wirkstoff durch das routinemäßige zweimalige Spülen mit PBS ausgewaschen und die Zellen anschließend wieder mit dem regulären Medium versorgt.

Alternativ wurde durch die Inkubation der Keratinozyten mit MK-2206 die Autophosphorylierung und damit Aktivierung der AKT-Kinase inhibiert. Eingesetzt

wurde dieser Inhibitor, basierend auf Literaturangaben, in einer Konzentration von 2 bzw. 5 μM (Hossini et al., 2016; Luo et al., 2016). Die Inkubation der Zellen mit MK-2206 wurde drei Stunden vor Verwundung der Monolayer begonnen und nach dem Setzen der Wunde bis zum Ende des Experimentes fortgesetzt, wobei der Inhibitor im Zuge der regulären Mediumswechsel ebenfalls erneuert wurde.

2.2.2.7. gestresster Scratch-Wundheilungsversuch

Als Alternative zum normalen Scratch-Wundheilungsversuch (siehe Kapitel 2.2.2.5) wurde der Versuchsansatz für einige Untersuchungen um einen Parameter erweitert. Ziel war es, die mechanische Belastung zu simulieren, der die Keratinozyten am Patienten in der Wunde durch die bewegungsbedingte Dehnung der Haut und verschiedene direkte mechanische Krafteinwirkungen ausgesetzt sind. Dazu wurden die entsprechend behandelten Zellen in identischer Belegung auf zwei verschiedene 24-Well-Platten ausgesät. Eine Stunde nach dem regulären Setzen der Scratchwunde wurden beide Platten aus dem Inkubator genommen und die entsprechend gekennzeichnete „Stress“-Platte mit dem Boden für 30 Sekunden auf den rotierenden Kopf eines Vortex-Schüttlers gepresst, der im Dauerbetrieb auf höchster Stufe lief. Die Vibration des Schüttlerkopfes übertrug sich dabei auf die Well-Platte und erzeugte sowohl durch das Vibrieren des Wellbodens, als auch durch die induzierte Bewegung des Zellkulturmediums eine mechanische Belastung auf die Keratinozyten. Anschließend wurden beide Platten wieder in den Inkubator überführt. Dieser Vorgang wurde für die ersten sechs Stunden nach der Verwundung des Monolayers stündlich wiederholt, zudem wurde alle zwei Stunden das Medium in allen Wells beider Platten erneuert. Bei dieser Gelegenheit wurde auch der Deckel der geschüttelten Well-Platte gesäubert und der Wundheilungsfortschritt anschließend, durch Fotoaufnahmen wie beim regulären Scratch-Wundheilungsversuch, dokumentiert.

2.2.2.8. siRNA-Behandlung (Protein-Knockdown)

Zur gezielten Unterbindung der Synthese eines Proteins können Zellen mit entsprechender (*small interfering*) siRNA behandelt werden. Die siRNA bindet entsprechend ihrer Sequenz an die mRNA des gewünschten Proteins und be- bzw. verhindert damit den Vorgang der Translation, d. h. die Synthese des Proteins. Die Behandlung der Zellen erfolgte in Suspension, dazu wurden entsprechend des geplanten Experimentes das benötigte Volumen und die darin enthaltene Zellzahl berechnet. Je Milliliter Volumen der Gesamtsuspension wurden 5 μl HiPerfect-Reagenz

und 5 µl der siRNA-Lösung mit 40 µl des entsprechenden Mediums, allerdings frei von Serum und Antibiotika, zu einer Transfektionslösung angesetzt, die für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach bis zur Verwendung auf Eis gelagert wurde. In der Zwischenzeit wurden die Zellen von den Kulturplatten gelöst und in Suspension gebracht (siehe Kapitel 2.2.2.2), um dann entsprechend der anfangs berechneten Werte die Suspensionen für die verschiedenen Behandlungen anzusetzen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden eine unbehandelte Kontrolle, zwei siRNA Negativkontrollen („AllStars Negative Control“ (AS) und „Negative Control“ (NeKo)) und zwei gegen das Zielprotein ZO-1 gerichtete siRNA-Behandlungen (ZO-1 #6 und ZO-1 #7) eingesetzt. Für das Protein Occludin standen ebenfalls zwei verschiedene siRNA-Moleküle zur Verfügung, Occludin #7 und Occludin #11, und auch beim Knockdown von Claudin-1 kamen zwei unterschiedliche siRNAs zum Einsatz – Claudin-1 #5 und Claudin-1 #8. Zu den vorbereiteten Zellsuspensionen wurde dann die entsprechende Transfektionslösung gegeben und die Zellen nach gründlichem Durchmischen der Suspension für das geplante Experiment ausgesät. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium gewechselt, und die Zellen konnten für den jeweiligen Versuch verwendet werden.

2.2.2.9. Ki67-Färbung auf Deckgläschen

Um bei einem Scratch-Wundheilungsversuch (siehe Kapitel 2.2.2.5) den Einfluss der verschiedenen Behandlungen auf die Proliferation der Zellen zu untersuchen, wurde ein Teil der Zellen aus den verschiedenen Suspensionen in eine 24-Well-Schale ausgesät, in deren Wells zuvor sterile Deckgläschen platziert worden waren. Für jede Behandlung wurden in insgesamt zwei Wells je 100.000 Zellen ausgesät, um so 24 Stunden nach dem Setzen der Wunde eine Doppelbestimmung vornehmen zu können. Dafür wurden die Zellrasen auf den Deckgläschen bei Erreichen der Konfluenz zeitgleich mit den anderen Zellen des Scratch-Assays mit einer Pipettenspitze verwundet (siehe Kapitel 2.2.2.5), und nach 24 Stunden fixiert. Zur Fixierung wurden die Deckgläschen aus den Wells gehoben und in einem Träger gesammelt, der in einer mit PBS gefüllten Glasküvette stand. Nachdem die Deckgläschen zweimal vorsichtig mit PBS gespült worden waren, wurden sie für 5 Minuten in -20 °C kaltem Methanol und danach 15 Sekunden in ebenfalls -20 °C kaltem Aceton fixiert. Nun wurden die Deckgläschen kurz luftgetrocknet und, mit der Zell-freien Seite nach unten, jeweils paarweise mit klarem Nagellack auf einem Objektträger fixiert. Nach Aushärten des Nagellacks konnten die Objektträger dann bis zur Immunfluoreszenzfärbung (siehe Kapitel 2.2.4.4) bei -20 °C gelagert werden. Nach erfolgter Markierung des Proteins

Ki67 wurden am Fluoreszenzmikroskop je drei verschiedene Positionen entlang des Wundrandes fotografiert, wobei jeweils ein Bild des Signals vom Ki67-Antikörper und ein Bild der DAPI-Färbung gemacht wurde. So konnte für jede Position die absolute Zellzahl bestimmt werden, und anhand der gezählten Ki67-positiven Zellen ließ sich dann der Anteil der proliferierenden Zellen errechnen.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Proteinextraktion

Um die Effizienz des Protein-Knockdowns zu ermitteln, wurden am Ende des Scratch-Wundheilungsversuches (siehe Kapitel 2.2.2.5) die Proteine aus den Versuchszellen extrahiert. Dazu wurde zuerst das Medium aus den Wells der 24-Well-Platte entfernt und die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nun wurden in jedes Well 40 µl Extraktions-Lösung (siehe Kapitel 2.1.5) pipettiert und die ganze Platte für 15 Minuten auf Eis stehend inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Zellen jedes Wells mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Suspensionen aus den Wells der technischen Replikate wurden dabei gepoolt. Nach kurzem Durchmischen der Suspensionen wurden diese für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert, danach etwa 30 Sekunden mittels des Vortex-Schüttlers kräftig durchmischt und anschließend bei 4 °C 15 Minuten mit 13.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden dann in neue Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung (siehe Kapitel 2.2.3.2 ff.) bei -80 °C gelagert. Bei der Proteinextraktion aus den Wells einer 12-Well-Platte wurden jeweils 80 µl Extraktionslösung pro Well verwendet, und sofern vorhanden wurden auch hier die Suspensionen der Wells von technischen Replikaten gepoolt. Zur Bestimmung der Aktivität verschiedener Proteinkinasen wurden jeweils unverwundete Zellen sowie Zellen zehn Minuten und sechs Stunden nach dem Setzen der Wunde zur Proteinextraktion verwendet, wobei der regulären Extraktionslösung zusätzlich noch pro angesetztem Milliliter je 10 µl Phosphatase-Inhibitor-Mix beigemischt wurden (siehe 2.1.6), um die Phosphorylierung der Kinasen vor dem Abbau zu bewahren.

2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den verschiedenen Proteinpräparationen wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) angewandt. Diese Methode nutzt die Eigenschaft des Farbstoffs Coomassie G250, mit Proteinen Komplexe zu bilden.

Diese Interaktion führt zu einem Konformationswechsel des Farbstoffmoleküls, der mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm einhergeht. Die gemessene Absorptionsänderung wird als Maß für den Proteingehalt der untersuchten Lösung verwendet. Die Auswertung der Messergebnisse der Proteinpräparationen wurde durch die ebenfalls durchgeführte Messung einer BSA-Standardreihe ermöglicht.

Je nach Zahl der zu untersuchenden Proben wurden in die entsprechende Anzahl Wells einer 96-Well Platte jeweils 19 µl A. dest. vorgelegt und darin je 1 µl der Probe gelöst. Von den BSA-Standards wurden jeweils 20 µl in ein Well, in dem bereits 1 µl RIPA-Puffer vorgelegt worden war, pipettiert, anschließend wurde zu allen Wells je 180 µl Bradfordreagenz pipettiert und im Folgenden die Absorptionen der einzelnen Suspensionen bestimmt. Basierend auf den Absorptionen der BSA-Standardreihe wurde dann eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe dann der Proteingehalt der Proben berechnet werden konnte.

2.2.3.3. 1D-Gelelektrophorese nach Laemmli

Zur eindimensionalen Auftrennung der in den Proben enthaltenen Proteine wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt, bei der die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dies wird durch die Inkubation der Proben mit dem denaturierenden SDS-Probenpuffer erreicht. Durch die Wirkung von SDS und 2-Mercaptoethanol, unterstützt durch ein Kochen der Proben für 1-3 Minuten vor ihrer Auftragung, werden sowohl Proteinkomplexe aufgelöst als auch Proteine denaturiert. Das SDS dient dem Aufspalten von Wasserstoffbrückenbindungen, während β -Mercaptoethanol eine Spaltung der Disulfidbrücken bewirkt, so dass die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst wird und sie linearisiert vorliegen. Weiterhin bilden sich durch Interaktion von SDS mit hydrophoben Regionen der Proteine SDS-Protein-Komplexe. Da SDS mit seiner anionischen Kopfgruppe die Eigenladung der Proteine überdeckt, erhält jedes Protein entsprechend der Zahl angelagerter SDS-Moleküle, und damit entsprechend seiner Größe, eine mehr oder weniger große negative Ladung. Daraus ergibt sich ein theoretisch für alle Proteine konstantes Masse/Ladungsverhältnis, womit eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Molekularmasse realisierbar ist. Der Trenneffekt wird dabei durch das Polyacrylamidgel erreicht, dessen Porengröße die Laufgeschwindigkeit der verschiedenen großen Proteine beeinflusst.

Die Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970) beinhaltet zusätzlich ein diskontinuierliches Trennsystem, bestehend aus einem engporigen Trenngel mit

aufgesetztem, weitporigem Sammelgel. Dieses System ermöglicht eine höhere Trennschärfe und damit eine verbesserte Nachweisempfindlichkeit.

Für die SDS-PAGE wurde das Mini-PROTEAN®3 System von Bio-Rad genutzt. Begonnen wurde mit dem Reinigen der Glasplatten und dem anschließenden Aufbau der Gelgießapparatur. Nach dem Fertigstellen der Lösung für das Trenngel (siehe Kapitel 2.1.5) wurde diese bis etwa 2 cm unter den Rand der zusammengebauten Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem Isopropylalkohol überschichtet, um die Oberfläche zu glätten. Nach etwa 45 min war die Polymerisation des Trenngels vollständig abgeschlossen, was anhand der im Becherglas übrig gebliebenen Gellösung kontrolliert werden konnte. Daraufhin wurde der Isopropylalkohol abgegossen und die Glasplatten sowie die Oberfläche des Trenngels mit A. dest. gespült, das Wasser vollständig entfernt und dann das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung (siehe Kapitel 2.1.5) überschichtet. In das Sammelgel wurde unverzüglich der Kamm für 10 bzw. 15 Auftragesaschen eingesetzt. Das Gel polymerisierte dann innerhalb von etwa 30 min aus, und nach vollständiger Aushärtung wurden jeweils zwei Gele in eine Laufvorrichtung eingespannt. Diese wurden dann in die Elektrophorese-Kammern gesetzt und der innere, von den beiden Gelplatten umschlossene Bereich mit 1x Laufpuffer (siehe Kapitel 2.1.5) aufgefüllt. Anschließend wurden die Taschen der Sammelgele mit den errechneten Volumina (siehe Kapitel 2.2.3.2) für 5 bzw. 10 µg Protein der zu untersuchenden Proben beladen, wobei diese zuvor 3 Minuten bei 95 °C inkubiert wurden, und dann auch das äußere Pufferreservoir der Kammer mit 1x Laufpuffer befüllt. Die Beladung der Gele erfolgte nach einem zuvor festgelegten Schema, wobei in jedem Gel eine Tasche mit 10 µl eines Standard-Proteinmarkers beladen wurde, um die Molekularmassen der im Folgenden markierten Proteine abschätzen und damit die korrekte Markierung überprüfen zu können. Nach dem Aufsetzen des Deckels und dem Anschließen der Stromkabel an das Netzgerät wurde die Elektrophorese gestartet. Dafür wurde während der ersten 15 min eine Spannung von 70 V gewählt, so dass die Proben in das Sammelgel einwandern und sich an der Grenze zum Trenngel sammeln konnten. Für die restliche Laufzeit wurde eine Spannung von 150-170 V angelegt. Beendet wurde die Elektrophorese, sobald die Lauffront des im Probenpuffer enthaltenen Bromphenols das untere Ende des Polyacrylamidgels erreicht hatte.

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mithilfe des Western-Blot Verfahrens auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (siehe Kapitel 2.2.3.4).

2.2.3.4. Western Blot

Zur weiteren Analyse der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Gel wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dabei kam entweder das Wet-Blot- (siehe Kapitel 2.2.3.4.1) oder das Semi-Dry-Blotverfahren (siehe Kapitel 2.2.3.4.2) Verfahren zur Anwendung. Bei beiden Methoden werden die Proteine, ohne das Trennmuster zu verändern, mittels Anlegen eines elektrischen Feldes von dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran übertragen, an der sie durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen binden.

Nach dem Ende des Blotvorgangs wurden die Membranen, nach eindeutiger Beschriftung mit einem weichen Bleistift, in Ponceau-Färbelösung überführt. Die darin enthaltene Trichloressigsäure fixierte die Proteine zusätzlich auf der Membran. Nach 3-5 min Inkubation waren die Proteinbanden ausreichend angefärbt, um eine Beurteilung der Transferqualität vornehmen zu können. Die Entfärbung der Membran erfolgte durch 5-minütiges Waschen in TBS-T Puffer (siehe Kapitel 2.1.6).

2.2.3.4.1. Wet-Blotting

Zur Vorbereitung der Gele, von denen zuvor das Sammelgeld entfernt wurde, und der benötigten Nitrocellulose-Membran wurden diese getrennt voneinander für 15 Minuten in Schalen mit Blotpuffer (siehe Kapitel 2.1.6) equilibriert. Anschließend wurden die so genannten Blot-Sandwiches in der Transferkassette aufgebaut, wobei die Bio-Rad-Filter und auch die Schwammpads vor der Verwendung ebenfalls in Transferpuffer getränkt wurden. Auf die schwarze Seite der aufgeklappten Transferkassette wurde zuerst ein Schwammpad gelegt, darauf ein Bio-Rad-Filter platziert und möglichst zentral auf diesen dann das Gel positioniert. Nun wurde die Nitrocellulose-Membran vorsichtig und möglichst luftblasenfrei auf dem Gel abgelegt und mit einem Bio-Rad-Filter bedeckt. Mit einer kleinen Rolle wurden dann eventuell verbliebene Luftblasen aus dem Stapel ausgestrichen, und abschließend das Blot-Sandwich mit einem weiteren Schwammpad vervollständigt. Nach dem Zusammenklappen und Verriegeln der Transferkassetten wurden jeweils zwei Stück in eine Blotkammer eingesetzt, dazu noch ein Kühlelement und ein Rührmagnet. Nun konnte die Kammer mit Blotpuffer gefüllt, die gesamte Blotkammer in den Kühlraum transportiert und dort nach Aufsetzen des Deckels das Blotten gestartet werden, was in der Regel über Nacht bei 150 mA erfolgte. Alternativ wurde 2 Stunden lang bei 350 mA geblottet.

2.2.3.4.2. Semi-Dry-Blotting

Wie auch beim Wet-Blotting wurden die Gele, Membrane und Bio-Rad-Filter für das Semi-Dry-Blotverfahren für 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Je nach Anzahl der zu blottenden Gele wurden nun ein oder zwei Blot-Sandwiches, bis auf die fehlenden Schwammpads analog zum Wet-Blotting (siehe Kapitel 2.2.3.4.1), in einer Blotkammer aufgebaut und diese, nachdem eventuelle Luftblasen und überschüssiger Blotpuffer aus den Blotsandwiches ausgestrichen worden waren, in das Semi-Dry Blotgerät eingesetzt. Entsprechend der Beladung der Blotkammer mit einem oder zwei Blot-Sandwiches wurde dann das Blotprogramm mit passender Stromstärke und Blotdauer gewählt und der Prozess gestartet.

2.2.3.5. Western-Blot-Analyse

Um die spezifische Detektion der Proteine zu ermöglichen, wurden die Blot-Membranen zuerst für 60 min bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln mit einer fünfprozentigen Magermilchlösung (siehe Kapitel 2.1.7) inkubiert. Dadurch wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf den Membranen geblockt, sodass die eingesetzten Antikörper nur entsprechend ihrer Spezifität an ihr Ziel-Epitop binden konnten.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Kapitel 2.1.2), der spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichtet war, erfolgte anschließend über Nacht bei 4 °C oder für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur, indem die Membrane zusammen mit der Antikörper-Suspension in eine kleine Plastetüte eingeschweißt und dann auf einer rotierenden Trägerplatte fixiert wurden. Nachfolgend wurde die Membran dreimal für je 5 min in TBS-T Puffer gewaschen, um ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Daran schloss sich die 30-minütige Inkubation mit dem jeweiligen artspezifischen und Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Kapitel 2.1.2) bei Raumtemperatur an, die ebenfalls wieder in einer Plastetüte erfolgte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Blot-Membranen dreimal für je 5 min mit TBS-T Puffer gewaschen.

Die Detektion der Sekundärantikörper erfolgte in der Dunkelkammer mithilfe von Chemilumineszenz. Die Blot-Membranen wurden dafür 3 min lang in der Pierce Chemilumineszenz-Reagenz (Thermo Scientific) inkubiert. Dieses Reagenz enthält sowohl Luminol als Substrat für die Peroxidase des Sekundär-Antikörpers als auch Wasserstoffperoxid zur Unterstützung der Reaktion. Bei der Oxidation des Luminols durch die Peroxidase des Sekundärantikörpers wird Licht emittiert, das detektiert

werden kann. Die so hervorgerufenen Leuchtsignale der Antikörper-markierten Proteinbanden wurden genutzt, um Fotofilme zu belichten, die anschließend im Agfa Curix 60 entwickelt wurden. Basierend auf Erfahrung und der sofortigen Begutachtung der entwickelten Filme wurden mehrere Filme mit unterschiedlichen Belichtungszeiten aufgenommen, um die Signale möglichst optimal zu detektieren; die Belichtungszeit variierte dabei je nach verwendetem Antikörper zwischen wenigen Sekunden und einigen Minuten.

Im Anschluss wurden die Blots erneut in Ponceau gefärbt, getrocknet und eingelagert. Die entwickelten Filme wurden am Computer eingescannt, wobei auf eine möglichst waagerechte Ausrichtung der Banden geachtet wurde, und die generierten Bilder anschließend in Fiji geöffnet. Mithilfe der Rechteck-Auswahl wurde nun die erste auszuwertende Bande einer Bandenreihe markiert, durch gleichzeitiges Drücken der Tasten „Strg“ und „1“ bestätigt und anschließend der Auswahlrahmen auf die zweite Bande verschoben. Diese und alle nachfolgenden Banden wurden durch gleichzeitiges Drücken von „Strg“ und „2“ bestätigt, und sobald alle Banden markiert waren konnte durch Drücken von „Strg“ und „3“ ein Plot der markierten Banden aufgerufen werden. In diesem wurden nun mithilfe des Linien-Tools die tatsächlichen Bandenpeaks vom Hintergrund abgetrennt, sodass anschließend die tatsächliche Stärke der einzelnen Banden bestimmt werden konnte. Dazu wurde das „Zauberstab“-Tool gewählt und jeder Bandenpeak einmal angeklickt. Im sich automatisch öffnenden Ergebnis-Fenster wurden bei jedem Klick die entsprechenden Flächenwerte der Peaks, welche mit der Stärke bzw. Dicke der Banden korrelieren, eingetragen. Anhand dieser Werte, die sowohl für die Banden des untersuchten Proteins als auch der Banden des Referenzproteins ermittelt wurden, konnte anschließend der relative Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt werden, wobei die ermittelten Werte des Referenzproteins genutzt wurden, um die Messwerte des Zielproteins zu normieren und damit eventuelle Unterschiede in der Beladung des Gels auszugleichen. Dabei sollte aber stets beachtet werden, dass sowohl beim Blotten als auch bei der Detektion der Proteine mittels Peroxidase-gekoppelter Antikörper Fehler passieren können, die trotz gleicher Beladung zu unterschiedlich starken Banden führen. Zudem dürfen die Banden nicht überbelichtet sein, da sonst die ermittelten Werte nicht dem tatsächlichen Zustand entsprechen.

2.2.3.6. Coomassie-Färbung der Gele nach Maniatis

Eine Möglichkeit zur Visualisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine direkt im Gel ist die Färbung mit dem Coomassie-Brilliant Blau R250 Farbstoff (Maniatis et

al., 1989). Dieser lagert sich an die basischen und aromatischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt unspezifisch alle Proteine. Die damit erreichte Nachweisgrenze liegt bei etwa 100 ng Protein. Zum Färben der Proteine wurden die Gele nach dem Beenden der Elektrophorese für 45 min unter leichtem Schütteln mit der Coomassie-Färbelösung (siehe Kapitel 2.1.5) bei RT inkubiert. Da der Farbstoff in das gesamte Gel eindrang und dieses somit ebenfalls eingefärbt wurde, wurde der unspezifisch gebundene Coomassie-Farbstoff anschließend wieder entfernt. Dies geschah durch Waschen des Gels mit der Coomassie-Entfärbelösung (siehe Kapitel 2.1.5) unter leichtem Schütteln. Sobald sich die gefärbten Proteinbanden deutlich von dem Gelhintergrund abhoben wurde der Waschvorgang beendet und das Gel in eine Konservierungslösung (siehe Kapitel 2.1.5) überführt, in der es mindestens 24 h equilibriert wurde. Abschließend konnten die Gele dauerhaft eingelagert werden.

2.2.3.7. RNA-Isolation

Neben der Proteinextraktion (siehe Kapitel 2.2.3.1) stellt die Isolation der RNA eine weitere Möglichkeit dar, den Expressionslevel eines Proteins zu bestimmen und damit bspw. die Effizienz eines siRNA-vermittelten Knockdowns zu kontrollieren. In Vorbereitung auf die Isolation wurde die Arbeitsfläche mit RNase ZAP gereinigt, um einen Abbau der isolierten RNA zu vermeiden. Bis auf das PBS und die RNase-freien Reaktionsgefäße wurden alle im Folgenden verwendeten Materialien dem RNeasy Mini Kit von Qiagen entnommen. Zuerst wurden RNase-freie 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße zur Aufnahme der Zelllysate beschriftet und unter dem Abzug der RLT Lysis-Puffer angesetzt (siehe Kapitel 2.1.6). Dann wurden die mindestens 48 Stunden zuvor mit siRNA-behandelten Zellen (siehe Kapitel 2.2.2.8), die in einer 12-Well-Platte vorlagen, aus dem Inkubator geholt und zweimal mit PBS gespült. Zwischen den beiden Spülgängen wurde am inversen Mikroskop nochmals der Zellrasen kontrolliert. Nach dem Entfernen der zweiten PBS-Spüllösung wurden je Well 300 µl RLT-Puffer auf die Zellen pipettiert, sodann erfolgte eine erneute Inspektion des Zellrasens, der sich nahezu vollständig aufgelöst haben sollte. Nun wurde mit einer Pipettenspitze über den Wellboden geschabt, um eventuell anhaftende Restzellen abzulösen, und das Lysat anschließend in das der Probe entsprechende Reaktionsgefäß überführt und entweder auf Eis gestellt oder bis zur späteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Für die Aufreinigung der Lysate wurden diese in zuvor bereitgestellte Shreddersäulen überführt, die in spezielle, eindeutig gekennzeichnete Reaktionsgefäße eingesetzt wurden. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 13.000 U/min wurden die

Shreddersäulen entnommen und verworfen, jedes Lysat mit je 300 µl 70%igem Ethanol versetzt und mit der Pipette gut durchmischt. Nun wurde für jede Probe eine RNeasy Mini Spin Column vorbereitet und jeweils 700 µl des Lysates auf den Filter pipettiert. Durch eine 15 Sekunden dauernde Zentrifugation bei 10.000 U/min wurde das Lysat abfiltriert und die RNA auf dem Filter gesammelt. Das Reaktionsgefäß mit dem RNA-freien Lysat wurde verworfen, falls noch unfiltriertes Restlysate vorhanden war erfolgte eine zweite Zentrifugation mit derselben Mini Spin Column. Die Säulen mit der so gewonnenen RNA wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 350 µl RW1-Puffer überschichtet, woraufhin diese ebenfalls für 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert wurden. Als nächstes wurden die Säulen wieder in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und jeweils 80 µl DNase-Verdauung (siehe Kapitel 2.1.6) auf die Mitte der Filtermembran pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden auf jede Säule erneut 350 µl RW1-Puffer gegeben und die Säulen anschließend für 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mitsamt dem alten Reaktionsgefäß verworfen und die Säule in ein neues überführt, mit 500 µl RPE-Puffer überschichtet und wiederum 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Ohne das Gefäß zu wechseln wurden weitere 500 µl RPE-Puffer auf jede Säule gegeben und diese dann zwei Minuten lang bei 10.000 U/min zentrifugiert, anschließend eine weitere Minute bei 14.000 U/min. Nun wurde das Reaktionsgefäß samt Inhalt verworfen und die Säulen jeweils in ein neues Gefäß überführt. Auf die Filter wurden dann vorsichtig 30 µl DEPC-Wasser pipettiert, die Säulen anschließend bei 10.000 U/min für eine Minute zentrifugiert und dabei die RNA aus dem Filter gewaschen. Nach Entsorgung der Säule wurden die Reaktionsgefäße verschlossen und sofort auf Eis überführt. Um die Konzentration der RNA in den Lösungen zu messen wurde das NanoDrop Gerät verwendet. Dafür wurden zuerst 2 µl RNase-freies Wasser auf den Probenhalter aufgetragen, die Messsonde abgesenkt und anschließend die Messung gestartet, um den Leerwert zu erhalten. Nach Entfernen des Wassers mit einem fusselfreien Tuch wurden dann 2 µl Probe auf den Probenhalter aufgetragen und wie zuvor gemessen, ebenso die weiteren Proben. Abschließend wurden der Probenhalter und die Messsonde mit RNase-freiem Wasser gereinigt. Der gemessene RNA-Gehalt der Proben in ng/µl wurde zur Berechnung des benötigten Volumens für die real-time PCR herangezogen, die Absorption der Proben bei 230, 260 sowie 280 nm Wellenlänge wurde verwendet um die Reinheit der Proben zu bestimmen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 zu 230 nm sowie 260 zu 280 nm sollte idealerweise bei 2,00 liegen, stark davon abweichende Werte deuten auf eine Verunreinigung der isolierten RNA hin. Bei erfolgreicher Aufreinigung wurde die RNA anschließend bei -80 °C eingelagert.

2.2.3.8. Herstellung cDNA

Für die Bestimmung des mRNA-Levels einzelner Proteine in den isolierten RNA-Proben (siehe Kapitel 2.2.3.7) mithilfe der real-time PCR (siehe Kapitel 2.2.3.9) musste die vorhandene RNA zuvor in cDNA umgeschrieben werden. Alle im Folgenden verwendeten Reagenzien wurden dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR entnommen.

Auf der mit RNase-ZAP gereinigten Arbeitsfläche wurden entsprechend der Anzahl der Proben RNase-freie PCR-Tubes mit 0,5 ml Volumen bereitgestellt und beschriftet. Basierend auf den gemessenen RNA-Konzentrationen wurden dann die Ansätze für die cDNA-Herstellung zusammenpipettiert, wobei die Ansätze entsprechend der geplanten PCR-Läufe für 3 µg RNA ausgelegt wurden. Zuvor wurde ein sogenannter Master-Mix (siehe Kapitel 2.1.6) hergestellt, wobei pro Probenansatz 18 µl Master-Mix benötigt wurden. Gemäß der berechneten RNA-Konzentration wurde von jeder Probe das entsprechende Volumen für 3 µg RNA in ein PCR-Tube überführt, dazu wurden dann 18 µl Master-Mix pipettiert und diese Lösung mit Nuclease-freiem Wasser auf 60 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach Verschließen der Tubes wurden diese mit dem Vortexer gemischt und dann kurz an zentrifugiert, um die Suspension am Boden des Tubes zu sammeln. Anschließend wurden die Tubes in den Thermocycler gestellt, der Deckel geschlossen und das Programm für die DNA-Synthese gestartet. Dabei wurden die Reaktionsansätze zuerst für zehn Minuten bei 25 °C inkubiert, danach für 30 Minuten bei 50 °C und abschließend fünf Minuten bei 85 °C. Die so gewonnene cDNA wurde nun bei -80 °C eingelagert.

2.2.3.9. real-time PCR

Zur möglichst ökonomischen Ausnutzung der für die real-time PCR verwendeten 96-Well-PCR-Platten bot es sich an, pro Lauf drei verschiedene Primer einzusetzen. Somit konnten pro Lauf jeweils die obligatorische Referenz (humanes GAPDH) und die mRNA von zwei Zielproteinen untersucht werden. Beim Einsatz von drei Primern und der vorgeschriebenen Untersuchung der Proben in drei technischen Replikaten war die Untersuchung von maximal zehn verschiedenen Proben pro PCR-Platte möglich, wodurch sich unter Berücksichtigung der Leerkontrollen eine maximale Gesamtzahl von 93 Ansätzen ergab. Entsprechend der tatsächlich zu untersuchenden Probenanzahl wurde das benötigte Volumen an Mastermix-Mix und Primer-Mix angesetzt (siehe Kapitel 2.1.6), woraufhin schließlich für jeden Dreifach-Ansatz in

einem eigenen 0,5 ml Reaktionsgefäß der Proben-Mix, bestehend aus 69 µl Primer-Mix und 6 µl cDNA (siehe Kapitel 2.2.3.8), angesetzt wurde. Für die Leerkontrollen wurde die cDNA durch 6 µl Nuclease-freies Wasser ersetzt. Die so vorbereiteten Proben wurden entsprechend dem zuvor angelegten Schema in die PCR-Platte überführt, wobei pro Well 20 µl Proben-Mix pipettiert wurden. Nach Auftragung aller Proben wurde die Platte mit einem Stück Optical Tape zugeklebt, welches mit einem Gummischaber fest angedrückt wurde, um die Wells luftdicht zu verschließen. Nun konnte die PCR-Platte in das PCR-Gerät eingesetzt werden, welches dann entsprechend der Probenbelegung programmiert wurde und innerhalb von etwa zwei bis drei Stunden die PCR durchführte. Die dabei aufgezeichneten Daten wurden durch das Gerät direkt verwertet, um die relativen Mengen der von den verwendeten Primern erkannten und vervielfältigten Ziel-Sequenzen zu berechnen. Das als Referenz verwendete GAPDH wurde dabei genutzt, um die Proben auf das theoretisch stets gleiche Grundniveau der Referenz zu normieren, die relativen Unterschiede in der Häufigkeit der untersuchten mRNA-Sequenzen wurden dann auf die gewählte Kontrolle, in aller Regel die unbehandelten Zellen, bezogen.

2.2.4. Histologische Methoden

2.2.4.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

Gefrierschnitte wurden mithilfe eines Kryostaten angefertigt, dessen Block- und Kammertemperatur auf -24 °C bzw. -22 °C geregelt waren. Zuerst wurden die in Cryomatrix eingebetteten *ex vivo* WHM unter ständiger Kontrolle bis in den mittigen Wundbereich zugeschnitten. Die zur Auswertung der Wundheilung entnommenen, 6 µm starken Gefrierschnitte aus der Mitte der Wunde wurden auf Superfrost/Plus-Objektträger aufgebracht und mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Sollten die Schnitte einer HE-Färbung unterzogen werden (siehe Kapitel 2.2.4.3), wurden sie danach bis zur Färbung bei -20 °C gelagert. Gefrierschnitte für Immunfluoreszenzfärbungen (siehe Kapitel 2.2.4.4) wurden nach dem Trocknen für 10 Minuten in -20 °C kaltem Aceton fixiert und dann bis zur weiteren Verarbeitung kurzfristig bei -20 °C oder längerfristig bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2. Anfertigung von Paraffinschnitten

Die in Paraffin eingebetteten Proben wurden zur Vorbereitung auf die auf ca. -8 °C vorgekühlte Kälteplatte gelegt. Das Paraffin-Streckbad wurde mit destilliertem Wasser

befüllt und vorgeheizt, das Kaltwasserbad wurde ebenfalls mit Aqua dest. befüllt und, wie auch im Streckbad, das Wasser so weit wie möglich von Luftblasen befreit. Auch der Objektträger-Streichtisch wurde bereits jetzt eingeschaltet, um die Streckplatte auf 42-45 °C vorzuwärmen. Zusätzlich konnten jetzt bereits einige beschichtete „Super-Frost“ Objektträger für die endgültige Aufnahme der Schnitte bereitgelegt und, sofern möglich, auch schon beschriftet werden. Nun wurde das Rotationsmikrotom eingeschaltet, der korrekte Schnittwinkel von ca. 2,5° kontrolliert und die gewünschte Schnittdicke, im Regelfall 5 µm, über das Bedienpult ausgewählt. Sofern noch nicht vorhanden wurde eine frische Klinge vorsichtig in die Halterung am Schneideblock eingespannt und der Schutzbügel wieder über die Schnittseite geklappt. Generell wurde die Sicherung der Schnittseite nur entfernt, wenn das Präparat geschnitten wurde, in allen anderen Situationen wurde der Schutzbügel zur Verhinderung von Verletzungen über die Klinge geklappt. Nach dem Bereitlegen der Pinsel und ein paar Blättern groben Zellstoffpapiers wurde der erste Paraffinblock von der Kälteplatte genommen und in die Spannklemme des Mikrotoms eingesetzt, wobei nach Möglichkeit auf eine einheitliche Ausrichtung aller Blöcke, bezogen auf die Orientierung der eingebetteten Probe, geachtet wurde. Nach Entfernen des Schutzbügels wurde der Paraffinblock durch Drehen am Handrad sowie bei Bedarf Justierung der Position des Schneideblocks möglichst nah an die Klinge gebracht, um die korrekte Ausrichtung zu überprüfen und gegebenenfalls durch Benutzung der Stellschrauben an der Probenhalteraufnahme nachzustellen. Wenn die Schnittfläche des Paraffinblocks parallel zur Klinge ausgerichtet war, konnten durch Betätigung des Handrads ein oder mehrere Schnitte vom Paraffinblock genommen werden. Bei noch ungeschnittenen Blöcken musste zuerst bis an die Probe herangeschnitten werden, wofür die Schnittdicke auf 20 µm erhöht wurde. Sobald die Probe selbst angeschnitten war, wurde ein Probeschnitt mit einem oder zwei angefeuchteten Pinseln in das Kaltwasserbad überführt, um sich dort zu entfalten. Sofern nicht direkt weitere Schnitte vom Paraffinblock gemacht wurden, wurde dieser aus der Spannklemme entfernt und mit der Schnittseite nach unten wieder auf die Kälteplatte gelegt. Der Probeschnitt wurde dann mithilfe eines sauberen Objektträgers vom Kaltwasserbad in das Warmwasserbad überführt um dort geglättet zu werden, und dann mit einem weiteren Objektträger aufgenommen. Nach Begutachtung unter dem Mikroskop wurden entweder weitere Schnitte gemacht und nach dem Warmwasserbad zur Färbung auf einen speziell beschichteten „Super-Frost Plus“ Objektträger aufgenommen, oder tiefer in die Probe geschnitten und mithilfe weiterer Probeschnitte nach der gewünschten Position gesucht. Nach der Aufnahme auf die Spezial-Objektträger wurde das überschüssige Wasser durch vorsichtiges Abklopfen und Abstreifen entfernt, die

Schnitte für etwa eine halbe Stunde auf der vorgeheizten Streckplatte getrocknet und dann für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur austrocknen lassen. Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Schnitte dann für mindestens 30 Minuten bei 55 °C im Wärmeschrank fixiert.

2.2.4.3. HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dient dem Anfärben verschiedener Strukturen eines Gewebeschnittes, im Besonderen färbt Hämatoxylin die Zellkerne und das raue ER blau, während Eosin das Zellplasma und die extrazelluläre Matrix rot anfärbt.

Zu Beginn der Färbung wurden die Objektträger mit den Gefrierschnitten für acht Minuten in filtriertes Hämatoxylin getaucht. Das Entfernen der überschüssigen Farbe sowie das Bläuen erfolgten durch 10-minütiges, vorsichtiges Spülen der Objektträger mit fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Objektträger kurz in A. dest. gespült, dann für 25 Sekunden in Eosin gefärbt und erneut kurz in A. dest. gespült. Nun wurden die Schnitte zur Entwässerung durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) geschleust, wobei die Schnitte in den ersten vier Stufen jeweils nur kurz gespült wurden. Daran schloss sich eine 5-minütige Inkubation in einer zweiten Küvette mit absolutem Ethanol an, gefolgt von zweimal zehn Minuten Inkubation in Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mit Eukitt und einem Deckgläschen eingedeckelt und über Nacht getrocknet. Zur Auswertung wurden die Schnitte unter dem Lichtmikroskop betrachtet und gegebenenfalls zur Dokumentation und Vermessung fotografiert.

2.2.4.4. Immunfluoreszenz-Färbung

Immunfluoreszenzfärbungen erlauben die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen in Gewebeschnitten durch Markierung der Proteine mit spezifischen Antikörpern, an die in einem weiteren Schritt ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wird. Die Kryoschnitte konnten direkt nach dem Auftauen verwendet werden, die Paraffinschnitte mussten dagegen noch vorbehandelt werden.

Zuerst wurden die Schnitte entparaffiniert und hydratisiert, indem sie, eingesetzt in in eine Färbewiege, hintereinander für je 20 Minuten in zwei Küvetten mit Xylolersatz inkubiert wurden. Anschließend wurden sie erst kurz in eine Küvette mit absolutem Ethanol getaucht, dann in eine weitere Küvette mit absolutem Ethanol für fünf Minuten inkubiert. Jeweils nur kurz folgte dann je eine Küvette mit 90-, 80- bzw. 70%igem

Ethanol, schließlich wurden die Schnitte kurz in einer Küvette mit A. dest. geschwenkt, um den Ethanol abzuspülen, und dann in einer zweiten Küvette mit A. dest. für 5 Minuten hydratisiert. Nun konnten die Antigene durch eine Hitzebehandlung demaskiert werden. Dazu wurden die Schnitte in die dafür vorgesehenen Färbewiegen mit Griff in die Mikrowellengefäße eingesetzt und die Gefäße zu $\frac{3}{4}$ mit dem entsprechenden Puffer, je nach Antikörper entweder TEC- oder Citrat-Puffer (siehe Kapitel 2.1.7), befüllt und mit ihrem Deckel verschlossen. Je nach Antikörper erfolgte dann die Hitzebehandlung, beispielsweise zweimal für je zehn Minuten bei 600 Watt, wobei zwischen den Zyklen gegebenenfalls verdunsteter Puffer nachgefüllt wurde. Nach der Behandlung wurde den Schnitten etwa eine halbe Stunde Zeit zum Abkühlen gewährt. Nun wurden die Schnitte, ebenfalls in Abhängigkeit vom gewünschten Antikörper, zweimal für jeweils drei oder fünf Minuten in Küvetten mit TBS-T oder PBS-Puffer gespült.

Während der Einsortierung der Objektträger in die Feuchtkammer wurden die Schnitte vorsichtig mit dem Pap Pen Stift umrandet, wobei auf einen Sicherheitsabstand zwischen der Umrandung und dem Schnitt geachtet wurde. Die Paraffinschnitte wurden nun je nach Größe mit 30 – 100 μ l der Trypsin-Gebrauchslösung bedeckt, für zehn Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank in der geschlossenen Feuchtkammer inkubiert und anschließend erst für 30 Sekunden in einer Küvette mit A. dest. gespült, und dann je nach Antikörper zweimal für je drei oder fünf Minuten in TBS-T bzw. PBS-Puffer. Vor der eigentlichen Färbung wurden die Kryo- und Paraffinschnitte, falls nötig, noch für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der geschlossenen Feuchtkammer mit einer entsprechenden Blocklösung inkubiert, die direkt vor dem Auftragen des Primärantikörpers durch vorsichtiges Abklopfen entfernt wurde. Die Färbungen wurden ebenfalls in der, stets durch Verschließen abgedunkelten, Feuchtkammer durchgeführt. Vorbereitend wurden Primär- und Sekundärantikörper entsprechend in PBS (siehe Kapitel 2.1.7) verdünnt, kurz durchmischt und für drei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nun erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper, von dem etwa 50 μ l auf jeden einzelnen Schnitt aufgetragen wurden, wobei Paraffinschnitte bei 4 °C über Nacht und Kryoschnitte in aller Regel für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte für einmal fünf und zweimal zehn Minuten in TBS-T bzw. PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Schnitte eine halbe Stunde mit je 50 μ l des Sekundär-Antikörpers inkubiert und anschließend fünf Minuten in entsprechendem Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Färbung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, indem die Objektträger, einsortiert in eine spezielle Halterung, für 60 Sekunden in eine DAPI-gefüllte Glasküvette (siehe Kapitel 2.1.7) getaucht wurden. Nach kurzem Abspülen des

überschüssigen Farbstoffs mit PBS folgten zwei weitere Waschschriffe in frischem PBS zu je fünf Minuten, und darauf zwei Waschriffe zu je drei Minuten in A. dest. Abschließend wurden die Schnitte mit Fluoromount G und einem Deckgläschen eingedeckelt und über Nacht bei RT ausgehärtet, danach kurzfristig bei 4 °C oder längerfristig bei -20 °C gelagert.

2.2.4.5. Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

Die gefärbten histologischen Schnitte (siehe Kapitel 2.2.5.3) wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet und bei Bedarf fotografiert. Bei der Auswertung der Lokalisation der untersuchten Proteine zeigten sich klare Muster, sodass die Beobachtungen in insgesamt 6 Kategorien zusammengefasst werden konnten. Die Lokalisation war demzufolge entweder beschränkt auf die oberste epidermale Schicht, das *Stratum granulosum*, oder war, von dort ausgehend, zunehmend verbreitert bis in das obere oder gesamte *Stratum spinosum*. Teilweise zeigten auch alle vitalen epidermalen Schichten, vom *Stratum granulosum* bis zum *Stratum basale*, eine Färbung durch den entsprechenden Antikörper. Bei Claudin-1 gab es zudem die Besonderheit, dass vereinzelt eine auf das *Stratum basale* und den unteren Bereich des *Stratum spinosum* beschränkte Färbung dokumentiert wurde. Komplette ungefärbte Präparate, in denen keine Expression des untersuchten Proteins nachgewiesen werden konnte, wurden ebenfalls beobachtet.

2.2.5. statistische Auswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte in Abhängigkeit von der Komplexität der zur Verfügung stehenden Angaben. Für den Vergleich der Protein-Expressionslevel und Proliferationsraten wurde der Student's t-Test für gepaarte Proben verwendet. Zur Analyse der Daten aus dem Scratch-Wundheilungsversuch, die einen Trend über den zeitlichen Verlauf des Experimentes hinweg abbildeten, wurde ein Random Intercept Model in SPSS modelliert. Somit konnten der Einfluss der verschiedenen Zellspender sowie die Interaktionen zwischen den unterschiedlichen siRNA-Behandlungen und den verwendeten Zellkulturmedien berücksichtigt werden. Die Auswahl der Variablen erfolgte schrittweise über die Reduktion eines Ausgangsmodells, das alle grundlegenden festen Effekten sowie deren mögliche Interaktionen miteinander beinhaltete. Zu den festen Effekten gehörten das Zellkulturmedium, die seit dem Setzen der Scratchwunde verstrichene Zeit, die anfängliche Wundgröße sowie die siRNA-Behandlung. Nach der Reduktion verblieben außerdem die Interaktion zwischen

Medium und Behandlung sowie die beiden Dreifach-Interaktionen von Medium, Behandlung und Zeit bzw. Zeit, Zeit (damit eingehend als quadratischer Effekt zur Modellierung einer Sättigung) und Behandlung. Als zufällige Effekte flossen die Zelllinie, die Wellposition sowie die Position des Messpunktes (also des Fotos) in das Modell ein. Dabei wurde die Fotoposition im Well genestet, d.h. innerhalb eines Wells wurde eine geringere Streuung der Werte an den verschiedenen Fotopositionen erwartet als zwischen verschiedenen Wells. Zusätzlich wurde die Wellposition innerhalb der Zelllinie genestet, da jede Zelllinie auf einer anderen Platte ausgesät wurde und somit eventuelle Abweichungen durch Unterschiede in der Zellkulturplatte berücksichtigt werden konnten. Diese Nestung der Wellposition wurde auch bei der Nestung der Fotopositionen berücksichtigt. Zur Korrektur der Alphafehler-Kumulierung bei der Durchführung von Mehrfachvergleichen wurde die konservative Bonferroni-Methode benutzt, welche jeden ermittelten p-Wert mit der Anzahl der durchgeführten Vergleiche multipliziert. Erst danach wurden die p-Werte mit Hinblick auf das Signifikanzniveau überprüft, welches für alle Tests bei $p < 0,05$ angesetzt wurde. Für eine beispielhafte Syntax siehe Anhang.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung von chronischen Wunden im Vergleich zu normal heilenden Wunden

3.1.1. Lokalisation und Expression der TJ-Moleküle in normalen und chronischen Wunden

Zur Untersuchung der Lokalisation und Expression der TJ-Moleküle in chronischen Wunden standen 13 Proben aus Ulcera von Patienten zur Verfügung (siehe Kapitel 2.1.8.4), zur Untersuchung der akuten Wundheilung sechs humane *ex vivo* WHM und zwei humane *in vivo* Wunden im frühen Wundheilungsstadium (gemessene Reepithelialisierung max. 25 %).

3.1.1.1. Claudin-1

In Übereinstimmung mit der Literatur konnte Claudin-1 über Immunfluoreszenzfärbungen in allen vitalen epidermalen Schichten nachgewiesen werden, wobei das Protein vor allem membranständig lokalisiert ist (siehe Abb. 3.2).

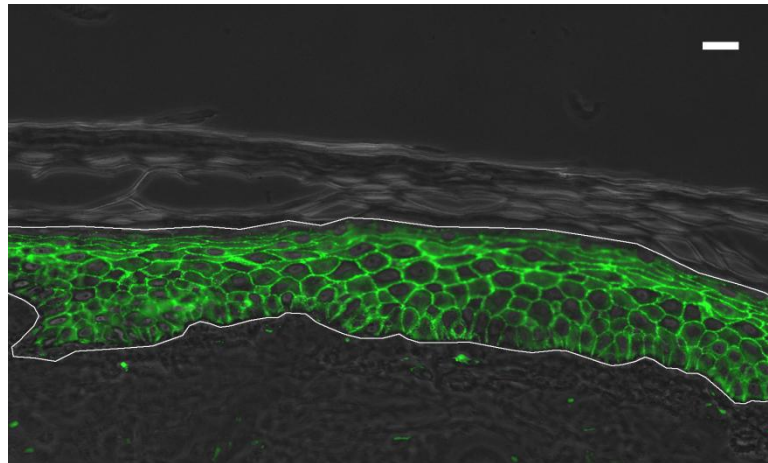


Abb. 3.1 Lokalisation von Claudin-1 in unverwundeter Haut

Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-1 (grün) in unverwundeter Haut in Überlagerung mit dem Phasenkontrastbild. Die weißen Linien markieren die Umrisse der vitalen Schichten der Epidermis (S. basale bis S. granulosum). Skala = 20 μ m

Die humanen *ex vivo* WHM zeigten in dem untersuchten frühen Wundheilungsstadium sowohl in der unbeteiligten Epidermis als auch am Wundrand sowie in der regenerierenden Epidermis jeweils in allen Schichten eine positive Färbung für

Claudin-1 (siehe Abb. 3.1 und Abb. 3.3). Und auch die Auswertung der zwei Biopsien aus akuten humanen Wunden bestätigte die Erkenntnis, dass Claudin-1, regulär in

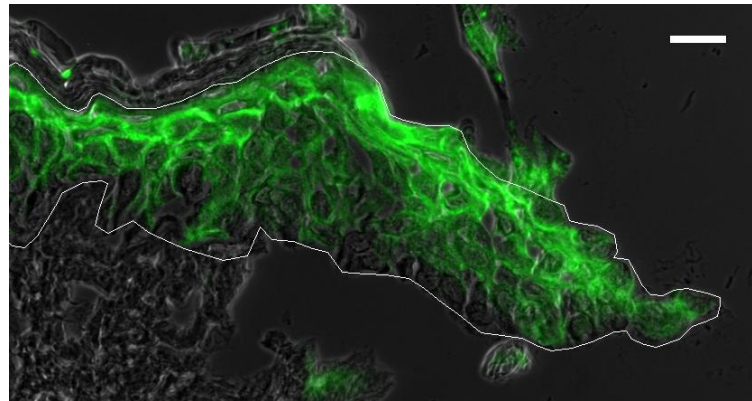


Abb. 3.2 Lokalisation von Claudin-1 in einer akuten Wunde

Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-1 (grün) in Überlagerung mit dem Phasenkontrastbild am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis einer akuten humanen Wunde. Die weißen Linien markieren die Umrisse der vitalen Schichten der Epidermis (S. basale bis S. granulosum). Skala = 20 µm allen vitalen Schichten der Epidermis lokalisiert, auch in Wunden mit geringem Wundheilungsfortschritt in der gesamten Epidermis vorhanden war. Generell ist darüber hinaus anzumerken, dass in einigen Fällen die vordersten Zellen der regenerierenden Epidermis negativ für Claudin-1 waren, auch wenn der überwiegende Rest der Neoepidermis eine positive Färbung für das Protein zeigte.

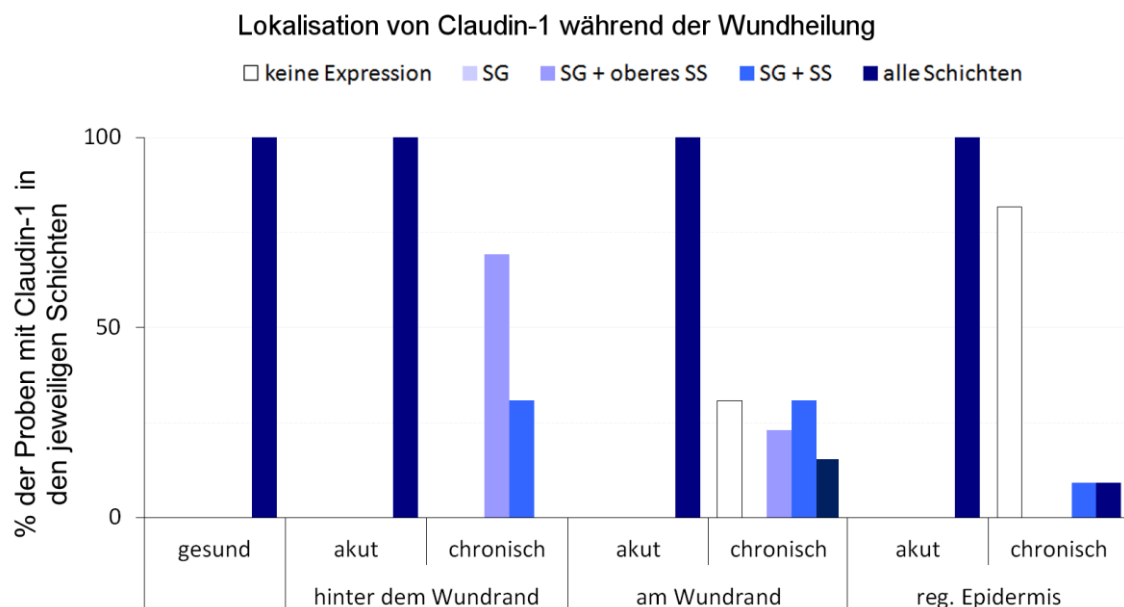


Abb. 3.3 Lokalisation von Claudin-1 in akuten und chronischen humanen Wunden

Lokalisation von Claudin-1 in akuten humanen Wunden (*ex vivo* WHM) mit geringer Wundheilung (< 50 % Reepithelialisierung) im Vergleich zur Situation in chronischen Wunden mit vergleichbarer Reepithelialisierung. n = 6,6,13,6,13,4,11 (v. l. n. r.)

Im Gegensatz dazu offenbarte sich bei Betrachtung der chronischen Wunden eine ganz andere Verteilung des Proteins. Schon in den Bereichen hinter dem Wundrand, wo sich in akuten Wunden Claudin-1 stets in allen Schichten der Epidermis

nachweisen ließ, fiel eine veränderte Expression auf. In fast einem Drittel aller untersuchten Wunden war das TJ-Protein nur vom *Stratum granulosum* bis zum *Stratum spinosum* nachweisbar, im *Stratum basale* hingegen konnte kein Claudin-1 nachgewiesen werden. Die verbleibende Mehrheit der Proben zeigte eine noch weiter eingeschränkte Lokalisation des Proteins, welches sich dort nur noch im *Stratum granulosum* und dem oberen *Stratum spinosum* zeigte (siehe Abb. 3.3). Am Wundrand zeigten sich die Veränderungen noch stärker ausgeprägt, und in nur 15 % der

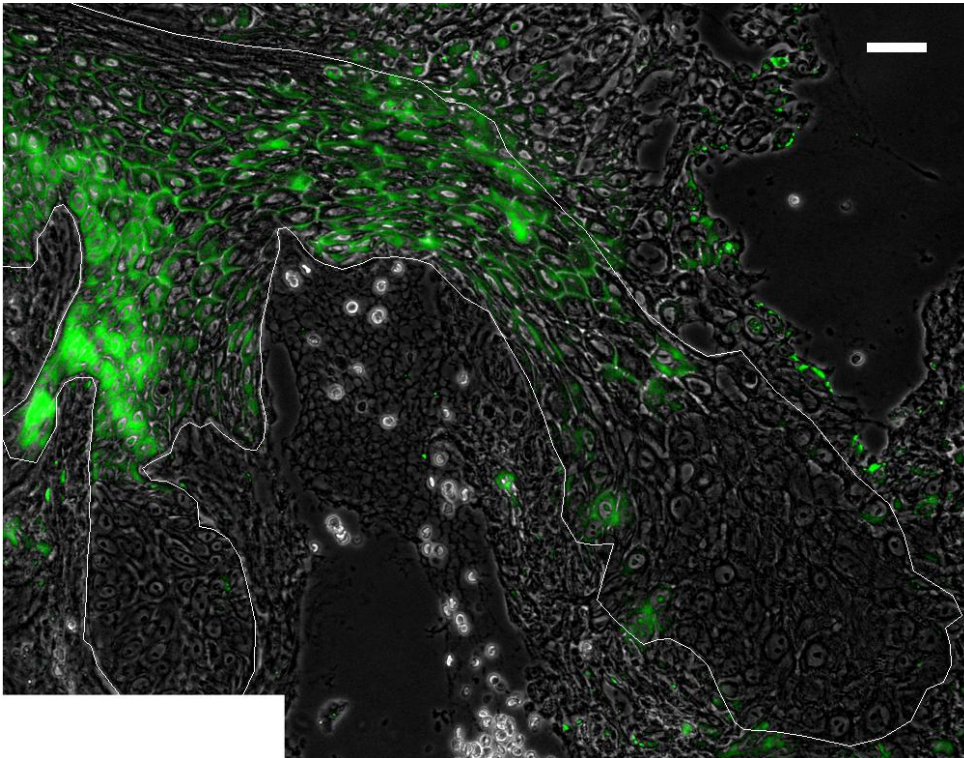


Abb. 3.4 Lokalisation von Claudin-1 in einer chronischen Wunde

Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-1 (grün) am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis einer chronischen Wunde. Die weiße Linie markiert die Umriss der vitalen Schichten der Epidermis (*S. basale* bis *S. granulosum*). Skala = 20 µm

untersuchten Proben konnte Claudin-1 in allen vitalen epidermalen Schichten nachgewiesen werden. In rund 30 % der Fälle war das *Stratum basale* frei von Claudin-1, und bei weiteren 23 % zeigte sich zusätzlich auch das untere *Stratum spinosum* negativ. Die übrigen Proben zeigten sich komplett frei von Claudin-1 (siehe Abb. 3.3). Dieser Trend zu einer eingeschränkten Expression von Claudin-1 setzte sich in der Wundzunge fort, wo sich über 80 % der untersuchten Proben nach der Immunfluoreszenzfärbung bis auf wenige vereinzelte positive Signale komplett negativ für Claudin-1 zeigten (siehe Abb. 3.4). In jeweils einer Probe (je 9 %) konnte das Protein allerdings noch in allen Schichten bzw. vom *Stratum granulosum* bis in das komplette *Stratum spinosum* angefärbt werden (siehe Abb. 3.3).

3.1.1.2. Occludin

Unverletzte Haut zeigte, wie bereits in der Literatur beschrieben (Pummi et al., 2001; Brandner et al., 2002; Malminen et al., 2003; Rachow et al., 2013), eine Expression von Occludin, die stets auf das *Stratum granulosum* beschränkt war (siehe Abb. 3.5).

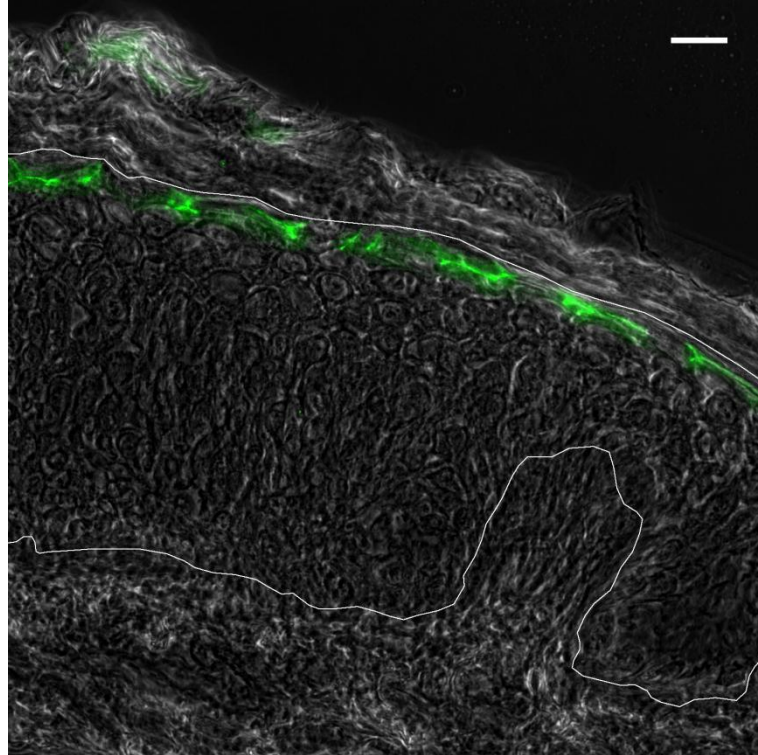


Abb. 3.5 Lokalisation von Occludin in unverletzter Haut

Immunfluoreszenzfärbung von Occludin (grün) in unverwundeter humaner Haut, überlagert mit dem Phasenkontrastbild. Die weißen Linien markieren die Umrisse der vitalen Schichten der Epidermis (*S. basale* bis *S. granulosum*). Skala = 20 μm .

Die Untersuchung der humanen *ex vivo* WHM zeigte für das Areal hinter dem Wundrand eine auf das *Stratum granulosum* beschränkte Expression von Occludin (siehe Abb. 3.7). Am Wundrand selbst (siehe Abb. 3.6, oberes Panel) fand sich in einer der sechs Proben eine verbreiterte Lokalisation vom *Stratum granulosum* bis in das obere *Stratum spinosum*, und in der regenerierenden Epidermis war, sofern diese mehrere Schichten aufwies, schließlich nur noch in zwei der vier Proben Occludin nur im *Stratum granulosum* lokalisiert. Jeweils eine der Proben zeigte sich in diesem Bereich der Wunde nahezu vollständig positiv bzw. negativ in der Färbung für das TJ-Protein (siehe Abb. 3.7). In dem einschichtigen Bereich der Neopidermis war Occludin, sofern es exprimiert wurde, quasi in basalen Zellen vorhanden (siehe Abb. 3.6, unteres Panel). Die Untersuchung der zwei Biopsien aus akuten humanen Wunden zeigte am Wundrand und dahinter eine Beschränkung der Lokalisation von Occludin auf das *Stratum granulosum*, in der regenerierenden Epidermis zeigte sich

eine Probe komplett positiv, bei der anderen war Occludin weiterhin auf das *Stratum granulosum* beschränkt. Und wie auch bei Claudin-1 muss für die Lokalisation von

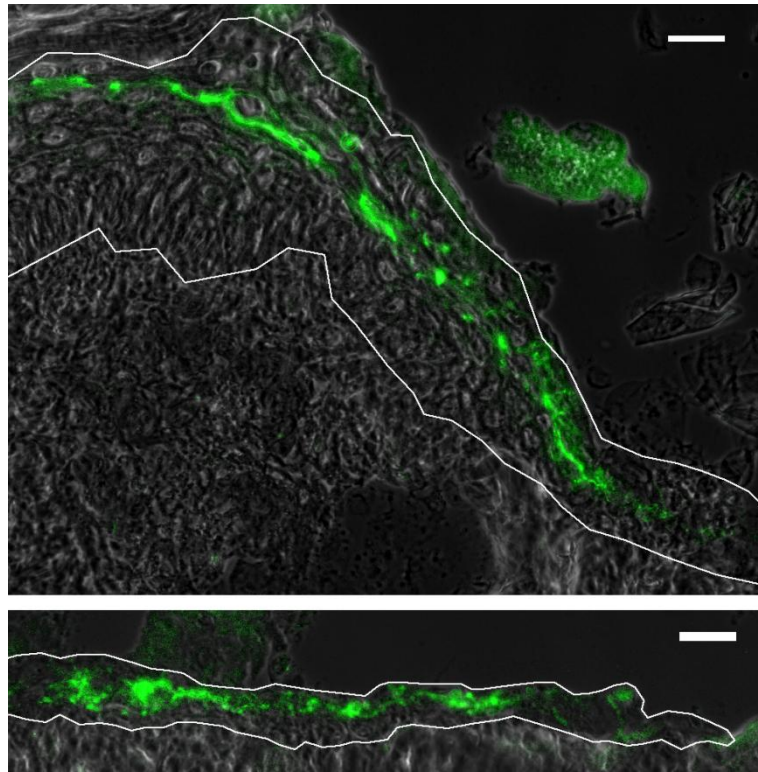


Abb. 3.6 Lokalisation von Occludin in einer akuten Wunde

Immunfluoreszenzfärbung von Occludin (grün) am Wundrand (oberes Panel) und in der regenerierenden Epidermis (unteres Panel) einer akuten humanen Wunde, hinterlegt mit dem Phasenkontrastbild. Die weißen Linien markieren den Umriss der vitalen Schichten der Epidermis (*S. basale* bis *S. granulosum*). Skala = 20 μ m.

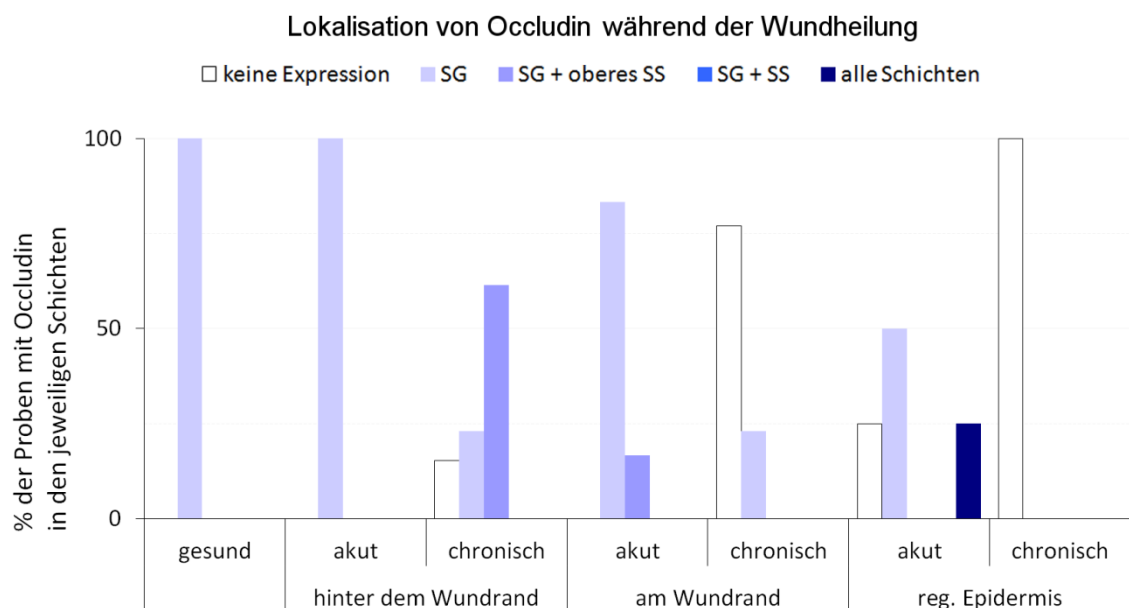


Abb. 3.7 Lokalisation von Occludin in akuten und chronischen Wunden

Lokalisation von Occludin in akuten humanen Wunden (*ex vivo* WHM) mit geringem Wundheilungsfortschritt (<50 % Reepithelialisierung) im Vergleich zur Situation in chronischen Wunden mit vergleichbarer Länge der regenerierten Epidermis. n = 6,6,13,6,13,4,11 (v. l. n. r.)

Occludin angemerkt werden, dass sich in einigen Proben die vordersten Zellen der regenerierenden Epidermis negativ zeigten, auch wenn die Neoepidermis an sich eine Expression des Proteins aufwies.

Bei den chronischen Wunden stellte sich die Lokalisation von Occludin anders dar. (siehe Abb. 3.7 und Abb. 3.8). Im Bereich hinter dem Wundrand war in 15 % der Proben kein Occludin mehr nachweisbar, 23 % der Proben zeigten die reguläre, auf das *Stratum granulosum* beschränkte Expression, und in rund 61 % aller Fälle war Occludin sowohl im *Stratum granulosum* als auch dem oberen *Stratum spinosum* lokalisiert. Am Wundrand ließ sich dann in fast 80 % der untersuchten Proben kein Occludin mehr nachweisen, während es in den restlichen Proben auf das *Stratum granulosum* beschränkt war. Die regenerierende Epidermis selbst war in fast allen ausgewerteten Proben vollständig negativ (siehe Abb. 3.7 und Abb. 3.8). In einem Fall war in direkter Nähe zum Wundrand Occludin nachweisbar, der überwiegende Teil der neugebildeten Epidermis allerdings war negativ und wurde daher auch als negativ in die Wertung aufgenommen.

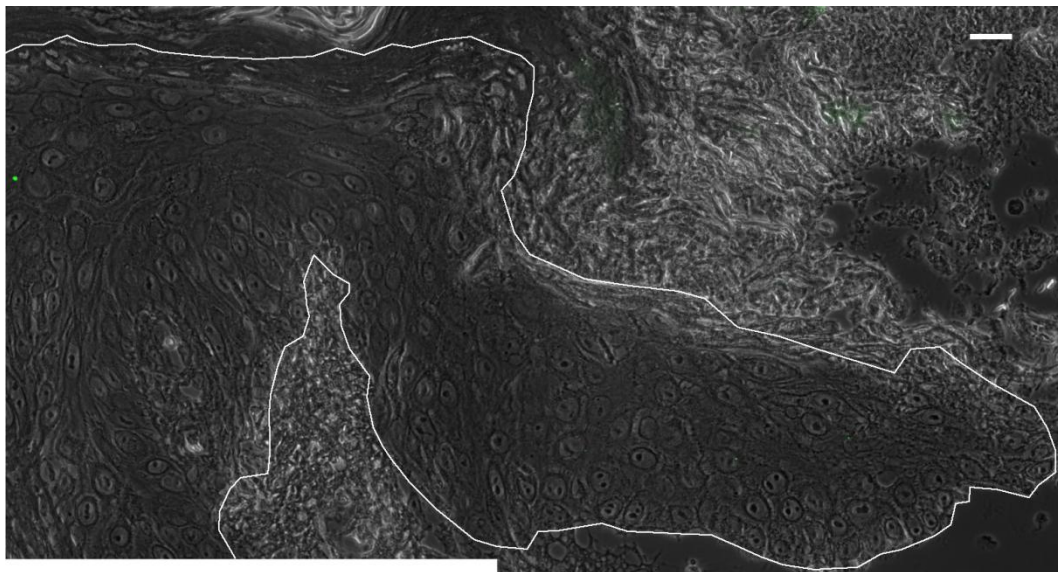


Abb. 3.8 Lokalisation von Occludin in einer chronischen Wunde

Immunfluoreszenzfärbung von Occludin (grün) in Überlagerung mit dem Phasenkontrastbild am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis einer chronischen Wunde. Die weißen Linien markieren die Umrisse der vitalen Schichten der Epidermis (*S. basale* bis *S. granulosum*). Skala = 20 μ m

3.1.1.3. ZO-1

Die Untersuchung von Proben aus unverwundeter Haut zeigte, dass ZO-1 regulär meist im *Stratum granulosum* lokalisiert war (siehe Abb. 3.9), sich teilweise aber auch zusätzlich noch im oberen *Stratum spinosum* zeigte. Wie schon für Claudin-1 und Occludin ergab sich damit eine Übereinstimmung mit der bekannten Literatur (Pummi et al., 2001; Brandner et al., 2002; Rachow et al., 2013).

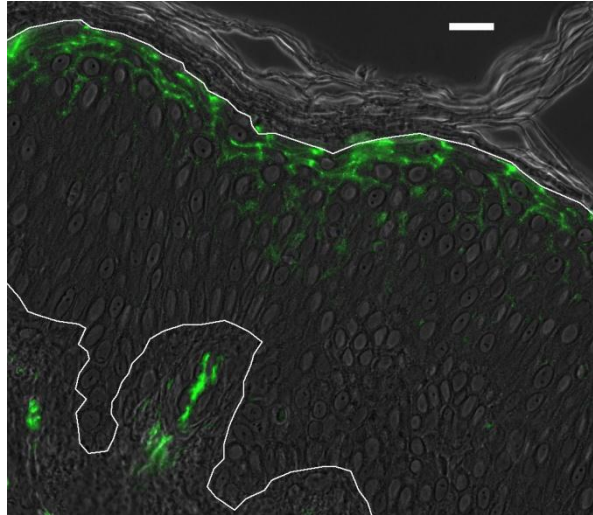


Abb. 3.9 Lokalisation von ZO-1 in unverwundeter Haut

Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 (grün) in unverwundeter humaner Haut, unterlegt mit dem Phasenkontrastbild. Die weißen Linien markieren die Umrise der vitalen Schichten der Epidermis (S. basale bis S. granulosum). Skala = 20 µm

Hinter dem Wundrand zeigten die humanen *ex vivo* WHM, wie auch unverwundete Haut, ZO-1 überwiegend im *Stratum granulosum*, mit einigen Verbreiterungen ins obere *Stratum spinosum*. Direkt am Wundrand häufte sich diese Verbreiterung, und nur eines der untersuchten Modelle zeigte dort ZO-1 einzig im *Stratum granulosum*. In drei Fällen war ZO-1 darüber hinaus auch noch im oberen *Stratum spinosum* zu finden, und wiederum ein Modell war sowohl im *Stratum granulosum* als auch dem gesamten *Stratum spinosum* positiv für ZO-1 (siehe Abb. 3.12). In der regenerierenden Epidermis konnte bei einem der WHM kein ZO-1 nachgewiesen werden, ein weiteres zeigte ZO-1 im *Stratum granulosum* und dem gesamten *Stratum spinosum*. Die Mehrheit der

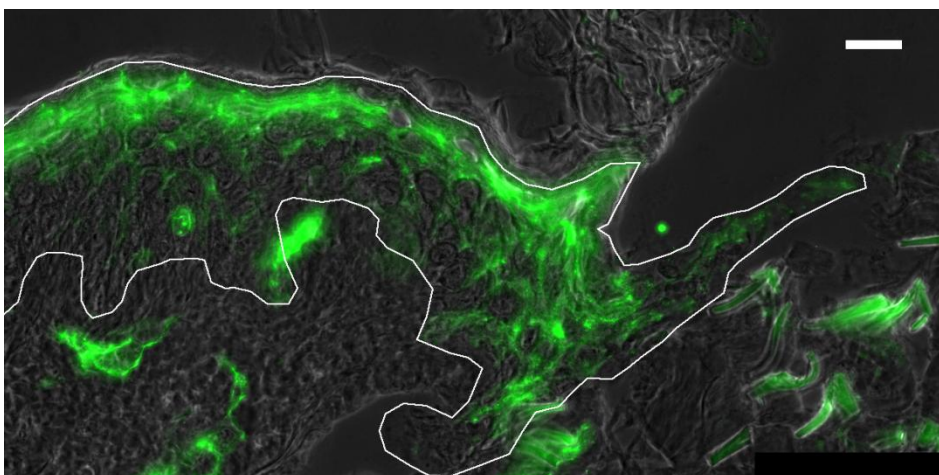


Abb. 3.10 Lokalisation von ZO-1 in einer akuten Wunde

Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 (grün) in Überlagerung mit dem Phasenkontrastbild am Wundrand und in der Neoepidermis einer akuten humanen Wunde. Die weiße Linie markiert den Umriss der vitalen Schichten der Epidermis (S. basale bis S. granulosum). Skala = 20 µm

Proben wies ZO-1 in der gesamten Neoepidermis auf (siehe Abb. 3.12). In den zwei Biopsien von akuten *in vivo* Wunden ließ sich ZO-1 hinter dem Wundrand ebenfalls nur im *Stratum granulosum* bzw. leicht verbreitert im oberen *Stratum spinosum* nachweisen, am Wundrand selbst erschien es deutlich verbreitert bis in das *Stratum spinosum* bzw. *Stratum basale*. In der regenerierenden Epidermis ließ sich ZO-1 in allen Schichten nachweisen, wenn auch bei einem Modell nicht vollständig bis zu den vordersten Zellen.

In den untersuchten chronischen Wunden (exemplarisch siehe Abb. 3.11) war ZO-1 bereits im Bereich hinter dem Wundrand deutlich anders lokalisiert als in normaler Haut oder akuten Wunden (siehe Abb. 3.12). Nur 8 % zeigten ZO-1 beschränkt auf das *Stratum granulosum*, weitere 8 % eine leicht verbreiterte Lokalisation im *Stratum granulosum* und dem oberen *Stratum spinosum*. Die überwiegende Mehrheit von 75 % aller Proben war sowohl im *Stratum granulosum* als auch dem gesamten *Stratum spinosum* positiv für ZO-1, und in wiederum 8 % der Fälle ließ sich ZO-1 in allen epidermalen Schichten nachweisen.

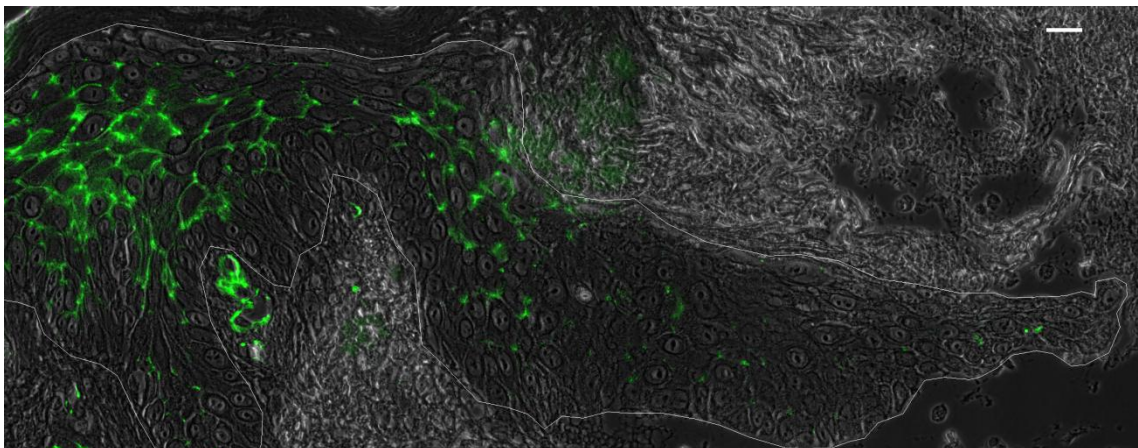


Abb. 3.11 Lokalisation von ZO-1 in einer chronischen Wunde

Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 (grün) am Wundrand und der regenerierenden Epidermis einer chronischen Wunde, überlagert mit dem Phasenkontrastbild. Die weiße Linie markiert den Umriss der vitalen Schichten der Epidermis (*S. basale* bis *S. granulosum*). Skala = 20 µm

Am Wundrand selbst stellte sich die Situation recht gemischt dar. In annähernd der Hälfte aller Proben war ZO-1 im *Stratum granulosum* und dem gesamten *Stratum spinosum* nachweisbar, in rund einem weiteren Viertel war sogar die gesamte Epidermis positiv für ZO-1. Fast ein Sechstel der Proben zeigte ZO-1 dagegen beschränkt auf das *Stratum granulosum*, und jeweils 8 % waren komplett frei von ZO-1 bzw. hatten eine auf das *Stratum granulosum* und obere *Stratum spinosum* beschränkte Lokalisation (siehe Abb. 3.12). Die regenerierende Epidermis der chronischen Wunden war in der Hälfte aller untersuchten Fälle vollständig negativ für ZO-1, ein Drittel der Wunden hingegen war sowohl im *Stratum granulosum* als auch dem gesamten *Stratum spinosum* positiv für ZO-1. In jeweils einem Fall war ZO-1

entweder in allen epidermalen Schichten nachweisbar oder aber beschränkt auf das *Stratum granulosum* und das obere *Stratum spinosum* (siehe Abb. 3.12).

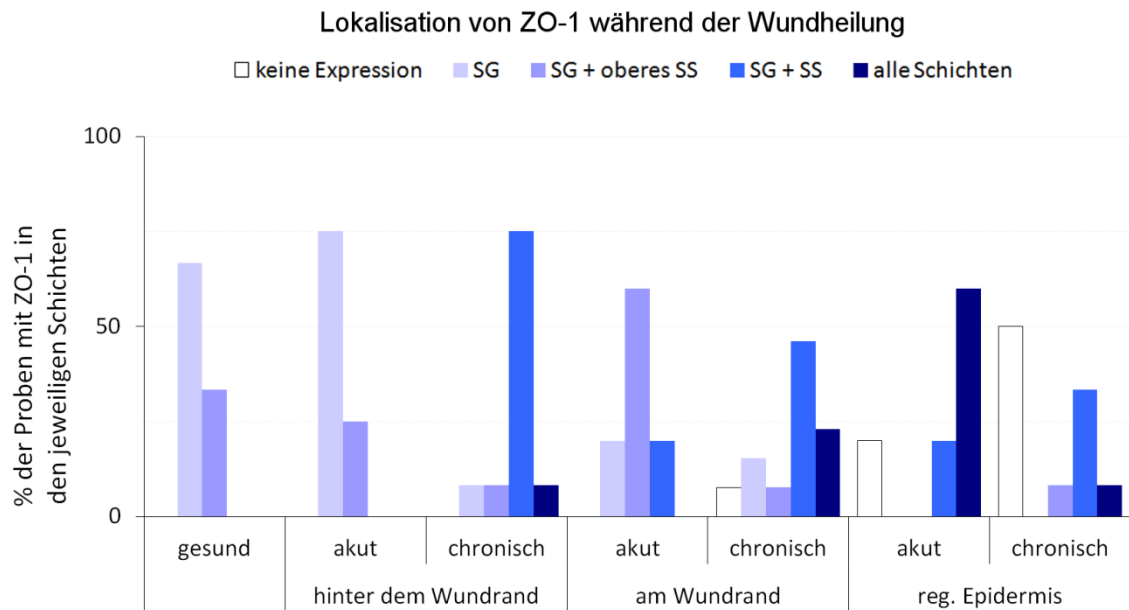


Abb. 3.12 Lokalisation von ZO-1 in akuten und chronischen humanen Wunden

Lokalisation von Occludin in akuten humanen Wunden (*ex vivo* WHM) mit geringem Wundheilungsfortschritt (<50 % Reepithelialisierung) im Vergleich zur Situation in chronischen Wunden mit vergleichbarer Reepithelialisierung. n = 6,6,13,6,13,5,11 (v. l. n. r.)

3.2. Auswirkungen des Knockdowns von TJ-Proteinen

Da die Untersuchung der Hautproben aus chronischen Wunden von Patienten deutlich veränderte Lokalisationsmuster mit häufig verminderter Expression für die untersuchten TJ-Proteine gezeigt hatte, wurden anschließend in *in vitro*-Experimenten mit primären humanen Keratinozyten die Auswirkungen eines Verlustes der verschiedenen TJ-Proteine erforscht. Im Mittelpunkt standen dabei zellphysiologische Vorgänge mit Relevanz für die Wundheilung, wie zum Beispiel die Proliferation und die Migrationsfähigkeit. Um eventuelle Auswirkungen der grundlegenden siRNA-Behandlung berücksichtigen zu können wurden zwei unterschiedliche Kontroll-siRNAs eingesetzt, die „AllStars Negative Control“ (AS) sowie die „Negative Control“ (NeKo). Zusätzlich wurden die Scratch-Assays zum größten Teil parallel in zwei verschiedenen Kulturmedien, DermaLife (DL) und Keratinocyte Growth Medium (KGM), durchgeführt. Diese Entscheidung beruhte auf dem Wissen, dass Keratinozyten zum Teil unterschiedlich auf verschiedene Medien reagieren (Zorn-Kruppa et al., 2016), weshalb die zentrale Frage der Auswirkung eines TJ-Protein-Knockdowns auf die Scratchwundheilung mit beiden Medien untersucht wurde, um mögliche Abweichungen in den Ergebnissen mit medienabhängigen Unterschieden zwischen den Zellen abzugleichen und so die beobachteten Effekte genauer beurteilen zu können. Sofern nicht explizit erwähnt wurden alle Experimente mit niedrigen Calcium-Konzentrationen im Medium durchgeführt (DL: 0,05 mM; KGM: 0,06 mM). Alle angegebenen relativen Proteinmengen beziehen sich, sofern nicht explizit erwähnt, auf den als 100 % gesetzten Wert der unbehandelten Kontrolle.

3.2.1. Einfluss des Mediums auf die Keratinozyten

Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, dass die Keratinozyten unbeeinflusst von der Wahl des Kulturmediums eine nahezu gleiche Proliferationsaktivität im untersuchten Bereich, dem Rand der Scratchwunden, zeigten (KGM: 93 % \pm 2 %; DL: 95 % \pm 3 %; siehe Abb. 3.13 a) und sich auch die Geschwindigkeit der Wundheilung von unbehandelten Zellen nur sehr geringfügig und nicht signifikant voneinander unterschied (siehe Abb. 3.13 b). Die Untersuchung der Proteinmengen zeigte signifikant geringere Mengen von Occludin (in KGM: 37 % \pm 42 % von DL; $p = 0,015$) bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM, für Claudin-1 und ZO-1 ergaben sich nur leichte, nicht-signifikante Verringerungen der Proteinmengen im Vergleich zur Kultivierung in DL (siehe Abb. 3.14). Die Unterschiede in der KD-Effizienz zwischen

den beiden Medien sind für jede siRNA-Behandlung einzeln im entsprechenden Kapitel aufgeführt.

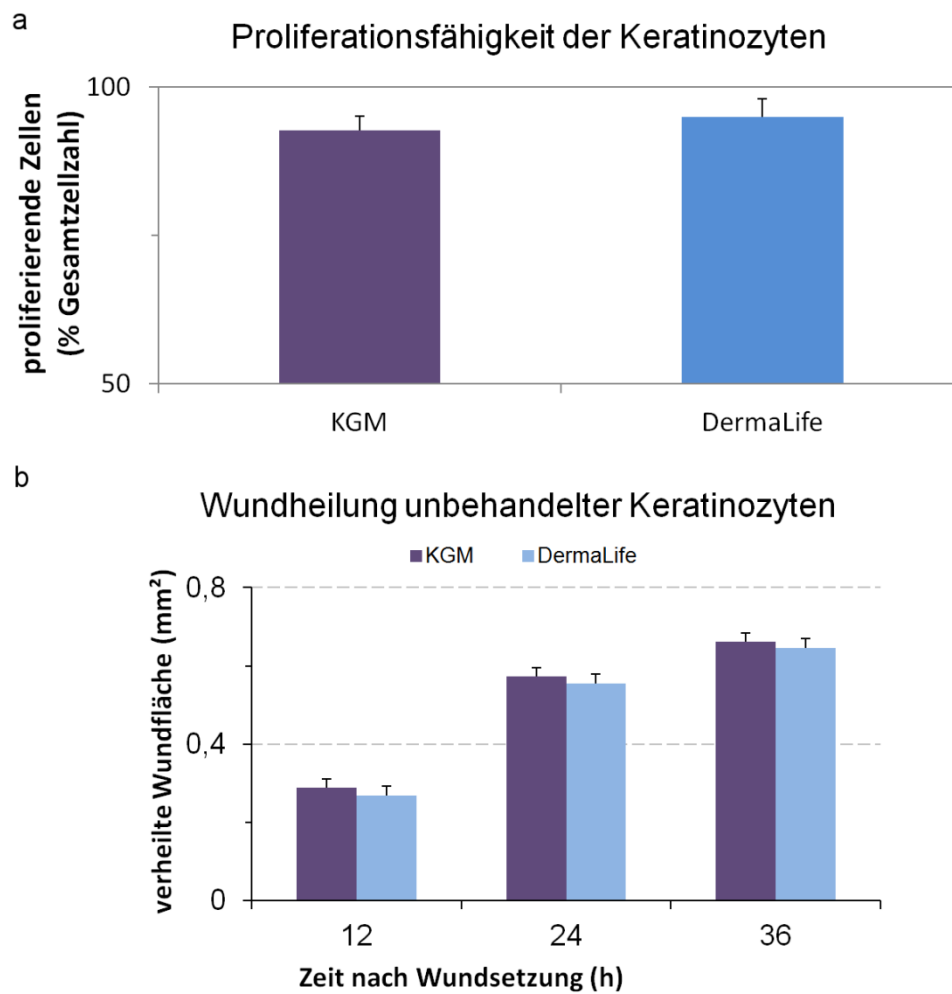


Abb. 3.13 Einfluss der Zellkulturmedien auf Proliferation und Wundheilung

Durchschnittlicher Anteil (mit Standardabweichung) Ki67-positiv gefärbter und damit proliferativ aktiver Keratinozyten am Wundrand der Scratchwunden unbehandelter Zellen 24 Stunden nach Verwundung (**a**) bzw. durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) unbehandelter Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung des Monolayers (**b**) im Vergleich zwischen den beiden Medien KGM und DermaLife. n = 8 (**a**) bzw. 16 (KGM) und 13 (DL) (**b**)

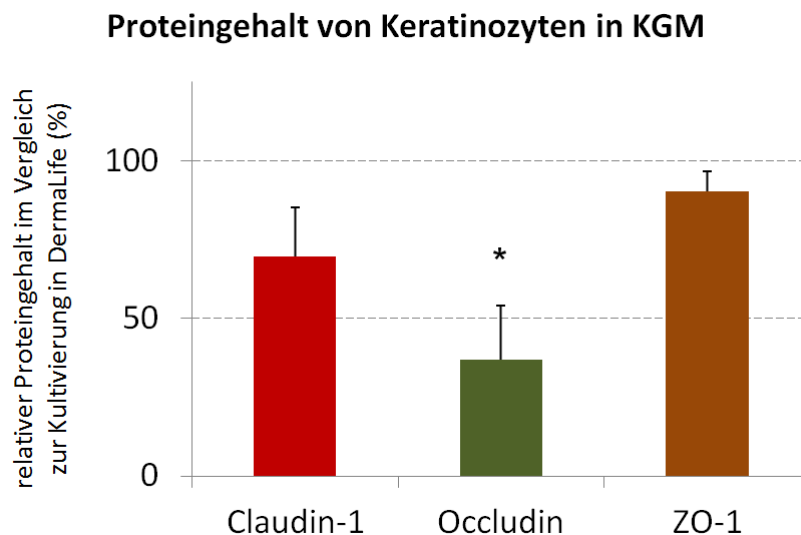


Abb. 3.14 Einfluss der Zellkulturmedien auf die TJ-Proteinexpression

Mittlere relative Proteinlevel (inkl. Standardfehler) der drei TJ-Proteine Claudin-1, Occludin und ZO-1 in Proteinisolaten von Keratinozyten, die in KGM kultiviert wurden, im Vergleich zu den Werten der Proteinisolate derselben Zelllinien bei Kultivierung in DL. Der in den Proteinextrakten der DL-Zellen bestimmte Proteingehalt wurde auf 100 % gesetzt. Signifikante Unterschiede zwischen den Proteinwerten der Medien sind mit einem * entsprechend dem Signifikanzniveau gekennzeichnet. n = 6; * p < 0,05

3.2.2. Einfluss der Negativ-siRNA-Kontrollen auf die Keratinozyten

Zur Bestimmung des Einflusses des grundlegenden Mechanismus der siRNA-Behandlung der Keratinozyten auf die verschiedenen untersuchten Parameter wurden die Zellen mit zwei verschiedenen Kontroll-siRNAs inkubiert. Wie bereits erwähnt wurde für diesen Zweck die zwei als Negativ-Kontrollen verkauften non-target siRNAs AS bzw. NeKo der Firma Qiagen ausgewählt, um als Kontrollbehandlung verwendet zu werden. Die NeKo-siRNA ist gegen die Zielsequenz AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT gerichtet, für die laut Herstellerinformation kein Zielgen bekannt ist. Die Sequenz der AS-siRNA ist aus patentrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht, laut Qiagen handelt es sich aber um eine überaus gründlich kontrollierte Negativkontrolle ohne Homologie zu irgendeinem bekannten Säugetier-Gen und mit nur minimalen unspezifischen Effekten.

3.2.2.1. Einfluss auf die Proliferation und Scratchwundheilung

Der relative Anteil proliferativ aktiver Zellen am Wundrand der verletzten Keratinozyten-Monolayer zeigte sich durch die Inkubation der Zellen mit den beiden Kontroll-siRNAs überwiegend marginal und nicht statistisch signifikant beeinflusst, nur in DermaLife kam es bei Verwendung der NeKo-siRNA zu einer signifikanten Verringerung des relativen Anteils proliferierender Zellen (siehe Abb. 3.15). Die Wundheilung im Scratch-

Assay war nach Applikation der Kontroll-siRNAs etwas verringert im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, wobei dieser Effekt bei der NeKo-siRNA deutlicher war als bei Verwendung der AS-siRNA (siehe Abb. 3.16).

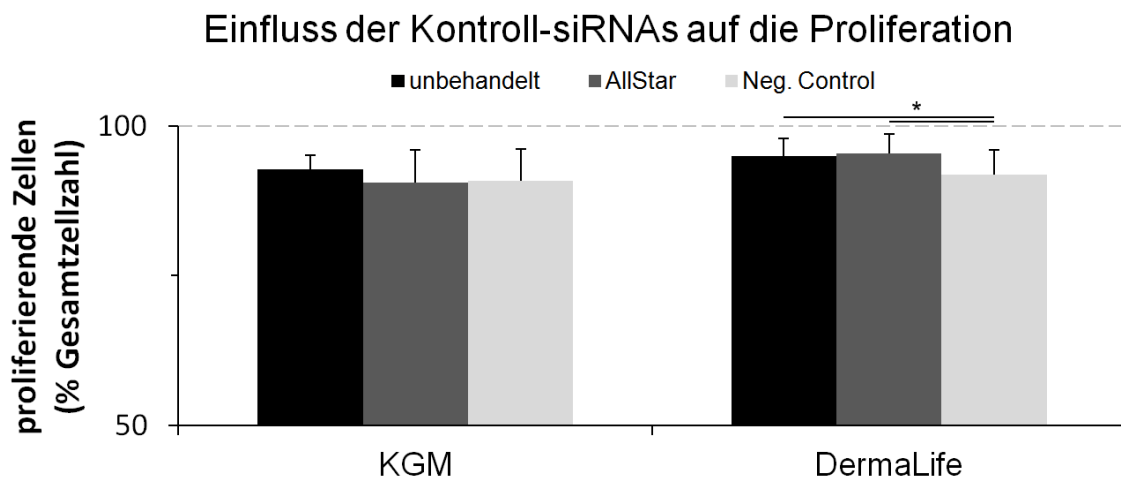


Abb. 3.15 Einfluss der siRNA-Kontrollen auf die Proliferation

Durchschnittlicher Anteil (mit Standardabweichung) Ki67-positiv gefärbter und damit proliferativ aktiver Keratinozyten am Wundrand der Scratchwunden 24 Stunden nach Verwundung im Vergleich der verschiedenen Kontrollbehandlungen in beiden Medien. Signifikante Unterschiede sind entsprechend ihrem Signifikanzniveau mit einem * gekennzeichnet. n = 8; * p < 0,05

Statistische Signifikanz erreichte der Unterschied in der verheilten Wundfläche vor allem, wenn die Keratinozyten in KGM kultiviert wurden. Unter diesen Bedingungen zeigte sich zu allen drei untersuchten Zeitpunkten, also 12, 24 und 36 Stunden nach Wundsetzung, eine im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen signifikant kleinere verheilte Wundfläche bei Einsatz der NeKo-siRNA, und zu 24 Stunden darüber hinaus auch bei Verwendung der AS-siRNA (p < 0,001). Ebenfalls nur an diesem einen Zeitpunkt, 24 Stunden nach Wundsetzung, war der Unterschied zwischen den beiden Kontroll-siRNAs signifikant, wobei die mit NeKo-siRNA behandelten Zellen wie bereits erwähnt eine kleinere verheilte Wundfläche aufwiesen. Wurden die Zellen in DermaLife kultiviert, war nur 24 Stunden nach Wundsetzung, und auch nur bei Einsatz der NeKo-siRNA, ein signifikanter Unterschied in der verheilten Wundfläche messbar im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (p = 0,002). Bei Inkubation der Zellen im Hoch-Calcium-Medium führte die Behandlung der Keratinozyten mit der AS-siRNA während der ersten 24 Stunden zu einer leichten Verzögerung der Wundheilung, im letzten 12-Stunden-Zeitraum dagegen zu einer ebenfalls leichten Beschleunigung, was zu keiner Zeit zu signifikanten Abweichungen in der verheilten Wundfläche führte (siehe Abb. 3.24). Und auch bei Unterbinden der Proliferation mit Mitomycin C führte die Inkubation der Zellen mit der AS-siRNA zu einer leicht verzögerten Wundheilung, die 24 h nach Wundsetzung zu einem signifikanten Unterschied in der verheilten Wundfläche führte (siehe Abb. 3.25). Im Scratch-Assay mit mechanischer Belastung

zeigte sich nach Inkubation mit der Kontroll-siRNA keine auffällige Beeinflussung der Wundheilung durch den zusätzlichen Stress (siehe Abb. 3.43).

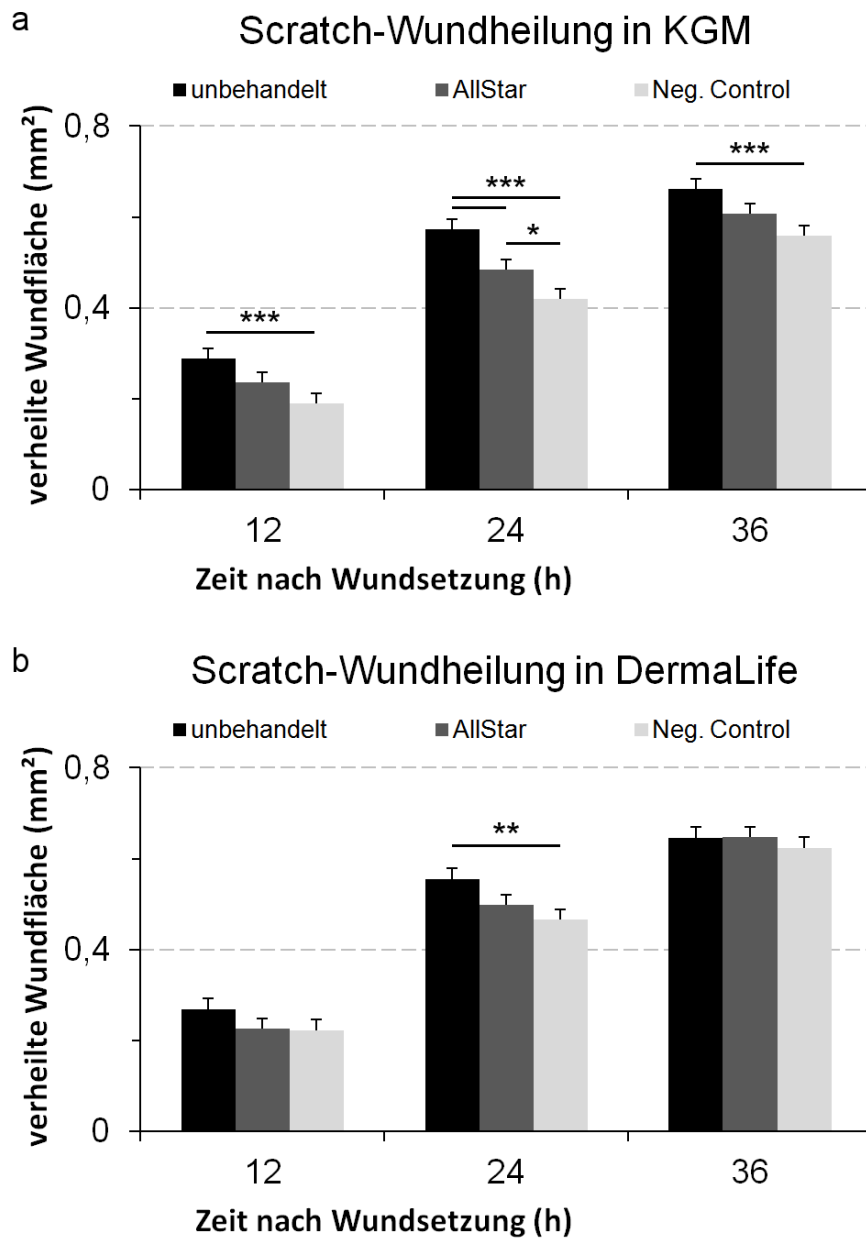


Abb. 3.16 Einfluss der siRNA-Kontrollen auf die Scratch-Wundheilung

Durchschnittliche verheilte Wundfläche zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung des Monolayers im Vergleich zwischen den verschiedenen Kontrollbehandlungen bei Inkubation der Keratinozyten in KGM (a) bzw. DermaLife (b). Signifikante Unterschiede sind entsprechend ihrem Signifikanzniveau mit einem oder mehreren * gekennzeichnet. n = 16 (unbehandelt) und 17 (AllStar und Neg. Control) (a) bzw. 13 (unbehandelt) und 14 (AllStar und Neg. Control) (b); * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

3.2.2.2. Einfluss auf die untersuchten TJ-Proteine

Die beiden verwendeten Kontroll-siRNA-Moleküle zeigten sowohl im Vergleich untereinander, als auch bei Anwendung in den verschiedenen Medien zum Teil unterschiedliche Effekte auf die Proteinlevel der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten TJ-Proteine.

Für Claudin-1 ergab sich bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM und dem Einsatz der Kontroll-siRNA AS eine signifikante Verringerung des Proteinlevels auf rund $51 \% \pm 33 \%$ ($p = 0,002$) bzw. nicht-signifikant auf $92 \% \pm 14 \%$ in Hoch-Calcium-KGM, während die Inkubation mit der alternativen NeKo-siRNA zu einem im Durchschnitt zwar erhöhten, aber aufgrund der großen Streubreite der beobachteten Ergebnisse nicht signifikant verändertem Proteinlevel führte ($173 \% \pm 126 \%$); der Unterschied zwischen diesen beiden Ergebnissen war signifikant ($p = 0,01$). Wurden die Zellen in DermaLife kultiviert, führte die Inkubation mit der AS-siRNA ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Proteinmenge ($66 \% \pm 33 \%$; $p = 0,011$), und bei Verwendung der NeKo-siRNA fand sich, im Gegensatz zur Situation in KGM, nun auch durchschnittlich etwas, aber nicht signifikant weniger Claudin-1 als in unbehandelten Zellen ($83 \% \pm 25 \%$). Trotz gleicher Tendenzen zeigte sich zwischen den durchschnittlichen Proteinleveln, die nach Inkubation mit den beiden Kontroll-siRNAs erreicht wurden, ein signifikanter Unterschied ($p = 0,039$). Die Auswertung der mRNA-Proben bestätigte die Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen, wobei die Effekte beider Kontroll-siRNAs hier keine statistische Signifikanz erreichten ($60 \% \pm 39 \%$ für AS-siRNA; $78 \% \pm 16 \%$ für NeKo-siRNA).

Occludin zeigte sich nur in geringem Maße beeinflusst durch die Inkubation der Keratinozyten mit den beiden Kontroll-siRNAs. Sofern die Zellen in regulärem KGM kultiviert wurden, fand sich nach der Inkubation mit AS-siRNA eine nicht-signifikante Reduktion ($70 \% \pm 39 \%$) der Proteinmenge von Occludin im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, während in Hoch-Calcium-KGM keine relevante Veränderung beobachtet wurde ($115 \% \pm 11 \%$). Die Inkubation mit der NeKo-siRNA führte zwar in einigen Zelllinien zu einer größeren Proteinmenge, insgesamt betrachtet ließ sich aber keine eindeutige Regulation erkennen ($135 \% \pm 96 \%$). Im direkten Vergleich zwischen den beiden Kontroll-siRNAs zeigte sich der Unterschied in den Auswirkungen auf die Proteinmenge nicht signifikant. Bei Kultivierung der Zellen in DL führte der Einsatz der AS-siRNA erneut zu einer leichten, diesmal signifikanten, Verringerung der Menge an Occludin ($71 \% \pm 38 \%$; $p = 0,04$), während die Inkubation der Keratinozyten mit NeKo-siRNA keine eindeutige Veränderung bewirkte ($102 \% \pm 33 \%$). Der Unterschied zwischen den beiden siRNAs war statistisch signifikant

($p = 0,043$). Auch auf Ebene der mRNA wurde der Unterschied zwischen den beiden siRNAs bestätigt (71 % \pm 34 % für AS; 93 % \pm 13 % für NeKo), wobei sich für keine der beiden Kontroll-siRNAs der ermittelte Durchschnittswert signifikant von dem der unbehandelten Kontrolle unterschied.

Beim TJ-Protein ZO-1 führten die beiden Kontroll-siRNAs zu keinen signifikanten Veränderungen der Proteinmenge, unabhängig davon in welchem Medium die Keratinozyten kultiviert wurden. In KGM zeigten sich nach Inkubation mit den beiden siRNAs jeweils leicht, aber nicht signifikant verringerte Proteinlevel (72 % \pm 46 % für AS; 69 % \pm 37 % für NeKo). Sofern die Zellen in DL kultiviert wurden, war kein einheitlicher Trend für eine Regulation der Proteinmenge erkennbar (102 % \pm 60 % für AS; 114 % \pm 74 % für NeKo), was sich auch in der Analyse der mRNA zeigte (96 % \pm 6 % für AS; 102 % \pm 17 % für NeKo).

3.2.2.3. Einfluss auf Proteinkinasen

Die Gesamtmenge der AKT-Kinase zeigte sich durch die Behandlung mit den Kontroll-siRNAs nur minimal erhöht in unverwundeten Zellen, und da die mit Kontroll-siRNAs behandelten Keratinozyten ebenso wie die unbehandelten Zellen im Verlauf des Scratches einen leichten Anstieg der Gesamtproteinmenge für AKT verzeichneten, ergaben sich keine weiteren Unterschiede zwischen diesen Behandlungen (siehe Abb. 3.17). Für die phosphorylierte Form der AKT-Kinase zeigte sich bereits in unverwundeten Zellen ein größerer Einfluss durch die Inkubation der Keratinozyten mit der AS-siRNA, die zu einer signifikant erhöhten Menge an p-AKT führte im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen (unb. Kontrolle mit 58 % \pm 32 % von AS; $p = 0,041$; siehe Abb. 3.17). Zehn Minuten nach Wundsetzung stieg die Menge an p-AKT in mit AS-siRNA behandelten Zellen zwar weiter an, allerdings weniger stark als in den unbehandelten Kontrollen, wodurch sich die Differenz verringerte und nicht mehr signifikante Ausmaße hatte. Die mit NeKo-siRNA behandelten Keratinozyten hingegen zeigten sowohl die grundsätzliche Erhöhung in unverwundeten Zellen als auch den Anstieg der p-AKT-Menge zehn Minuten nach Verwundung nicht, sodass sich zu diesem frühen Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zu den AS-siRNA-behandelten Zellen ($p = 0,019$) und den unbehandelten Kontrollzellen ($p = 0,005$) zeigte (siehe Abb. 3.17). Zum Endpunkt der Untersuchung, sechs Stunden nach Verwundung, zeigte sich die Menge an p-AKT weiterhin unverändert in den mit der NeKo-siRNA behandelten Keratinozyten, woraus sich aber kein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten oder mit der AS-siRNA inkubierten Keratinozyten ergab. In den AS-siRNA-Kontrollen dagegen verringerte sich die Menge an p-AKT wieder, analog zum Verlauf in den

unbehandelten Kontrollen, und lag im Durchschnitt leicht, aber nicht signifikant unter dem eigenen Ausgangsniveau ($79 \% \pm 45 \%$).

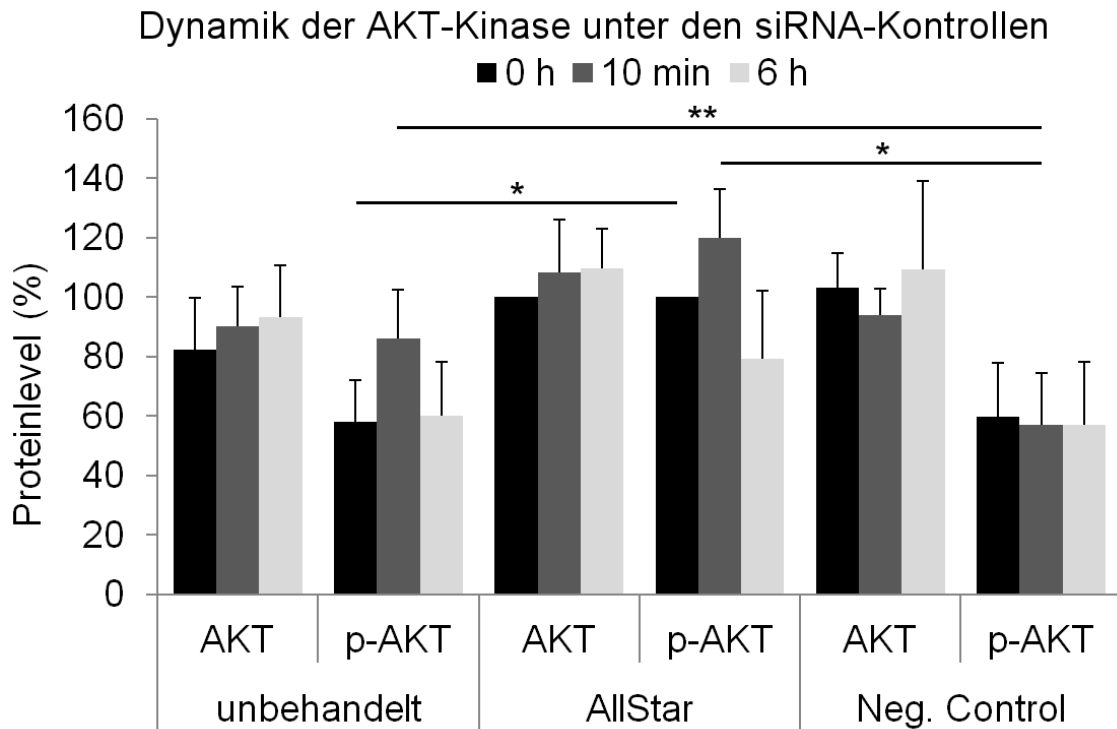


Abb. 3.17 Einfluss der siRNA-Kontrollen auf die AKT-Kinase

Relative Proteinlevel der Gesamtmenge an AKT bzw. der phosphorylierten Fraktion der AKT-Kinase. Zur Normierung der Werte wurde jeweils der 0-Stunden-Wert der AS-siRNA-Kontrolle verwendet. Signifikante Ergebnisse der Vergleiche von Proteinleveln zwischen den verschiedenen Behandlungen sind mit * entsprechend dem Signifikanzniveau markiert. $n = 5$ (0 h und 10 min) bzw. 4 (6 h); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Bei den Kinasen ERK 1/2 zeigte sich für die Gesamtproteinmenge kein signifikanter Einfluss durch die Behandlung mit den Kontroll-siRNAs im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, auf den eigenen Ausgangswert bezogen war nach zehn Minuten eine signifikante Verringerung der ERK 1/2-Proteinmenge in den NeKo-siRNA-behandelten Zellen festzustellen, der sich nach sechs Stunden wieder erholt hatte (siehe Abb. 3.18). Für die Menge an p-ERK 1/2 fand sich nach Inkubation mit AS-siRNA in unverwundeten Zellen ein deutlich, aber nicht signifikant geringerer Wert im Vergleich zu den restlichen Behandlungen, bezüglich des Anstiegs der p-ERK 1/2 Menge zehn Minuten nach Verwundung unterschieden sich die verschiedenen Behandlungen allerdings weder auffällig noch signifikant voneinander. Für die NeKo-siRNA-Behandlung war dieser Anstieg nach zehn Minuten signifikant ($229 \% \pm 54 \%$ im Vergleich zu 0h; $p = 0,009$) im Vergleich zum Ausgangswert, für die AS-siRNA hingegen nicht. Nach sechs Stunden fand sich in den Proteinisolaten der beiden siRNA-Kontrollbehandlungen ein durchschnittlich leicht über dem eigenen Ausgangsniveau liegender Wert für die Menge an p-ERK (siehe Abb. 3.18), womit sich

diese zwar im grundsätzlichen Verlauf von der unbehandelten Kontrolle unterschieden, aber letztlich keine signifikant abweichenden Proteinmengen aufwiesen.

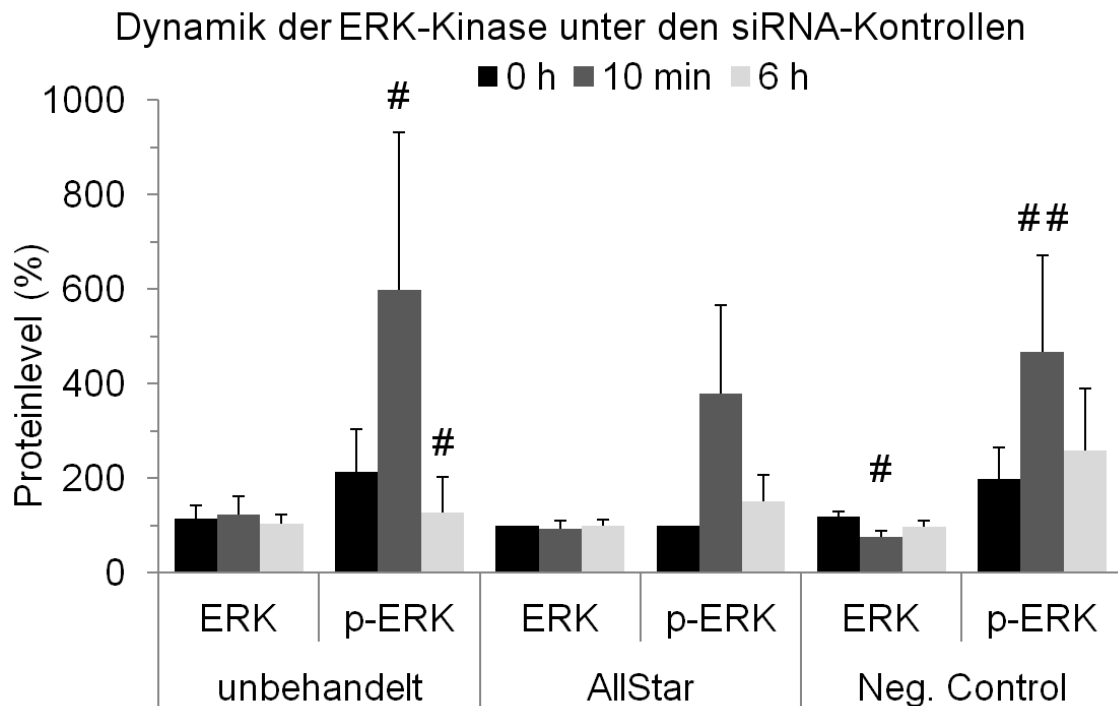


Abb. 3.18 Einfluss der siRNA-Kontrollen auf die ERK 1/2 Kinase

Relative Proteinlevel der Gesamtmenge an ERK 1/2 bzw. der phosphorylierten Fraktion der ERK-Kinase. Zur Normierung der Werte wurde jeweils der 0-Stunden-Wert der AS-siRNA-Kontrolle verwendet. Signifikante Ergebnisse der Vergleiche von Proteinleveln innerhalb einer Behandlung zum jeweiligen 0-Stunden-Wert sind mit einem oder mehreren # gekennzeichnet. $n = 5$ (0 h und 10 min) bzw. 4 (6 h); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$

Die Betrachtung der Gesamtproteinmenge der p38-MAP-Kinase in unverwundeten Zellen offenbarte keine signifikante Beeinflussung durch die Behandlung der Keratinozyten mit den Kontroll-siRNAs, jedoch unterschieden sich die beiden Kontrollbehandlungen hinsichtlich des allgemeinen Verlaufs der Entwicklung der Proteinmenge. Bei den mit der AS-siRNA behandelten Keratinozyten zeigte sich ein leichter kontinuierlicher Anstieg der Menge an p38-MAPK über den Verlauf des Beobachtungszeitraumes, während in den NeKo-siRNA-behandelten Zellen initial die größte Menge gemessen wurde, und diese dann zu den späteren Zeitpunkten leicht abnahm, wobei sich in keinem Fall signifikante Unterschiede zum eigenen Ausgangswert oder den anderen Behandlungen ergaben (siehe Abb. 3.19). Für die phosphorylierte Form der p38-MAPK fand sich zehn Minuten nach Verwundung des Zellmonolayers ein signifikanter Anstieg der Proteinmenge in beiden siRNA-Kontrollbehandlungen ($p < 0,001$), wodurch sich auch für den Vergleich der p-p38-MAPK-Proteinmenge zwischen den unbehandelten Kontrollzellen und der AS-siRNA-

Kontrolle ein signifikanter Unterschied ergab (unb. Kontrolle mit $42\% \pm 40\%$ von AS; $p = 0,046$). Sechs Stunden nach Wundsetzung wiesen die beiden siRNA-Kontrollen wieder etwas geringere Proteinmengen auf, ohne aber das Niveau der unbehandelten Kontrollzellen zu erreichen (siehe Abb. 3.19). Signifikant waren diese Unterschiede jedoch nicht.

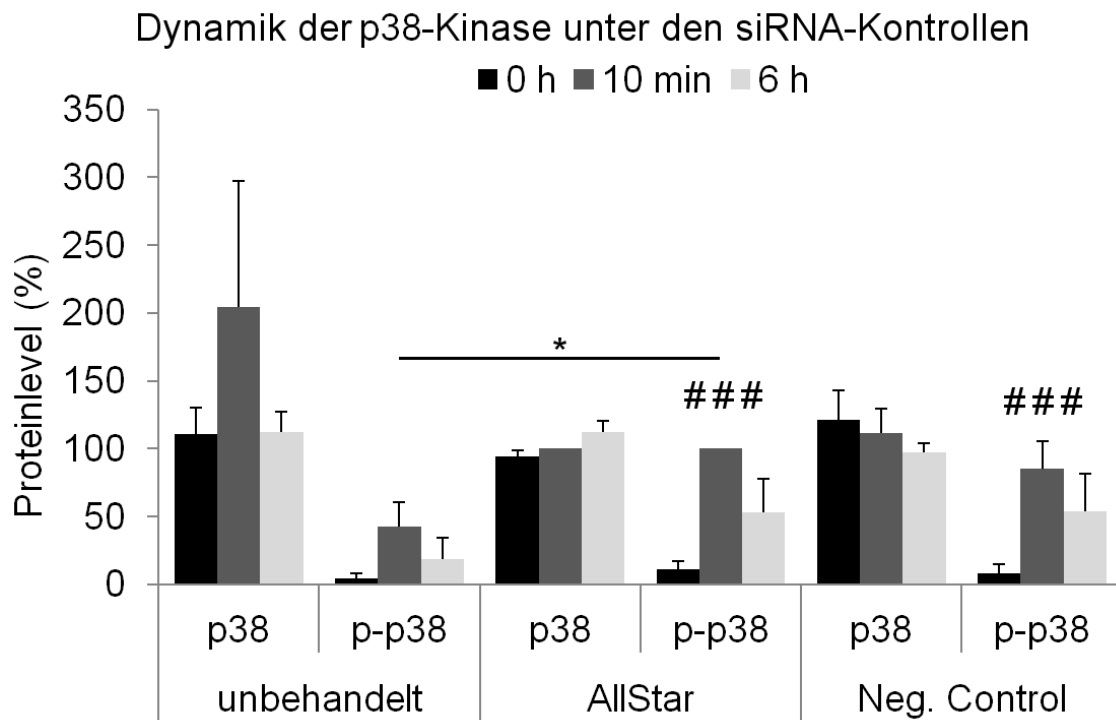


Abb. 3.19 Einfluss der siRNA-Kontrollen auf die p38-MAP-Kinase

Relative Proteinlevel der Gesamtmenge an p38-MAPK bzw. der phosphorylierten Fraktion der p38-MAP-Kinase. Zur Normierung der Werte wurde jeweils der 0-Stunden-Wert der AS-siRNA-Kontrolle verwendet. Signifikante Ergebnisse der Vergleiche von Proteinleveln zwischen den verschiedenen Behandlungen sind mit * entsprechend dem Signifikanzniveau markiert, Vergleiche innerhalb einer Behandlung zum jeweiligen 0-Stunden-Wert mit #. $n = 5$ (0 h und 10 min) bzw. 4 (6 h); */# $p < 0,05$; ***/### $p < 0,001$

3.2.2.4. Zusammenfassung der beobachteten Unterschiede und Fazit

Beim Vergleich der Auswirkungen der Inkubation von Keratinozyten mit den beiden Medien KGM und DermaLife zeigten sich für unbehandelte Zellen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der proliferativen Aktivität am Wundrand und die Wundheilungsgeschwindigkeit. Dagegen ergab die Untersuchung der Proteinisolate deutlich unterschiedliche Ergebnisse für die TJ-Proteine Claudin-1 und Occludin, wobei der Unterschied in der Proteinmenge von Occludin zwischen den beiden Kultivierungsbedingungen statistisch signifikant war. Bei Behandlung der Keratinozyten mit den beiden Kontroll-siRNAs zeigte sich in beiden Medien eine verzögerte

Wundheilung, die bei Inkubation der Zellen mit KGM etwas deutlicher ausgeprägt war. Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden daher überwiegend mit beiden Zellkulturmedien durchgeführt, um eventuell weitere Erkenntnisse über die Auswirkung der unterschiedlichen TJ-Proteinmengen zu gewinnen.

Die beiden Kontroll-siRNAs zeigten zum Teil deutliche Unterschiede in ihrem Effekt auf die Keratinozyten (siehe Tab. 3.1 und Tab. 3.2). Zusammenfassend betrachtet zeigte sich die AS-siRNA als geeignetere Kontrolle, da sie auf die beiden wichtigen Hauptparameter Proliferation und Wundheilungsgeschwindigkeit den geringeren Einfluss hatte. Der negative Einfluss auf die Wundheilungsgeschwindigkeit lässt sich zudem, wie die Betrachtung der Effekte des gezielten Claudin-1 Knockdowns zeigen wird, über die Herabregulation der Claudin-1 Expression erklären, während die NeKo-siRNA keine eindeutige Veränderung der untersuchten TJ-Proteine bewirkte, aber trotzdem eine sogar stärker ausgeprägte Verzögerung der Wundheilung zur Folge hatte. Somit beruht ihr Einfluss auf die Wundheilungsgeschwindigkeit offenbar auf der Veränderung anderer Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit nicht beachtet wurden, sodass die AS-siRNA die bessere Alternative darstellt, da ihr Einfluss auf die TJ-Proteine stets kontrolliert werden konnte. Darüber hinaus zeigte sich bei Inkubation der Keratinozyten mit der AS-siRNA die Dynamik der Regulation der p-AKT-Menge im Verlauf der Scratch-Wundheilung erhalten, während die Behandlung mit der NeKo-siRNA dazu führte, dass der charakteristische Anstieg zehn Minuten nach Wundsetzung ausblieb bzw. unterdrückt wurde. Bei der ERK-Kinase zeigte sich für die Behandlung mit der NeKo-siRNA eine signifikante Verringerung der Gesamtproteinmenge zehn Minuten nach Wundsetzung, die in den unbehandelten Kontrollzellen und auch mit der AS-siRNA nicht zu beobachten war. Bezogen auf die Auswirkungen auf die p38-MAP-Kinase zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Kinasen, denn auch die NeKo-siRNA bewirkte eine Verstärkung des Peaks der p-p38-MAPK-Proteinmenge zum Zeitpunkt zehn Minuten nach Verwundung. Dieser war zwar im Gegensatz zur AS-siRNA nicht signifikant verschieden zum Wert der unbehandelten Kontrollzellen, aber auf einem annähernd ähnlich hohen Niveau, und wie bei der AS-siRNA auch gegenüber dem eigenen Ausgangswert signifikant erhöht. Somit führte die NeKo-siRNA im Vergleich zur AS-siRNA nicht nur zu einer stärkeren Beeinträchtigung der beiden wichtigsten Auswerteparameter, sondern auch zu abweichenden Veränderungen bei zwei der drei untersuchten Proteinkinasen. Daher wurde die AS-siRNA als die Kontroll-siRNA gewählt, die als Referenzpunkt für die Beurteilung des Einflusses der gezielten TJ-Protein-Knockdowns diene.

untersuchter Parameter	Effekt der AllStar-siRNA
<i>in vitro</i> Wundheilung	leicht verlangsamte Wundheilung (sig. in KGM)
Proliferation	keine eindeutige Veränderung
Migration	verringerte Migration
AKT	tendenziell leichte Hochregulation
p-AKT	Hochregulation in unverwundeten Zellen
ERK 1/2	keine eindeutige Veränderung
p-ERK 1/2	tendenzielle Herabregulation
p38	keine eindeutige Veränderung
p-p38	Hochregulation nach Scratch
Claudin-1	Herabregulation
Occludin	tendenziell leichte Herabregulation
ZO-1	keine eindeutige Veränderung

Tab. 3.1 Zusammenfassung der Effekte der AllStar-siRNA

Tabellarische Übersicht der Auswirkungen der Behandlung der primären humanen Keratinozyten mit der AllStar-siRNA. Rot hinterlegte Felder kennzeichnen eine signifikante Verringerung des entsprechenden Parameters, grün hinterlegte Felder eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

untersuchter Parameter	Effekt der Neg. Control-siRNA
<i>in vitro</i> Wundheilung	verlangsamte Wundheilung (sig. in beiden Medien)
Proliferation	verminderte Proliferation (sig. in DL)
<i>in vitro</i> Wundheilung bei mech. Stress	keine eindeutige Veränderung
AKT	tendenziell leichte Hochregulation
p-AKT	Unterdrückung des 10-Minuten-Peaks
ERK 1/2	Herabregulation nach Scratch, sig. nach 10 Minuten
p-ERK 1/2	keine eindeutige Veränderung
p38	keine eindeutige Veränderung
p-p38	tendenziell Hochregulation nach Scratch
Claudin-1	keine eindeutige Veränderung
Occludin	keine eindeutige Veränderung
ZO-1	keine eindeutige Veränderung

Tab. 3.2 Zusammenfassung der Effekte der Neg. Control-siRNA

Tabellarische Übersicht der Auswirkungen der Behandlung der primären humanen Keratinozyten mit der NeKo-siRNA. Rot hinterlegte Felder kennzeichnen eine signifikante Verringerung des entsprechenden Parameters, grün hinterlegte Felder eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

3.2.3. Knockdown von Claudin-1

Der Knockdown des TJ-Proteins Claudin-1 erfolgte mittels zweier verschiedener siRNA-Sequenzen, die sich in der erzielten Knockdown-Effizienz leicht voneinander unterschieden. Bei Kultivierung der Zellen in KGM ergab sich bei Verwendung der beiden Claudin-1siRNAs eine signifikante Reduktion der Proteinmenge (normiert auf unbehandelte Kontrollen: 17 % \pm 16 %, $p < 0,001$ (zu unbehandelt) bzw. $p = 0,015$ (zu AS-siRNA) für Claudin-1 siRNA #5; 7 % \pm 10 %, $p < 0,001$ (zu unbehandelt) bzw. $p = 0,022$ (zu AS-siRNA) für Claudin-1 siRNA #8)(siehe Abb. 3.20 für einen exemplarischen Western-Blot). Der Unterschied zwischen den erreichten KD-Effizienzen der beiden siRNA-Sequenzen war in KGM nicht signifikant. Die Inkubation in Hoch-Calcium-Medium beeinträchtigte die Knockdown-Effizienz nicht, sodass die Claudin-1 siRNA #8 eine Reduktion der Proteinmenge auf 2 % \pm 1 % bewirkte, was eine signifikante Veränderung zu den Werten der unbehandelten ($p < 0,001$) und der AS-siRNA-Kontrolle ($p = 0,009$) darstellte (siehe Abb. 3.21 für einen exemplarischen Western-Blot). Wurden die Keratinozyten im DermaLife-Medium gezüchtet erreichten beide siRNA-Moleküle eine leicht schlechtere Effizienz, sodass die siRNA #5 im

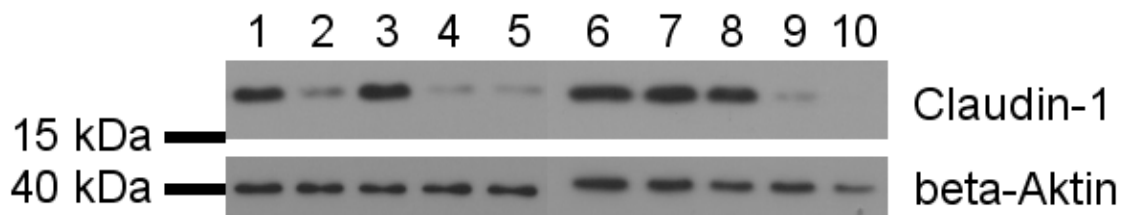


Abb. 3.20 Western-Blot von Claudin-1

Exemplarischer Western-Blot von Proteinisolaten aus Keratinozyten, die in KGM (1-5) bzw. DermaLife (6-10) kultiviert wurden und entweder unbehandelt (1,6) oder mit AllStars- (2,7) bzw. NeKo-siRNA (3,8) oder Claudin-1-siRNA #5 (4,9) bzw. #8 (5,10) inkubiert worden waren. Das Zielprotein des zur Markierung der Banden verwendeten Antikörpers ist neben dem jeweiligen Blotabschnitt notiert. β -Aktin wurde hier als Ladekontrolle verwendet.

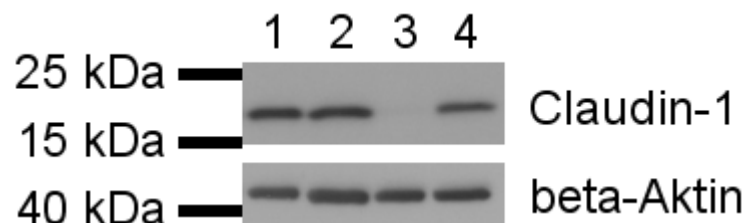


Abb. 3.21 Western-Blot von Claudin-1 in Hoch-Calcium-KGM

Exemplarischer Western-Blot von Proteinisolaten aus Keratinozyten, die in Hoch-Calcium-KGM kultiviert wurden und entweder unbehandelt (1) oder mit AllStars-siRNA (2), Claudin-1-siRNA #8 (3) bzw. Occludin-siRNA #11 (4) inkubiert worden waren. Das Zielprotein des zur Markierung der Banden verwendeten Antikörpers ist neben dem jeweiligen Blotabschnitt notiert. β -Aktin wurde hier als Ladekontrolle verwendet.

Durchschnitt eine signifikante Reduktion auf $38 \% \pm 29 \%$ erzielte ($p = 0,001$ bzw. $0,036$ zu unbehandelt bzw. AS-siRNA), während die siRNA #8 das Proteinlevel sowohl im Vergleich zum Niveau der beiden Kontrollen ($16 \% \pm 23 \%$ verbleibende Proteinmenge; $p < 0,001$ (zu unbehandelt) bzw. $p = 0,008$ (zu AS-siRNA)), als auch zu dem mit der siRNA #5 erreichten Proteinlevel signifikant senkte ($p = 0,01$) (siehe Abb. 3.20 für einen exemplarischen Western-Blot). Für insgesamt drei der verwendeten Zelllinien, kultiviert in regulärem DermaLife, erfolgte die Beurteilung der Knockdown-Effizienz zusätzlich zur Bestimmung der Proteinmenge außerdem über eine qPCR zum Nachweis der in den Zellen vorhandenen Mengen an mRNA. Bei diesen Messungen fand sich wiederum mit Claudin-1-siRNA #8 eine stärkere Herabregulation der mRNA als mit Claudin-1-siRNA #5 ($28 \% \pm 22 \%$ für siRNA #5; $18 \% \pm 26 \%$ für siRNA #8 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen), wobei beide siRNAs damit eine signifikante Verringerung der mRNA-Menge im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ($p = 0,03$ für beide siRNAs), jedoch nicht zur AS-siRNA-Kontrolle ($60 \% \pm 39 \%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, nicht signifikant) bewirkten.

Zur weiteren Aufklärung der Auswirkungen des gezielten Knockdowns von Claudin-1 wurden auch die Proteinlevel der jeweils anderen untersuchten TJ-Proteine analysiert. Bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM zeigte sich, dass nach Inkubation mit den gegen Claudin-1 gerichteten siRNAs nicht nur weniger Claudin-1, sondern auch weniger Occludin in den Proteinextrakten nachweisbar war, wobei sich die beiden siRNAs hinsichtlich der gemessenen Proteinwerte nicht unterschieden ($55 \% \pm 50 \%$ für siRNA #5; $49 \% \pm 46 \%$ für siRNA #8) und mit keiner von beiden signifikante Veränderungen bewirkt wurden. Für ZO-1 zeigte sich bei Einsatz der Claudin-1-siRNA #5 keine konsistente Veränderung der Proteinmengen ($115 \% \pm 55 \%$), nach Inkubation mit Claudin-1-siRNA #8 ließ sich im Durchschnitt ein etwas, aber nicht signifikant höherer Proteinlevel messen ($153 \% \pm 76 \%$). Bei Zellen, die in DermaLife kultiviert wurden, zeigte sich tendenziell ein ähnliches Bild. Nach Inkubation mit den beiden Claudin-1 siRNAs ließ sich erneut auch weniger Occludin in den Keratinozyten nachweisen, wobei sich die beiden siRNAs hinsichtlich der erreichten Veränderung nicht voneinander unterschieden ($64 \% \pm 26 \%$ für siRNA #5; $61 \% \pm 34 \%$ für siRNA #8). Statistisch betrachtet war diese Herabregulation durch die Claudin-1-siRNA #5 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, aber nicht zur AS-siRNA-Kontrollbehandlung, allerdings signifikant ($p = 0,036$), mit siRNA #8 dagegen nicht. Auf Ebene der mRNA zeigte sich der Effekt etwas weniger ausgeprägt ($88 \% \pm 39 \%$ für siRNA #5; $71 \% \pm 36 \%$ für siRNA #8) und nicht signifikant. Die Menge des TJ-Proteins ZO-1 schien keiner fest korrelierten Regulation zu unterliegen ($181 \% \pm 193 \%$ für siRNA 5; $96 \% \pm 62 \%$ für siRNA #8), wobei der Mittelwert für die Claudin-1-siRNA #5 durch einen groben

Ausreißer verzerrt wird. Bei Überprüfung der ZO-1 mRNA offenbarten sich keine signifikanten Veränderungen, auch wenn mit der Claudin-1-siRNA #5 eine leichte Verringerung auf $75 \% \pm 11 \%$ gemessen wurde. Mit der Claudin-1-siRNA #8 blieb die ZO-1 mRNA stabil bei $96 \% \pm 15 \%$.

3.2.3.1. Effekt auf die Scratch-Wundheilung

Die Untersuchung der Geschwindigkeit, mit der die gesetzten Scratch-Wunden wieder verschlossen wurden ergab, dass die Inkubation der humanen Keratinozyten mit den verschiedenen Claudin-1-siRNAs einen zum Teil deutlichen Einfluss auf das Wundheilungsvermögen der Zellen hatte. Bei Verwendung des KGM-Mediums zeigte sich nach Inkubation der Zellen mit der Claudin-1-siRNA #8 im Vergleich zu den Kontrollzellen eine starke und signifikante Verringerung der Wundheilungsgeschwindigkeit (um 55 %, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle) im Zeitraum der ersten 24 Stunden nach der Wundsetzung (siehe Abb. 3.22), und auch bei Kultivierung der Zellen mit DermaLife führte der Einsatz der Claudin-1 siRNA #8 zu einer deutlichen Verlangsamung um 29 % im gleichen Zeitraum (siehe Abb. 3.23). Die Inkubation der Keratinozyten mit Claudin-1-siRNA #5 führte ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Wundheilungsgeschwindigkeit, wenn auch in geringerem Ausmaße (Reduktion um 26 % in KGM; 12 % in DL; siehe Abb. 3.22 bzw. Abb. 3.23).

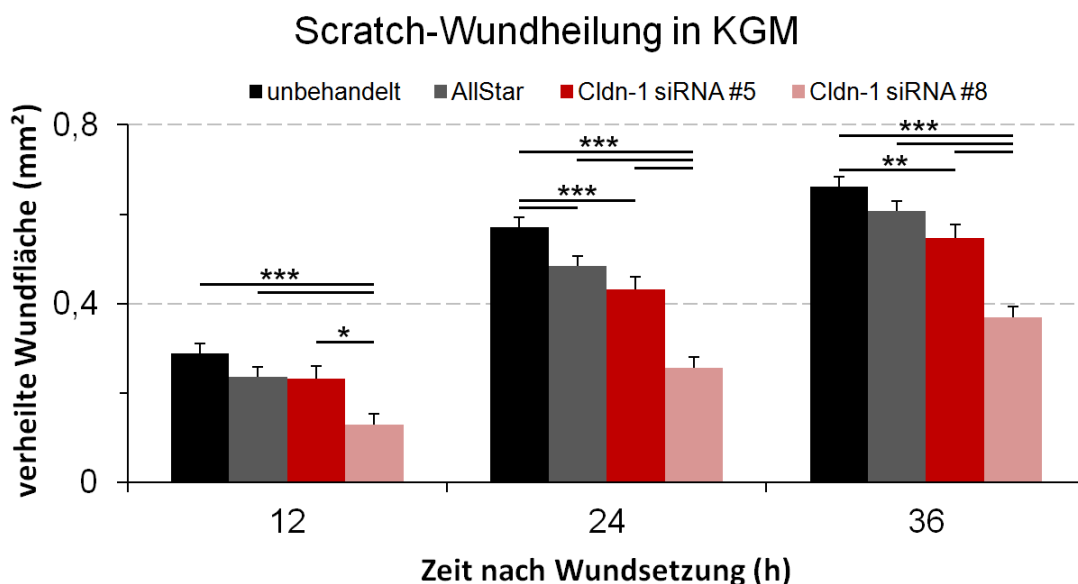


Abb. 3.22 Effekt des Claudin-1-Knockdowns im Scratch-Assay in KGM

Durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) der Claudin-1-Knockdown- und Kontrollzellen für die angegebenen Zeitpunkte von 12 bis 36 Stunden nach Wundsetzung bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM. Signifikante Unterschiede sind entsprechend ihrem Signifikanzniveau mit einem oder mehreren * gekennzeichnet. $n = 16, 17, 6, 11$ (v. l. n. r.); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

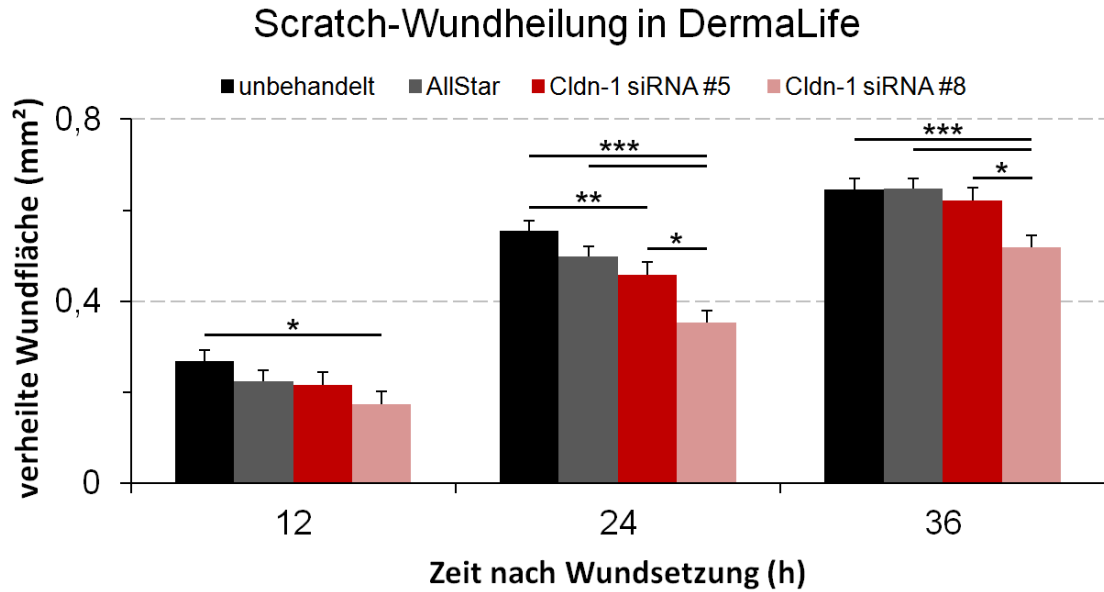


Abb. 3.23 Effekt des Claudin-1-Knockdowns im Scratch-Assay in DermaLife

Durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) der Claudin-1-Knockdown- und Kontrollzellen für die angegebenen Zeitpunkte von 12 bis 36 Stunden nach Wundsetzung bei Kultivierung der Keratinozyten in DermaLife. Signifikante Unterschiede sind entsprechend dem Signifikanzniveau mit einem oder mehreren * gekennzeichnet. n = 13, 14, 8, 8 (v. l. n. r.); * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Wurden die Zellen exemplarisch unter Hoch-Calcium-Bedingungen kultiviert, wobei aufgrund der stärkeren Effekte des Knockdowns unter Niedrig-Calcium-Bedingungen das Medium KGM gewählt wurde, führte die Behandlung der Keratinozyten mit der Claudin-1 siRNA #8 zu einer starken Beeinträchtigung der Wundheilung. Bei zwei der insgesamt drei untersuchten Zelllinien wurde die Wunde sogar größer, statt sich zu schließen, sodass sich zu allen Zeitpunkten deutliche und signifikante Unterschiede in der verheilten Wundfläche ergaben, wenn die Werte der Claudin-1-Knockdownzellen mit denen der unbehandelten oder der AS-siRNA-Kontrolle verglichen wurden (siehe Abb. 3.24).

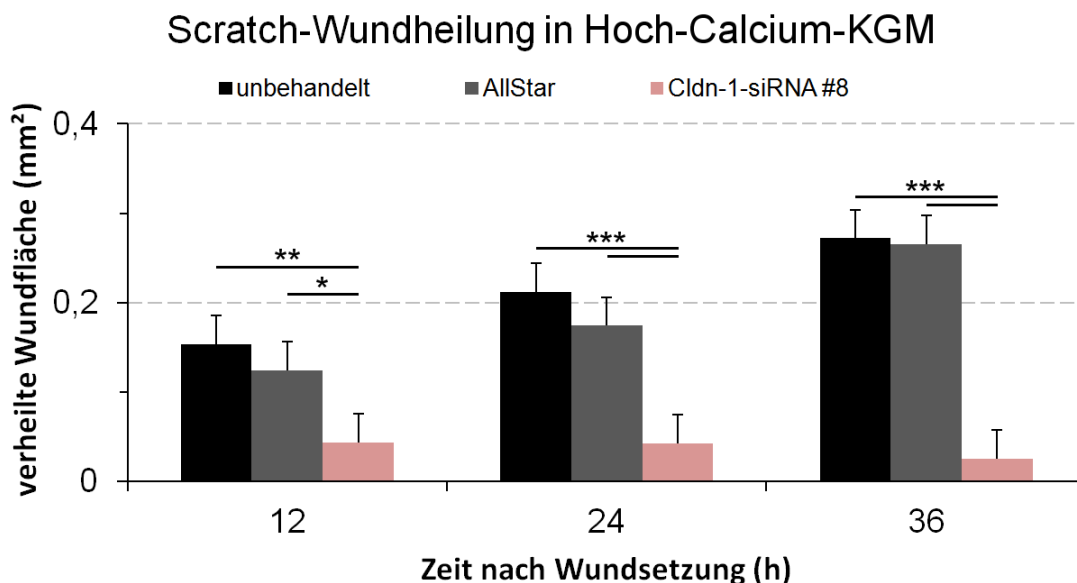


Abb. 3.24 Effekt des Claudin-1-Knockdowns im Scratch-Assay in Hoch-Calcium-KGM

Durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) der Claudin-1-Knockdown- und Kontrollzellen für die angegebenen Zeitpunkte von 12 bis 36 Stunden nach Wundsetzung bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM mit hoher Calcium-Konzentration. Signifikante Unterschiede sind entsprechend ihrem Signifikanzniveau mit einem oder mehreren * gekennzeichnet. $n = 3$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.2.3.2. Effekt auf die Migration

Zur genaueren Untersuchung der Ursachen der beeinträchtigten Wundheilung nach KD von Claudin-1 wurden die Scratch-Assays unter vorhergehender Inkubation der Zellen mit dem Tytostatikum Mitomycin C wiederholt, wobei aufgrund des größeren Effekts nur die Claudin-1 siRNA #8 zum Einsatz kam und die Experimente ausschließlich im Medium KGM durchgeführt wurden (siehe Abb. 3.25). Dabei zeigte sich im Vergleich mit den Versuchen in KGM ohne Mitomycin C über alle Versuchsbedingungen hinweg eine verzögerte Wundheilung (vergleiche Abb. 3.22 und Abb. 3.25). Neben dieser allgemein verlangsamten Wundheilung führte die Behandlung der Zellen mit der AS-siRNA zu einer leicht verzögerten Wundheilung, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 24 h nach Wundsetzung zu einem signifikanten Unterschied in der verheilten Wundfläche führte (siehe Abb. 3.25). Bei Inkubation der Keratinozyten mit der gegen Claudin-1 gerichteten siRNA war eine starke Verringerung der Wundheilungsgeschwindigkeit zu beobachten, sodass sich bereits zwölf Stunden nach Wundsetzung ein signifikanter Unterschied zur verheilten Wundfläche der unbehandelten Kontrolle ergab, und nach 24 sowie 36 Stunden die Claudin-1 KD-Zellen eine signifikant kleinere verheilte Wundfläche aufwiesen als die unbehandelten und die siRNA-Kontrollzellen (siehe Abb. 3.25).

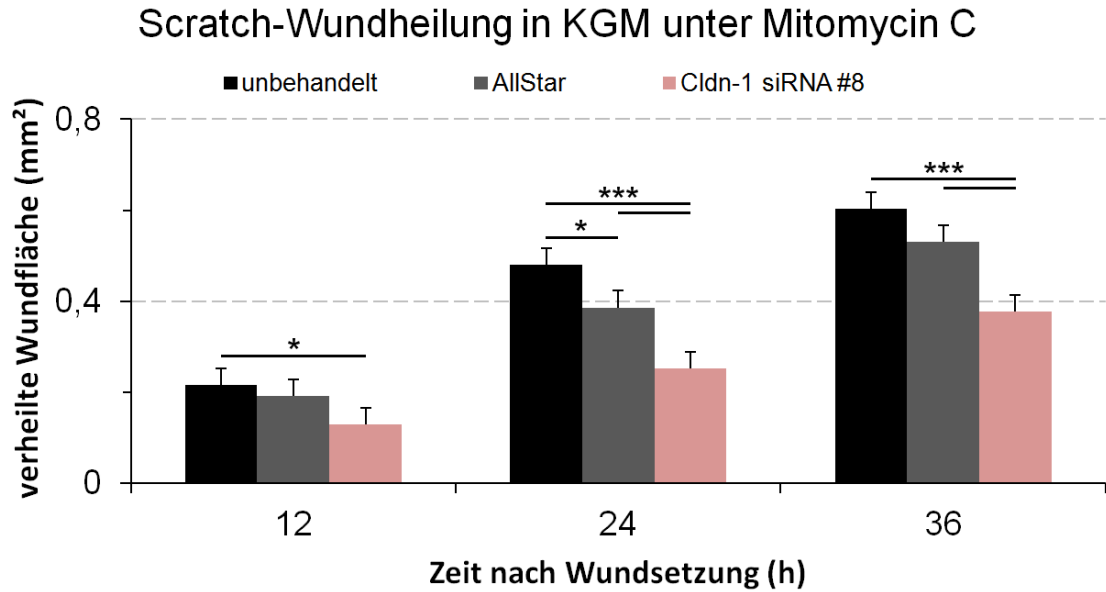


Abb. 3.25 Effekt des Claudin-1-Knockdowns im Scratch-Assay mit Mitomycin C

Durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) der Claudin-1-Knockdown- und Kontrollzellen für die angegebenen Zeitpunkte von 12 bis 36 Stunden nach Wundsetzung bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM mit hoher Calcium-Konzentration. Signifikante Unterschiede sind entsprechend ihrem Signifikanzniveau mit einem oder mehreren * gekennzeichnet. n = 4; * p < 0,05; *** p < 0,001

3.2.3.3. Effekt auf die Proliferation

Bei der Untersuchung der Proliferationsfähigkeit der humanen Keratinozyten zeigte sich nach Inkubation mit Claudin-1-siRNA #8 in beiden Medien eine zu den unbehandelten Kontrollen und der AS-siRNA-Kontrollbehandlung signifikant verminderte Proliferationsaktivität, die sich in KGM mit nur noch 74 % ± 7 % proliferativ aktiven Zellen am Wundrand deutlicher zeigte als in DermaLife (85 % ± 7 %)(siehe Abb. 3.26). Der KD mittels Claudin-1-siRNA #5 führte zu einer leichten, aber nicht signifikanten Reduktion des Anteils proliferativer Zellen (siehe Abb. 3.26).

Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten nach Claudin-1-Knockdown

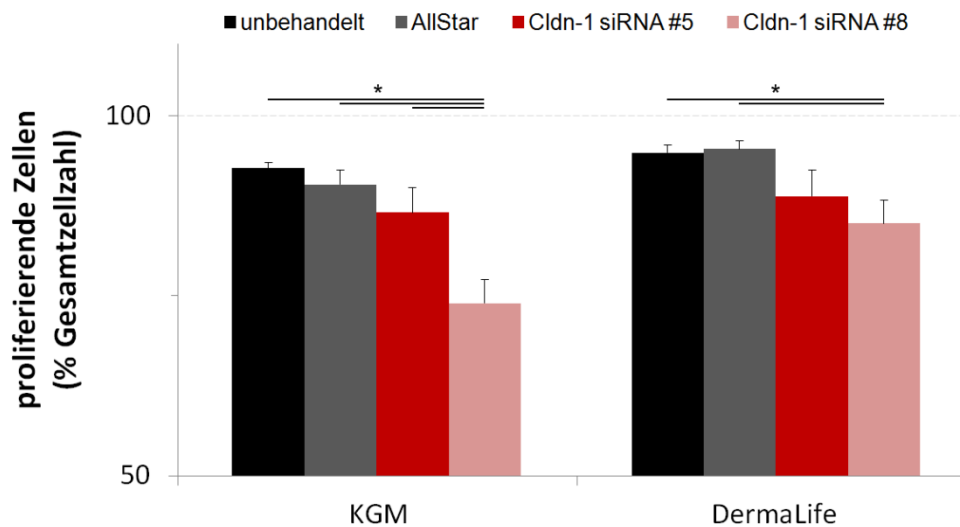


Abb. 3.26 Proliferation der Keratinozyten bei Claudin-1-Knockdown

Anteil Ki67-positiv gefärbter und damit proliferativ aktiver Keratinozyten am Wundrand der Scratchwunden 24 Stunden nach Verwundung in den verschiedenen Behandlungsansätzen bei Kultivierung der Zellen in DL bzw. KGM. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit einem * entsprechend dem Signifikanzniveau gekennzeichnet. $n = 8$ für beide Kontrollen, $n = 5$ für die Claudin-siRNAs; * $p < 0,05$

3.2.3.4. Effekt auf die Differenzierung

Eine geregelte und genau getimte Differenzierung der Keratinozyten ist ein wichtiger Vorgang der Wundheilung. Deshalb wurde auch der Einfluss des Knockdowns von Claudin-1 auf Marker der frühen und späten Differenzierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Knockdown von Claudin-1 zu einer veränderten Expression der Cytokeratine (CK) 14 (Marker für undifferenzierte Zellen) und 10 (Marker der frühen Differenzierungsphase) sowie der Proteine Involucrin (intermediärer Differenzierungsmarker), Filaggrin, Loricrin und Transglutaminase 1 (Marker der späten Differenzierungsphase) führte (Gruber et al., 2015).

Bereits bei Kultivierung der Zellen mit einer niedrigen Calcium-Konzentration führte der Knockdown, nur durchgeführt mit Claudin-1-siRNA #8, zu einer leichten, aber signifikanten Hochregulation der mRNA-Level von Involucrin (1,4-fach \pm 0,1) sowie Filaggrin (1,7-fach \pm 0,2), Loricrin (2,1-fach \pm 0,2) und Transglutaminase 1 (1,4-fach \pm 0,1) im Vergleich zur AS-siRNA-Kontrolle. 48 Stunden nach Induktion der Differenzierung durch Erhöhen der Calcium-Konzentration führte der KD von Claudin-1 zu deutlich größeren Veränderungen, sodass sich signifikante Expressionsunterschiede für Involucrin (1,8-fach \pm 0,3), Filaggrin (4,5-fach \pm 0,8), Loricrin (6,8-fach \pm 1,8) und CK14 (1,6-fach \pm 0,1) zeigten, während der Anstieg der mRNA-Level von Transglutaminase 1 (3,1-fach \pm 0,9) und CK10 (2-fach \pm 0,8) keine statistische

Signifikanz erreichte. Nach insgesamt 120 Stunden Kultivierung unter hoher Calcium-Konzentration fanden sich für Loricrin (2,1-fach \pm 0,04) und Transglutaminase 1 (1,3 \pm 0,1) weiterhin signifikant erhöhte mRNA-Level bei KD von Claudin-1, während sich für Filaggrin ein Trend zu deutlich erhöhter Expression (3,6-fach \pm 1,2) zeigte und Involucrin tendenziell leicht herabreguliert war (0,8-fach \pm 0,2)(siehe Abb. 3.27).

Differenzierungsmarker in Claudin-1-KD-Zellen

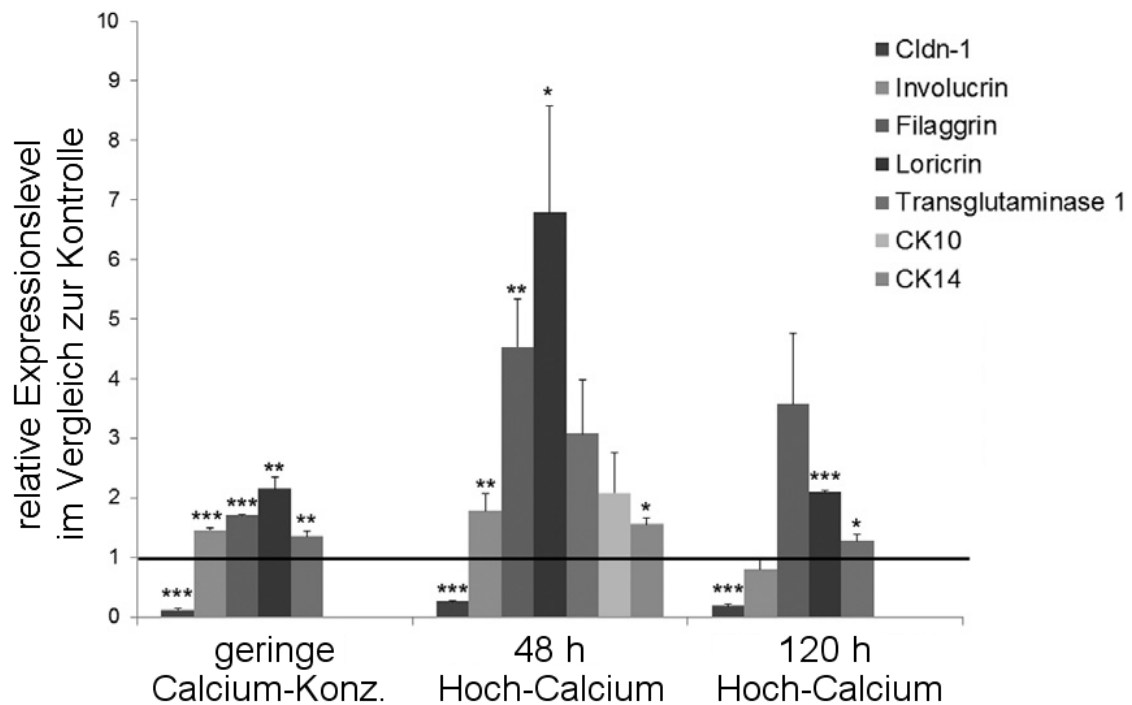


Abb. 3.27 Einfluss des Claudin-1-Knockdowns auf Differenzierungsmarker

Durchschnittliche relative Expressionslevel (mit Standardfehler) in Bezug auf die AllStar-siRNA-Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten und Calcium-Konzentrationen im Medium. Signifikante Unterschiede wurden entsprechend ihrem Signifikanzniveau mit einem oder mehreren * gekennzeichnet. n = 9 (CK10 und CK14) bzw. 6; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; (modifiziert mit Erlaubnis nach (Gruber et al., 2015))

3.2.3.5. Effekt auf Proteinkinasen

Zur Klärung der Aktivität verschiedener, möglicherweise in die Regulation der beobachteten Effekte eines Claudin-1 Knockdowns eingebundener Proteinkinasen erfolgte die Bestimmung der Proteinlevel der AKT-, ERK 1/2- und p38-MAP-Kinase jeweils sowohl für das gesamte Protein als auch für die phosphorylierte Form in unverwundeten Zellen sowie zehn Minuten und sechs Stunden nach Wundsetzung. Aufgrund der in den vorhergehenden Experimenten beobachteten stärkeren Effekte der Claudin-1-siRNA #8 beschränkten sich diese Untersuchungen auf den Einsatz

dieser siRNA bei Kultivierung der Zellen in KGM, um, sofern sie beteiligt waren, eine deutlichere Veränderung in der Regulation der Kinasen und ihrer Aktivität zu bewirken. Für die Proteinkinase B bzw. AKT zeigte sich in unverwundeten Zellen, dass die Behandlung mit der gegen Claudin-1 gerichteten siRNA im Vergleich zu den Kontrollbedingungen zu einer leichten, aber nicht signifikanten Erhöhung des Gesamtproteinlevels führte (siehe Abb. 3.29 a). Im Verlauf der Scratchwundheilung zeigte sich dann in unbehandelten und den siRNA-Kontroll-Zellen im Trend ein leichter Anstieg der Gesamtproteinmenge. Bei Behandlung der Zellen mit der Claudin-1 siRNA #8 hingegen konnte im Laufe der Zeit eine Verringerung der Menge an AKT nachgewiesen werden, die, im Vergleich mit der Proteinmenge zum Zeitpunkt 0, sowohl zehn Minuten als auch sechs Stunden nach Verwundung des Monolayers zu einem signifikant niedrigeren Gesamtproteinlevel führte (10 min: 81 % \pm 15 %; $p = 0,034$; 6 h: 75 % \pm 18 %; $p = 0,028$) (siehe Abb. 3.28 für einen exemplarischen Western-Blot und Abb. 3.29 a).

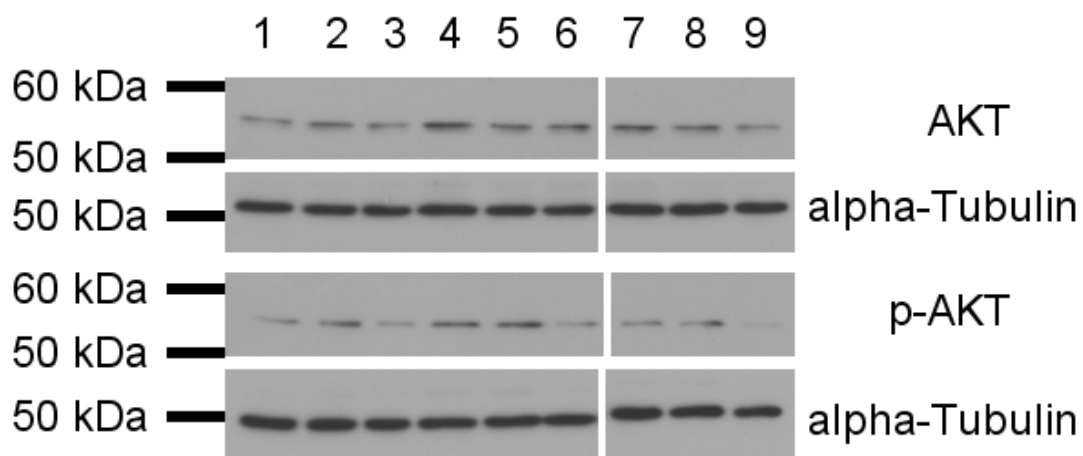


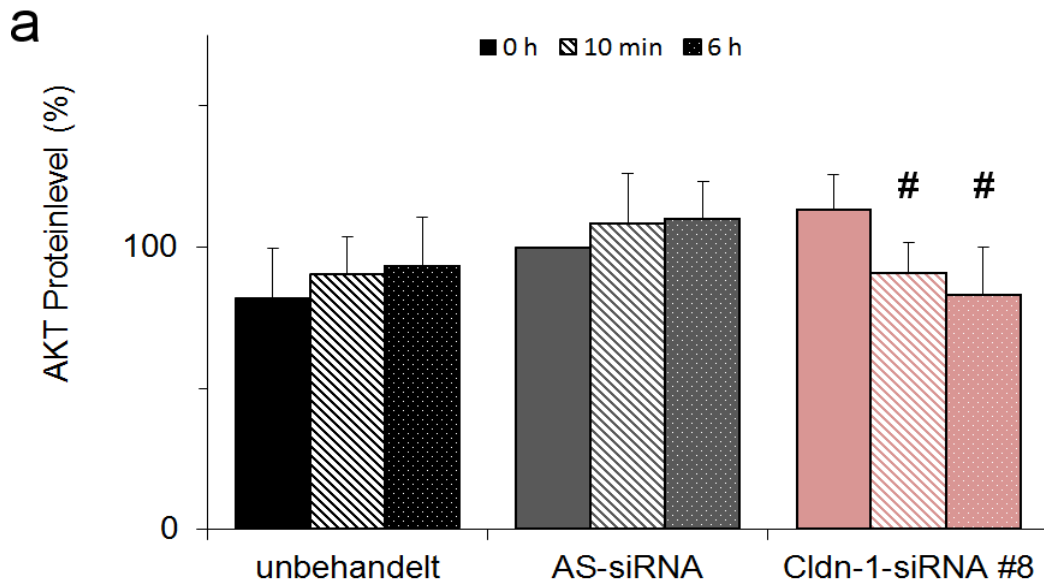
Abb. 3.28 AKT-Kinase im Western-Blot

Exemplarischer Western-Blot von Proteinisolaten aus unbehandelten (1-3) oder mit AllStars-siRNA (4-6) bzw. Claudin-1-siRNA #8 (7-9) inkubierten Keratinozyten 0 (1,4,7), 10 (2,5,8) bzw. 360 min (3,6,9) nach Wundsetzung. Das Zielprotein des verwendeten Antikörpers ist neben dem jeweiligen Blotabschnitt notiert. α -Tubulin wurde hier als Ladekontrolle verwendet.

Für die phosphorylierte Form der AKT-Kinase (siehe Abb. 3.29 b) zeigte der Knockdown von Claudin-1 erst nach Wundsetzung einen Effekt. Während in den unbehandelten Keratinozyten zehn Minuten nach Verwundung ein signifikanter Anstieg auf 158 % \pm 30 % ($p = 0,018$) des Ausgangsniveaus zu beobachten war, und auch in den AS-siRNA-Kontrollen die Menge an p-AKT von einem bereits höheren Ausgangswert weiter anstieg, blieb in den Claudin-1-KD-Zellen die Menge an p-AKT zunächst unverändert. Daraus ergab sich zu diesem Zeitpunkt, dass die Claudin-1-KD-Zellen signifikant weniger p-AKT enthielten als die AS-siRNA-Kontrollen (57 % \pm 27 %; $p = 0,022$). Sechs Stunden nach Start des Versuchs konnte dann in den Claudin-1-KD-

Zellen ein deutlicher Abfall der Proteinmenge beobachtet werden, sodass zu diesem Zeitpunkt signifikant weniger p-AKT in den Claudin-1-KD-Zellen gemessen wurde als in den unbehandelten Zellen ($p = 0,033$) und der AS-siRNA-Kontrolle ($p = 0,03$) (siehe Abb. 3.28 für einen exemplarischen Western-Blot und Abb. 3.29 b).

Einfluss des Claudin-1 Knockdowns auf die Akt-Kinase Gesamtproteinmenge der Akt-Kinase nach Scratch



Phosphorylierung der Akt-Kinase nach Scratch

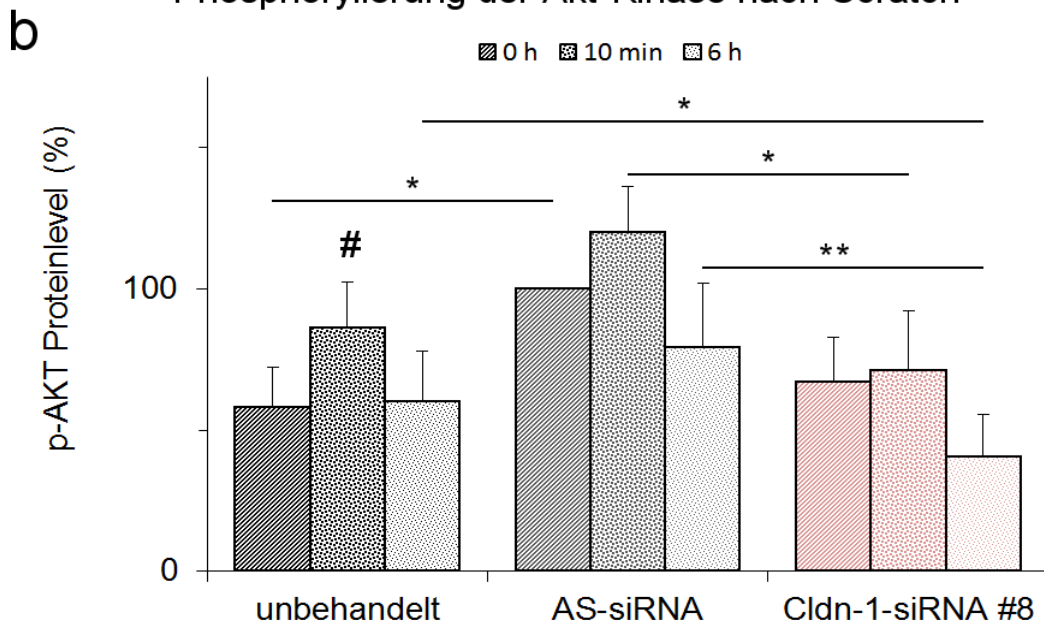


Abb. 3.29 Regulation der AKT-Kinase im Scratchverlauf

Relative Proteinlevel (a) der Gesamtmenge an AKT bzw. (b) der phosphorylierten Fraktion der AKT-Kinase. Zur Normierung der Werte wurde der 0-Stunden-Wert der AS-siRNA-Kontrolle verwendet. Signifikante Ergebnisse der Vergleiche von Proteinleveln zwischen den verschiedenen Behandlungen sind mit einem * entsprechend dem Signifikanzniveau markiert, Vergleiche innerhalb einer Behandlung zum jeweiligen 0-Stunden-Wert mit einem #. $n = 5$ (0 h und 10 min) bzw. 4 (6 h); */# $p < 0,05$; **/## $p < 0,01$

Die Kinasen ERK 1/2 (siehe Abb. 3.30 für einen exemplarischen Western-Blot bzw. Abb. 3.31 a) zeigten sich bezüglich der Gesamtmenge des Proteins in unbehandelten Keratinozyten relativ unbeeinflusst im beobachteten Zeitraum bis sechs Stunden nach Setzen der Wunde im Monolayer, und auch die Behandlung mit der Kontroll-siRNA übte keinen eindeutigen Einfluss aus. Bei Behandlung der Zellen mit der siRNA #8 zum Knockdown von Claudin-1 ergab sich hingegen eine tendenzielle Reduktion der Gesamtproteinmenge bereits in unverwundeten Zellen. Darüber hinaus war nur unter diesen Konditionen nach Verwundung des Monolayers eine weitere Verringerung der Proteinmenge zu beobachten, die bereits nach zehn Minuten deutlich erkennbar und nach sechs Stunden mit einer Reduktion auf knapp die Hälfte ($56 \% \pm 26 \%$; $p = 0,038$) des Ausgangswertes der unverwundeten KD-Zellen auch signifikant war (siehe Abb. 3.31 a). Auch im Vergleich mit der Proteinmenge in den Zellpräparationen der beiden Kontrollbehandlungen zeigte sich deutlich eine Verringerung der Gesamtproteinmenge, wobei der Unterschied zwischen der Behandlung mit AS-siRNA und Claudin-1-siRNA #8 nur zehn Minuten nach Scratches der Zellen statistisch signifikant war (KD-Zellen mit $61 \% \pm 22 \%$ der Menge der AS-siRNA-Kontrolle; $p = 0,017$).

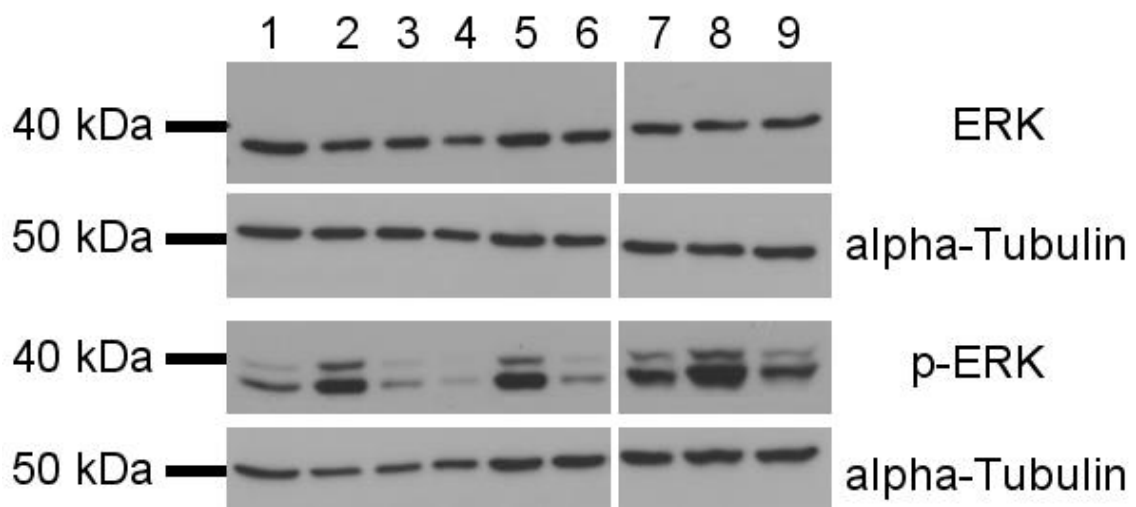


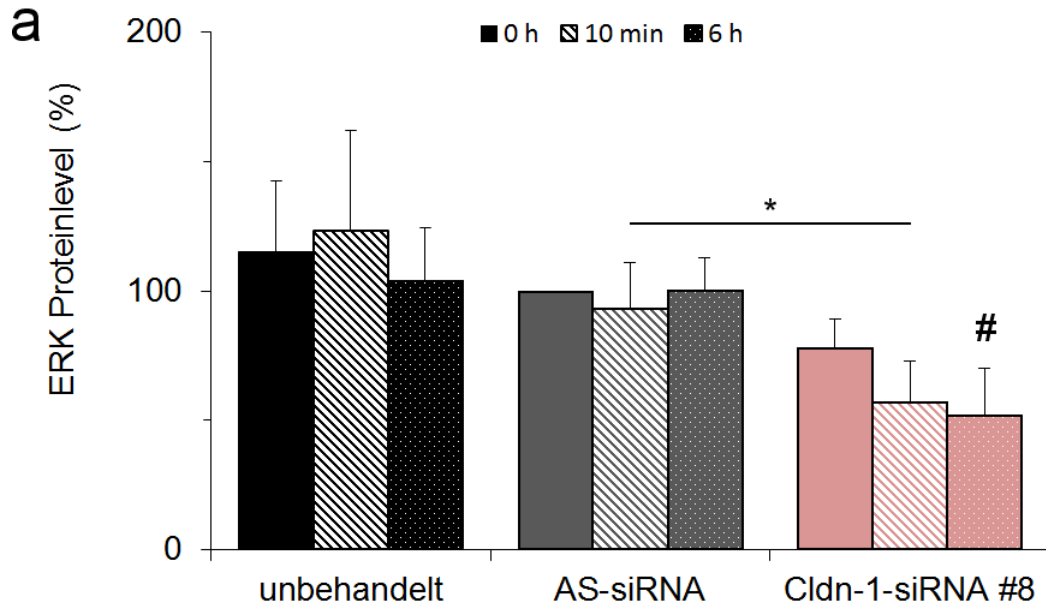
Abb. 3.30 ERK 1/2 Kinase im Western-Blot

Exemplarischer Western-Blot von Proteinisolaten aus Keratinozyten 0 (1,4,7), 10 (2,5,8) bzw. 360 min (3,6,9) nach Wundsetzung, die entweder unbehandelt (1-3) oder mit AllStars-siRNA (4-6) bzw. Claudin-1-siRNA #8 (7-9) inkubiert worden waren. Das Zielprotein des zur Markierung der Banden verwendeten Antikörpers ist neben dem jeweiligen Blotabschnitt notiert. α -Tubulin wurde hier als Ladekontrolle verwendet.

Für die phosphorylierte Form von ERK 1/2 (siehe Abb. 3.30 für einen exemplarischen Western-Blot bzw. Abb. 3.31 b) zeigte sich wie schon bei p-AKT in den unbehandelten Kontrollzellen ein deutlicher und signifikanter Anstieg ($295 \% \pm 133 \%$; $p = 0,042$) zehn Minuten nach Setzen der Wunde. Nach sechs Stunden allerdings ließ sich nur noch knapp die Hälfte der Menge an p-ERK 1/2 nachweisen ($52 \% \pm 22 \%$; $p = 0,031$), die in

unverwundeten Zellen gefunden wurde, was ebenfalls eine signifikante Veränderung bedeutete. In den mit der AS-siRNA behandelten Zellen zeigte sich tendenziell eine

Einfluss des Claudin-1 Knockdowns auf die ERK-Kinase Gesamtproteinmenge der ERK-Kinase nach Scratch



Phosphorylierung der ERK-Kinase nach Scratch

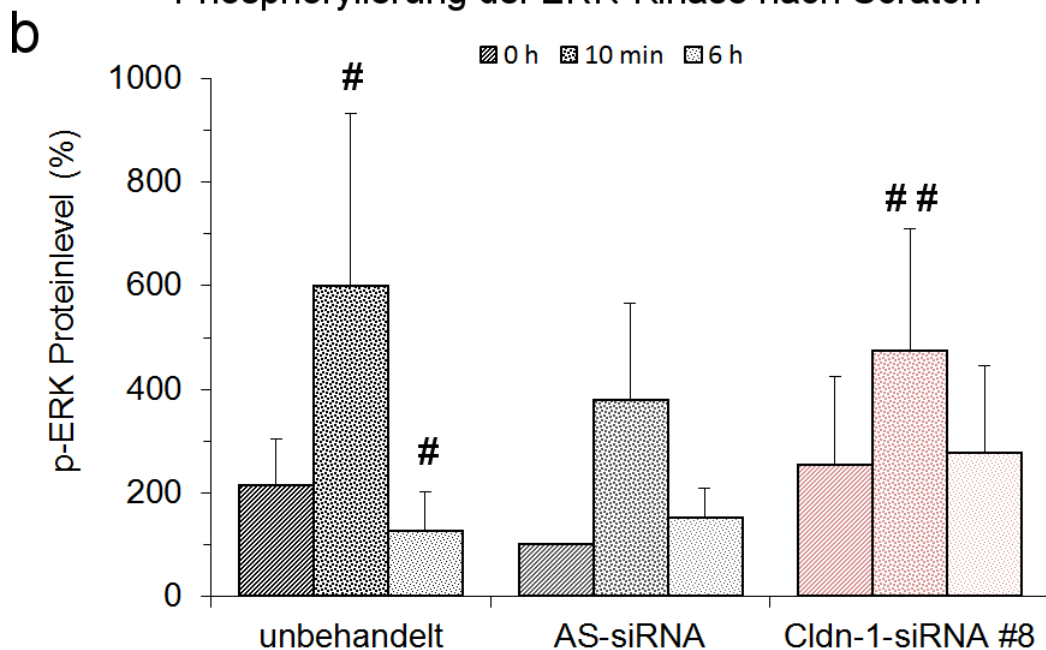


Abb. 3.31 Regulation der ERK-Kinase im Scratchverlauf

Relative Proteinlevel (a) der Gesamtmenge an ERK 1/2 bzw. (b) der phosphorylierten Fraktion der ERK 1/2-Kinase. Zur Normierung der Werte wurde der 0-Stunden-Wert der AS-siRNA-Kontrolle verwendet. Signifikante Ergebnisse der Vergleiche von Proteinleveln zwischen den verschiedenen Behandlungen sind mit einem * entsprechend dem Signifikanzniveau markiert, Vergleiche innerhalb einer Behandlung zum jeweiligen 0-Stunden-Wert mit einem #. n = 5 (0 h und 10 min) bzw. 4 (6 h); */# p < 0,05

ähnliche Dynamik der Regulation von p-ERK 1/2 im Verlauf der Wundheilung, wenn auch ohne statistische signifikante Unterschiede zu bewirken. Die mit der Claudin-1 siRNA #8 behandelten Keratinozyten zeigten ebenfalls initial einen signifikanten Anstieg der Menge an p-ERK 1/2 nach Verwundung des Monolayers ($293 \% \pm 105 \%$; $p = 0,009$ im Vergleich zum Ausgangsniveau), und nach sechs Stunden hatte sich die Proteinmenge knapp über dem Ausgangsniveau der unverletzten KD-Zellen eingepegelt. Ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen konnte nicht beobachtet werden.

Bei der Auswertung der Regulation der p38-MAP-Kinase (siehe Abb. 3.32 für einen exemplarischen Western-Blot bzw. Abb. 3.33 a) zeigte sich, dass aus unverwundeten Zellen oftmals keine nachweisbaren Mengen an phosphoryliertem p38 extrahiert werden konnten. Da in einem Fall auch nach Verwundung des Keratinozyten-Monolayers kein p-p38 in den unbehandelten Kontrollzellen detektierbar war, wurde für die Auswertung der Regulation der p38-MAP-Kinase die Proteinmenge in den AS-siRNA-behandelten Zellen zum Zeitpunkt zehn Minuten nach Scratch als Referenzwert für die Vergleiche zwischen den verschiedenen experimentellen Ansätzen verwendet.

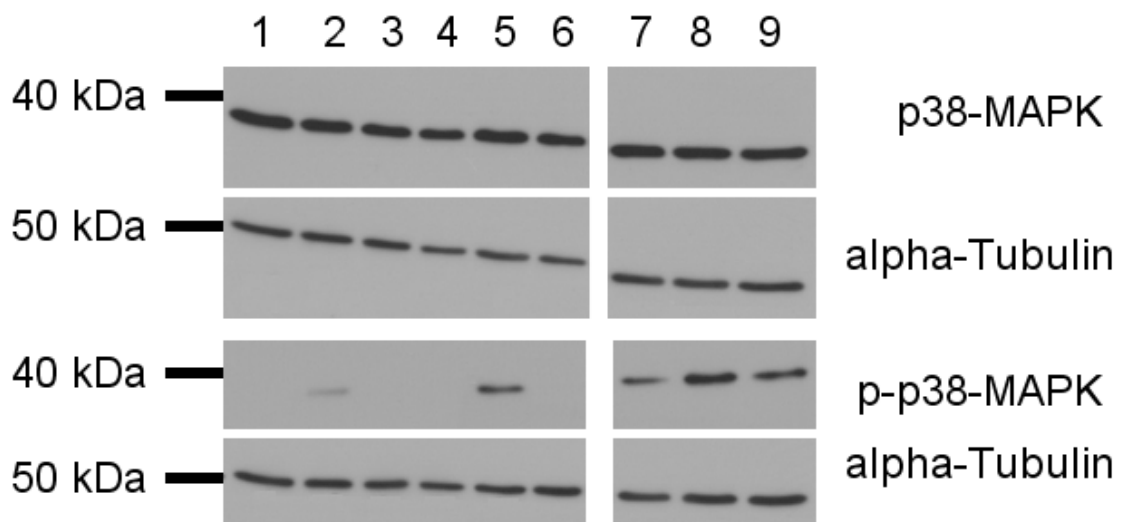


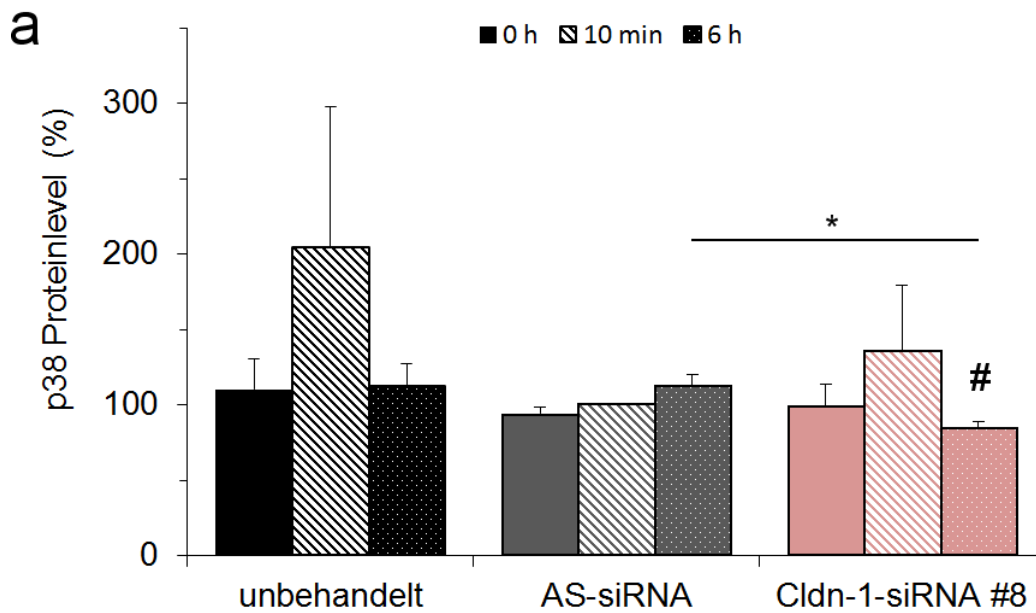
Abb. 3.32 p38-MAP-Kinase im Western-Blot

Exemplarischer Western-Blot von Proteinisolaten aus Keratinozyten 0 (1,4,7), 10 (2,5,8) bzw. 360 min (3,6,9) nach Wundsetzung, die entweder unbehandelt (1-3) oder mit AllStars-siRNA (4-6) bzw. Claudin-1-siRNA #8 (7-9) inkubiert worden waren. Das Zielprotein des zur Markierung der Banden verwendeten Antikörpers ist neben dem jeweiligen Blotabschnitt notiert. α -Tubulin wurde hier als Ladekontrolle verwendet.

Im Verlauf der ersten sechs Stunden nach Setzen der Wunde zeigte sich für die AS-siRNA-Kontrollzellen keine Veränderung im Proteinlevel der p-38-MAP-Kinase. In den unbehandelten Keratinozyten und den Claudin-1-Knockdownzellen dagegen wurde zuerst ein leichter, nicht signifikanter Anstieg zum 10-Minuten-Zeitpunkt beobachtet, und nach sechs Stunden dann nur in den Knockdownzellen eine leichte, aber

signifikante Verringerung der Gesamtproteinmenge von p38 im Vergleich zum Ausgangswert ($82 \% \pm 16 \%$; $p = 0,044$)(siehe Abb. 3.33 **a**). Ebenso war zu diesem Zeitpunkt auch ein leichter, aber signifikanter Unterschied zwischen der AS-siRNA-Kontrolle und den Claudin-1-Knockdownzellen feststellbar (Cldn-1-KD: $76 \% \pm 9 \%$ von AS; $p = 0,022$). Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der p38-Gesamtproteinmengen. Die Menge an phosphorylierter p38-MAP-Kinase (siehe Abb. 3.32 für einen exemplarischen Western-Blot bzw. Abb. 3.33 **b**) hingegen variierte deutlich in Abhängigkeit vom untersuchten Zeitpunkt, da wie bereits erwähnt in unverwundeten Zellen oftmals keine phosphorylierte p38-MAP-Kinase nachgewiesen werden konnte. Zehn Minuten nach dem Scratching konnte dann unabhängig von der Behandlung der Zellen regelmäßig ein deutlicher Anstieg detektiert werden, der nur bei den unbehandelten Keratinozyten nicht statistisch signifikant war. In Claudin-1-Knockdownzellen war zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich fast die gleiche Menge p-AKT vorhanden wie in den AS-siRNA-Kontrollzellen, und damit mehr als die doppelte Menge im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (unbehandelte Kontrolle: 42 %, Claudin-1-KD: 90 %, jeweils bezogen auf AS-siRNA-Referenzwert als 100 %). Die statistische Auswertung identifizierte diesen deutlichen Unterschied zwischen Claudin-1-Knockdownzellen und den unbehandelten Kontrollen als nicht signifikant, die Differenz zwischen der siRNA-Kontrollbehandlung und den unbehandelten Kontrollzellen erwies sich dagegen als statistisch signifikant. Nach sechs Stunden war, abgesehen von einer Ausnahme, in unbehandelten Zellen wiederum keine phosphorylierte p38-MAP-Kinase mehr nachweisbar (siehe Abb. 3.33 **b**). In den AS-siRNA-Kontrollzellen kam es ebenfalls zu einer Abnahme der Menge an p-p38-MAPK, wenn auch nicht so deutlich wie in den unbehandelten Kontrollen. In den mit der Claudin-1 siRNA #8 behandelten Keratinozyten ließen sich sechs Stunden nach Wundsetzung hingegen weiterhin signifikant ($p = 0,029$) größere Mengen von phosphoryliertem p38 nachweisen als in den unverwundeten Knockdown-Zellen, wobei im Durchschnitt betrachtet etwa das Niveau des 10-Minuten-Wertes beibehalten wurde (siehe Abb. 3.33 **b**). Verglichen mit der Proteinmenge in den unbehandelten Keratinozyten oder auch den AS-siRNA-Kontrollen zeigte sich dieses erhöhte Niveau nicht statistisch signifikant.

Einfluss des Claudin-1 Knockdowns auf die p38-Kinase Gesamtproteinmenge der p38-Kinase nach Scratch



Phosphorylierung der p38-Kinase nach Scratch

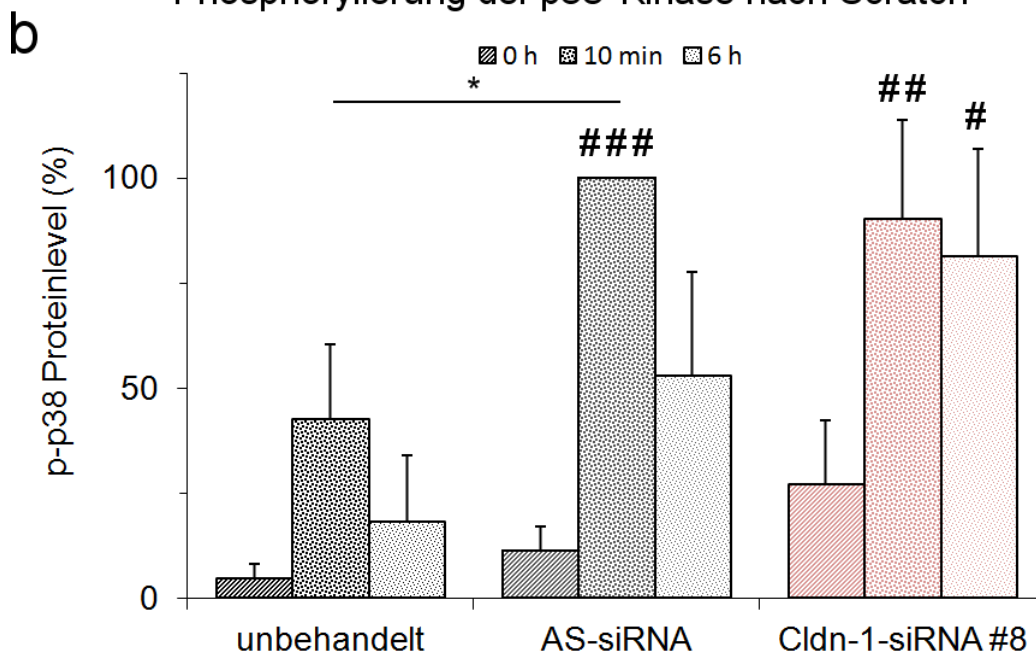


Abb. 3.33 Regulation der p38-MAP-Kinase im Scratchverlauf

Relative Proteinlevel (a) der Gesamtmenge an p38-MAPK bzw. (b) der phosphorylierten Fraktion der p38-MAP-Kinase. Zur Normierung der Werte wurde der 10-Minuten-Wert der AS-siRNA-Kontrolle verwendet. Signifikante Ergebnisse der Vergleiche von Proteinleveln zwischen den verschiedenen Behandlungen sind mit einem * entsprechend dem Signifikanzniveau markiert, Vergleiche innerhalb einer Behandlung zum jeweiligen 0-Stunden-Wert mit einem #. n = 5 (0 h und 10 min) bzw. 4 (6 h); */# p < 0,05; **/### p < 0,01; ***/### p < 0,001

3.2.3.6. Bedeutung der AKT-Kinase

Zur Untersuchung der Bedeutung der veränderten Dynamik des Verlaufs der Menge an p-AKT in Claudin-1-Knockdownzellen (siehe Kapitel 3.2.3.5) wurden weitere Scratch-Wundheilungsversuche durchgeführt. Bei diesen wurden die Zellen mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 inkubiert, um die verringerte Menge an p-AKT und damit ebenfalls verminderte AKT-Kinase-Aktivität zu induzieren, die in den Claudin-1-Knockdownzellen beobachtet worden war. Der Inhibitor kam dabei in zwei unterschiedlichen Konzentrationen zum Einsatz, um eine mögliche Dosisabhängigkeit der Effekte von der Menge an p-AKT aufzudecken. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit wurden diese Experimente wie auch die Untersuchungen des Einflusses auf die Proteinkinasen im Medium KGM durchgeführt. Im Western-Blot bestätigte sich die Wirksamkeit des Inhibitors, wobei beide Konzentrationen eine starke und signifikante Herabregulation der Menge an p-AKT im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und der Lösungsmittelkontrolle verursachten (in Relation zur Lösungsmittelkontrolle: $3 \% \pm 5 \%$, $p < 0,001$ mit $2 \mu\text{M}$; $2 \% \pm 3 \%$, $p < 0,001$ mit $5 \mu\text{M}$ MK-2206; unbehandelte Zellen bei $78 \% \pm 12 \%$). Bei Inkubation mit dem Lösungsmittel DMSO alleine zeigte sich dagegen kein signifikanter Effekt auf p-AKT. Die Gesamtproteinmenge von AKT wurde durch keine der Behandlungen signifikant beeinflusst (in Relation zur Lösungsmittelkontrolle: $131 \% \pm 42 \%$ mit $2 \mu\text{M}$, $116 \% \pm 37 \%$ mit $5 \mu\text{M}$ MK-2206; unbehandelte Zellen bei $85 \% \pm 29 \%$)(siehe Abb. 3.34 für einen exemplarischen Westernblot).

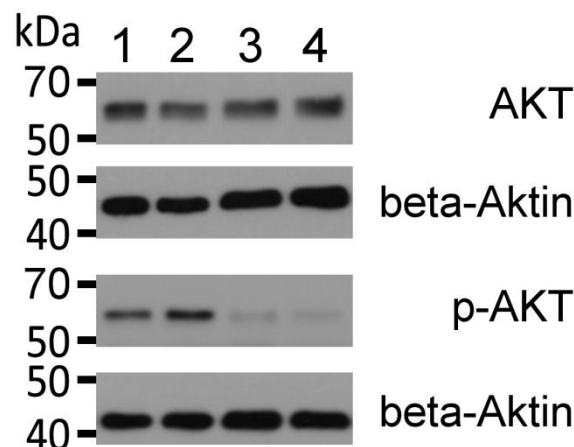


Abb. 3.34 AKT-Kinase im Western-Blot nach Inhibition mit MK-2206

Exemplarischer Western-Blot von Proteinisolaten aus Keratinozyten, die entweder unbehandelt (1), nur mit DMSO (2) oder mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 in einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ (3) bzw. $5 \mu\text{M}$ (4) inkubiert worden waren. Das Zielprotein des zur Markierung der Banden verwendeten Antikörpers ist neben dem jeweiligen Blotabschnitt notiert. α -Tubulin wurde hier als Ladekontrolle verwendet.

Die Wundheilungsgeschwindigkeit der Keratinozyten zeigte sich nach Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO tendenziell leicht beschleunigt im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (verheilte Wundfläche 113 %, 109 % bzw. 103 % zu 12, 24 bzw. 36 Stunden nach Verwundung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; siehe Abb. 3.35). Die Applikation des Inhibitors MK-2206 dagegen führte im Vergleich zu beiden Kontrollen zu einer signifikanten Verzögerung der Wundheilung, wobei die höhere Konzentration des Inhibitors einen stärkeren Effekt zeigte (siehe Abb. 3.35). Somit hatten die mit der höheren Konzentration behandelten Keratinozyten bereits zwölf Stunden nach Wundsetzung eine tendenziell deutlich kleinere verheilte Wundfläche als die unbehandelten Kontrollzellen, und eine signifikant kleinere verheilte Wundfläche im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (49 %; $p = 0,046$). Auch nach 24 Stunden war der Unterschied zwischen diesen beiden Behandlungen signifikant (50 %, $p = 0,012$). Darüber hinaus war zu diesem Zeitpunkt die verheilte Wundfläche der mit 5 μM MK-2206 behandelten Keratinozyten auch im Vergleich zu allen anderen Behandlungen signifikant kleiner, 36 Stunden nach Verwundung dann nur noch im

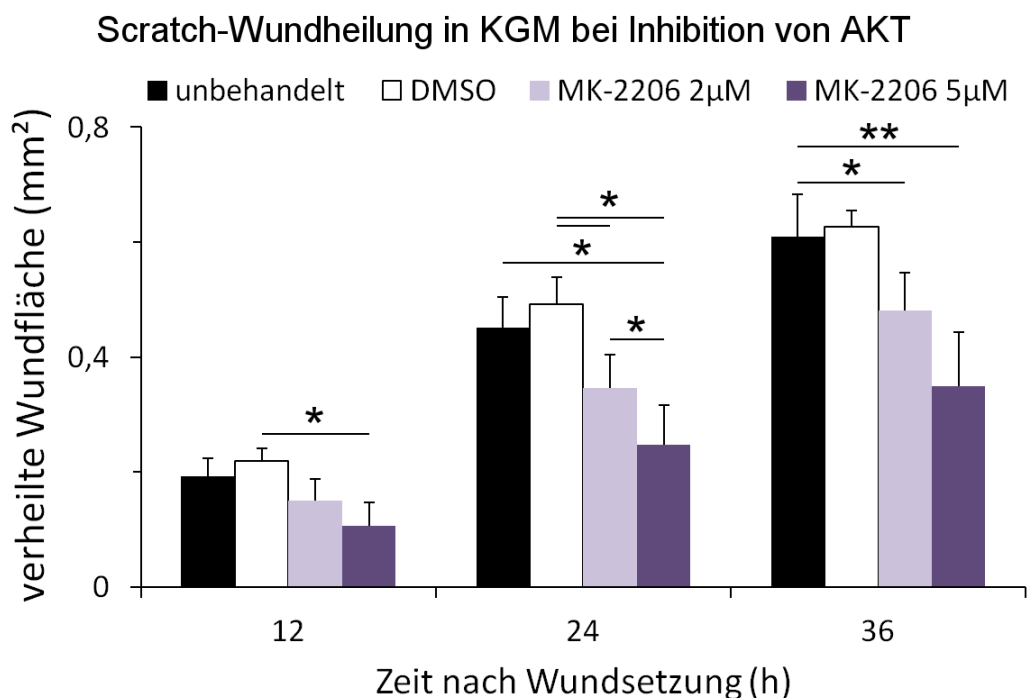


Abb. 3.35 Effekt der Inhibition der AKT-Kinase im Scratch-Assay

Durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) für die angegebenen Zeitpunkte von 12 bis 36 Stunden nach Wundsetzung bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM und optionaler Inkubation mit DMSO bzw. dem AKT-Kinase Inhibitor MK-2206 in einer Konzentration von 2 bzw. 5 μM . Signifikante Unterschiede sind entsprechend ihrem Signifikanzniveau mit einem oder mehreren * gekennzeichnet. $n = 3$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Wurden die Keratinozyten mit der niedrigeren Konzentration des Inhibitors behandelt, zeigte sich die verheilte

Wundfläche bereits nach 12 Stunden tendenziell kleiner als die der beiden Kontrollen, und 24 Stunden nach Verwundung dann auch signifikant verkleinert gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (70 %, $p = 0,02$). Nach 36 Stunden war die verheilte Wundfläche dann signifikant kleiner als die der unbehandelten Kontrollzellen (79 %, $p = 0,018$). Im Vergleich zur verheilten Wundfläche der mit DMSO behandelten Zellen war die Wundfläche der mit dem Inhibitor inkubierten Keratinozyten auch zu 36 Stunden immer noch deutlich, aber nicht mehr signifikant kleiner.

3.2.3.7. Zusammenfassung der Effekte des Claudin-1-Knockdowns

Zusammenfassend betrachtet zeigte der Knockdown von Claudin-1 weitreichende Auswirkungen auf die untersuchten zellphysiologischen Parameter (siehe Tab. 3.3), wobei besonders die starke Beeinträchtigung der Migration und Proliferation sowie die Beeinflussung der AKT-Kinase hervorstechen.

untersuchter Parameter	Effekt des Claudin-1-Knockdowns
<i>in vitro</i> Wundheilung	verlangsamte Wundheilung
Proliferation	verminderte Proliferationsrate
Migration	verringerte Migration
Differenzierung	Hochregulation verschiedener Differenzierungsmarker
AKT	Herabregulation nach Scratch
p-AKT	Herabregulation nach Scratch
ERK 1/2	initial und im Verlauf fortschreitende Herabregulation
p-ERK 1/2	keine eindeutige Veränderung
p38	Herabregulation 6 h nach Scratch
p-p38	Hochregulation 6 h nach Scratch
Occludin	tendenzielle Herabregulation
ZO-1	keine eindeutige Veränderung

Tab. 3.3 Zusammenfassung der Effekte des Claudin-1-Knockdowns

Tabellarische Übersicht der Auswirkungen der des Claudin-1-Knockdowns in primären humanen Keratinozyten. Rot hinterlegte Felder kennzeichnen eine signifikante Verringerung des entsprechenden Parameters, grün hinterlegte Felder eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur siRNA-Kontrolle.

3.2.4. Knockdown von Occludin

Für die gezielte Herabregulation der Expression des TJ-Proteins Occludin standen zwei verschiedene siRNA-Sequenzen zur Verfügung. Bei Kultivierung der Zellen im Medium KGM führte der Knockdown mit beiden Occludin-siRNAs zu einer signifikant verringerten mittleren Restproteinmenge im Vergleich zu den unbehandelten Keratinozyten und den AS-siRNA-Kontrollen (normiert auf unbehandelte Kontrollen: 21 % \pm 26 %, $p < 0,001$ (zu unbehandelt) bzw. $p = 0,008$ (zu AS-siRNA) für Occludin-siRNA #7; 12 % \pm 14 %, $p < 0,001$ (zu unbehandelt und AS-siRNA) für Occludin-siRNA #11)(siehe Abb. 3.36 für einen exemplarischen Western-Blot). Bei exemplarischer Kultivierung der Keratinozyten in Hoch-Calcium-KGM führte die Inkubation mit der Occludin-siRNA #11 zu einer massiven und signifikanten ($p < 0,001$) Herabregulation der Proteinmenge unterhalb der Nachweisgrenze (siehe Abb. 3.37). Wurden die primären humanen Keratinozyten im DermaLife-Medium kultiviert, verblieben durch den Knockdown mit der gegen Occludin gerichteten siRNA #7 im Mittel noch 28 % \pm 18 % der ursprünglichen Proteinmenge, und bei Verwendung der siRNA #11 waren durchschnittlich noch 11 % \pm 10 % der initialen Proteinmenge nachweisbar (siehe Abb. 3.36 für einen exemplarischen Western-Blot).

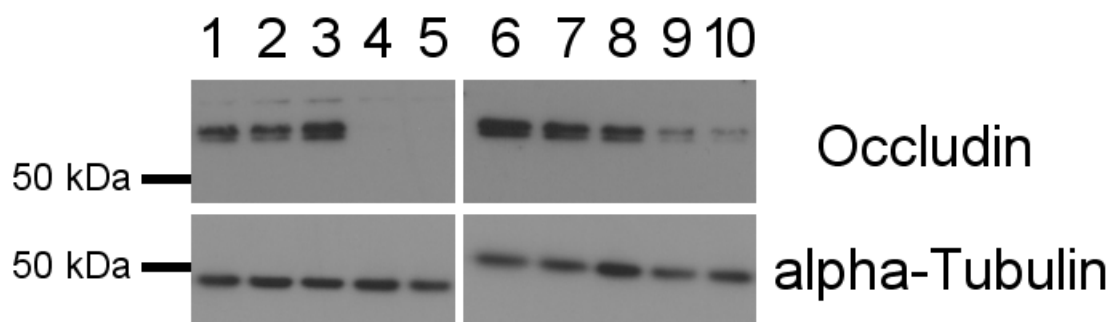


Abb. 3.36 Western-Blot von Occludin

Exemplarischer Western-Blot von Proteinisolaten aus Keratinozyten, die in KGM (1-5) bzw. DermaLife (6-10) kultiviert wurden und entweder unbehandelt (1,6) oder mit AllStars- (2,7) bzw. NeKo-siRNA (3,8) oder Occludin-siRNA #7 (4,9) bzw. #11 (5,10) inkubiert worden waren. Das Zielprotein des zur Markierung der Banden verwendeten Antikörpers ist neben dem jeweiligen Blotabschnitt notiert. α -Tubulin wurde hier als Ladekontrolle verwendet.

Damit führten beide siRNAs auch in diesem Medium zu einer signifikanten Verringerung der Menge an Occludin ($p < 0,001$ für beide siRNAs verglichen mit unbehandelt und AS-siRNA), wobei der Unterschied in der erreichten KD-Effizienz zwischen den beiden siRNA-Sequenzen im DL-Medium ebenfalls signifikant war ($p = 0,015$). Im Vergleich zwischen den beiden Medien zeigte sich dagegen kein Unterschied. Wie schon für Claudin-1 wurde auch für den Knockdown von Occludin die Effizienz in regulärem DermaLife-Medium ebenfalls auf mRNA-Ebene überprüft. Bei

Einsatz der siRNA #7 war tendenziell eine Reduktion auf rund die Hälfte des Ausgangswertes zu beobachten ($44 \% \pm 32 \%$), und nach Inkubation mit der siRNA #11 wurde eine noch geringere und sich signifikant vom Ausgangswert in unbehandelten Zellen unterscheidende Restmenge bestimmt ($29 \% \pm 28 \%$, $p = 0,048$). Auch der Unterschied zwischen den beiden verschiedenen siRNA-Sequenzen bezüglich der verbliebenen Menge an mRNA erwies sich als signifikant ($p = 0,028$). Verglichen mit der Menge an Occludin-mRNA in AS-siRNA-behandelten Zellen ($71 \% \pm 34 \%$, nicht signifikant verschieden zu unbehandelten Zellen) zeigte sich für die beiden Occludin-siRNAs kein signifikanter Unterschied, aber eine deutliche Tendenz.

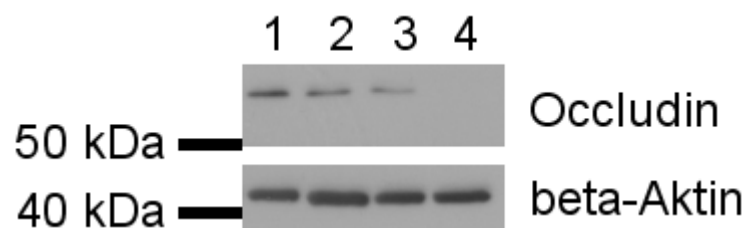


Abb. 3.37 Western-Blot von Occludin in Hoch-Calcium-KGM

Exemplarischer Western-Blot von Proteinisolaten aus Keratinozyten, die in Hoch-Calcium-KGM kultiviert wurden und entweder unbehandelt (1) oder mit AllStars-siRNA (2), Claudin-1-siRNA #8 (3) bzw. Occludin-siRNA #11 (4) inkubiert worden waren. Das Zielprotein des zur Markierung der Banden verwendeten Antikörpers ist neben dem jeweiligen Blotabschnitt notiert. β -Aktin wurde hier als Ladekontrolle verwendet.

Zur weiteren Aufklärung der Auswirkungen des gezielten Knockdowns von Occludin wurden auch die Proteinlevel der jeweils anderen untersuchten TJ-Proteine analysiert. Wurden die Keratinozyten mit den gegen Occludin gerichteten siRNAs behandelt, zeigte sich bei Kultivierung in KGM je nach verwendeter siRNA eine leichte, nur als Trend einzuordnende bzw. eine deutliche und signifikante Verringerung des Claudin-1-Proteinlevels ($75 \% \pm 48 \%$ für siRNA #11, nicht signifikant; $29 \% \pm 37 \%$, $p = 0,031$ (zu unbehandelt) bzw. $p = 0,017$ (zu AS-siRNA) für siRNA #7). Für die Proteinmenge von ZO-1 zeigte sich, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, keine signifikante Beeinflussung durch den Knockdown von Occludin ($93 \% \pm 51 \%$ für siRNA #7; $107 \% \pm 40 \%$ für siRNA #11). Bei Kultivierung der Keratinozyten in DermaLife zeigte sich für die Proteinmenge von Claudin-1 ein einheitlicheres Bild, da beide siRNAs im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen eine signifikante Verringerung um etwa die Hälfte bewirkten ($40 \% \pm 44 \%$, $p = 0,012$ (zu unbehandelt) bzw. $p = 0,026$ (zu AS-siRNA) für siRNA #7; $51 \% \pm 44 \%$, $p = 0,015$ für siRNA #11). Auch auf Ebene der mRNA zeigte sich tendenziell ein negativer Effekt des Occludin-Knockdowns auf die Expression von Claudin-1 ($41 \% \pm 29 \%$ für siRNA #7; $59 \% \pm 37 \%$ für siRNA #11). Für ZO-1 zeigte sich bei Kultivierung in DermaLife wie schon in KGM kein signifikanter Einfluss des Occludin-Knockdowns, die mittlere Proteinmenge war aber tendenziell leicht erhöht

(125 % \pm 66 % für siRNA #7; 142 % \pm 68 % für siRNA #11). Bei Betrachtung der mRNA zeigte sich mit der siRNA #7 eine leichte, aber signifikante Verringerung (81 % \pm 5 %, $p = 0,023$), bei Einsatz der Occludin-siRNA #11 ließ sich keine signifikante Veränderung beobachten (93 % \pm 10 %).

3.2.4.1. Effekt auf die Scratch-Wundheilung

Der Knockdown von Occludin hatte keinen eindeutigen Effekt auf die gemessene Wundheilungsgeschwindigkeit primärer humaner Keratinozyten. Bei Kultivierung der Zellen in KGM führte die Inkubation mit der siRNA #7 zu einer leichten Verlangsamung der Wundheilung (28 % langsamer als unbehandelte Kontrollen im Zeitraum 0-24 Stunden), sodass sich 24 und 36 Stunden nach Wundsetzung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ein signifikanter Unterschied in der verheilten Wundfläche zeigte, aber nicht zu der siRNA-Kontrollbehandlung. Bei Behandlung der Keratinozyten mit der Occludin-siRNA #11 war die Wundheilung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen tendenziell nur leicht vermindert und lag, wie auch zu allen anderen Zeitpunkten, etwa auf dem Niveau der AS-siRNA-Kontrolle. Zu keinem Zeitpunkt ergab sich ein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten oder der AS-siRNA-Kontrolle (siehe Abb. 3.38). Bei Kultivierung der Keratinozyten in Hoch-Calcium-KGM (siehe Abb. 3.39) zeigte sich bei Inkubation mit der Occludin-siRNA #11 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen wie auch bei Inkubation mit der AS-siRNA eine tendenziell leicht verzögerte Wundheilung, die auf dem gleichen Niveau wie die AS-siRNA-Kontrolle lag.

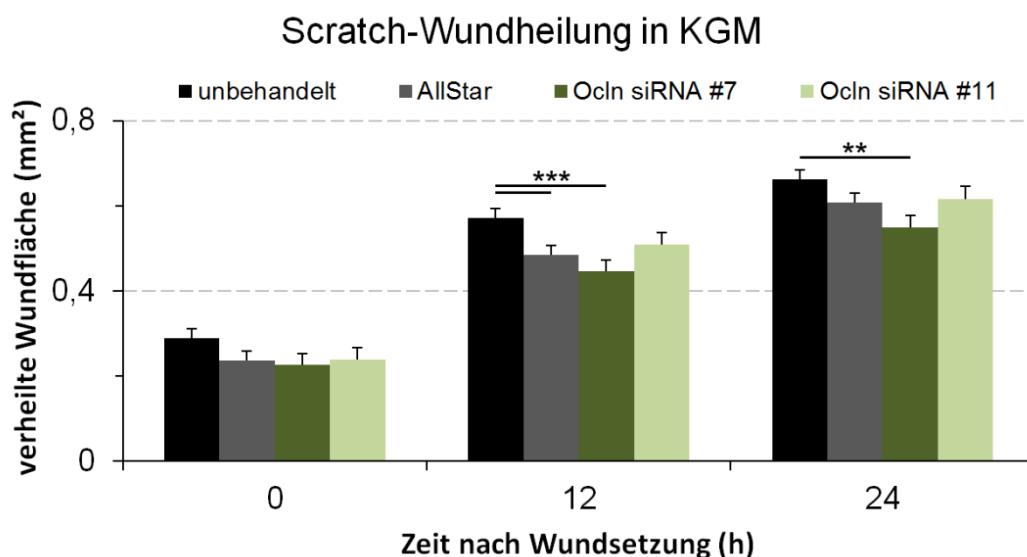


Abb. 3.38 Effekt des Occludin-Knockdowns im Scratch-Assay in KGM

Durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) der Occludin-Knockdown- und Kontrollzellen für die angegebenen Zeitpunkte von 12 bis 36 Stunden nach Wundsetzung bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM. Signifikante Unterschiede sind entsprechend ihrem Signifikanzniveau mit einem oder mehreren * gekennzeichnet. $n = 16, 17, 7, 7$ (v. l. n. r.); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

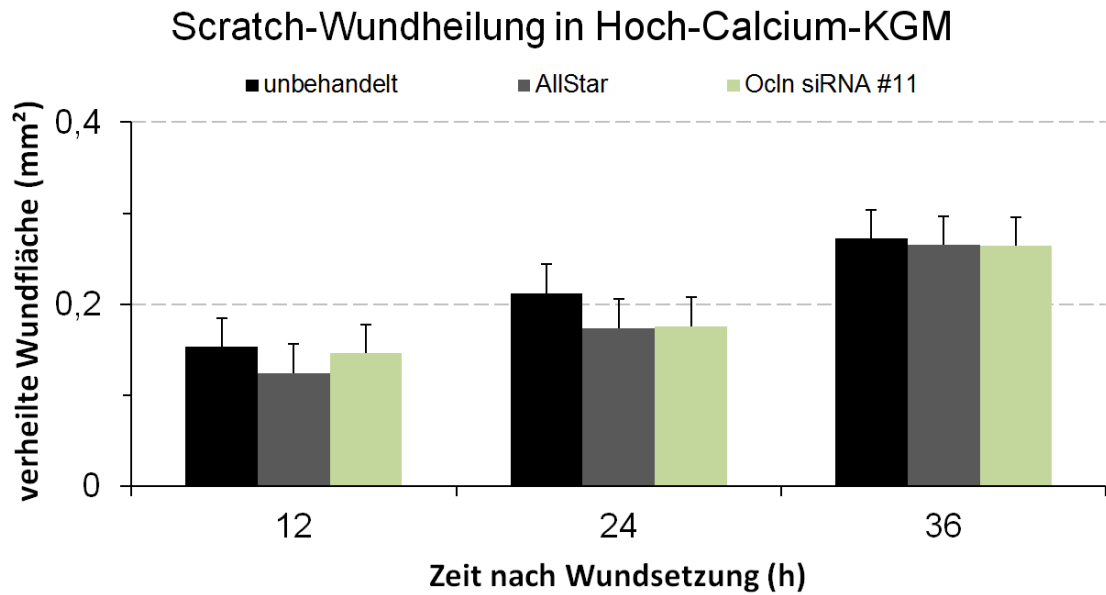


Abb. 3.39 Effekt des Occludin-Knockdowns im Scratch-Assay in Hoch-Calcium-KGM

Durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) der Occludin-Knockdown- und Kontrollzellen für die angegebenen Zeitpunkte von 12 bis 36 Stunden nach Wundsetzung bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM mit hoher Calcium-Konzentration. n = 3

Zu keiner der beiden Kontrollen ergab sich ein signifikanter Unterschied in der verheilten Wundfläche. Bei Kultivierung der Zellen mit DL-Medium (siehe Abb. 3.40)

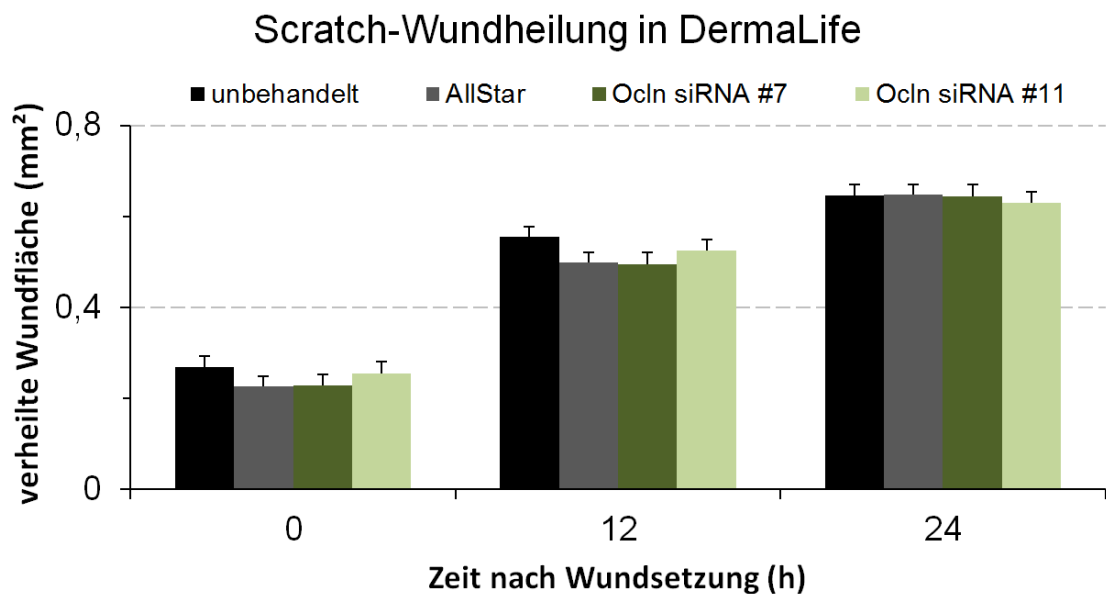


Abb. 3.40 Effekt des Occludin-Knockdowns im Scratch-Assay in DermaLife

Durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) der Occludin-Knockdown- und Kontrollzellen für die angegebenen Zeitpunkte von 12 bis 36 Stunden nach Wundsetzung bei Kultivierung der Keratinozyten in DermaLife. Signifikante Unterschiede sind entsprechend ihrem Signifikanzniveau mit einem oder mehreren * gekennzeichnet. n = 13, 14, 11, 11 (v. l. n. r.);

zeigten die Keratinozyten sowohl bei Behandlung mit der AS-siRNA als auch der Occludin-siRNA #7 eine tendenziell leicht verlangsamte Wundheilung, signifikante Veränderungen wurden nicht gemessen. Der Knockdown mit der Occludin-siRNA #11 zeigte keine Veränderung der Wundheilungsgeschwindigkeit im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen und lag damit leicht über dem Niveau der AS-siRNA-Kontrollen, allerdings ebenfalls ohne statistische Signifikanz.

3.2.4.2. Effekt auf die Proliferation

Auch die Auswertung der Proliferationsrate der Keratinozyten am Wundrand erbrachte keinen Nachweis für eine Beeinflussung durch die Inkubation der Zellen mit den gegen Occludin gerichteten siRNAs. Bei Kultivierung des Zellmonolayers in KGM und anschließender Verwundung ließen sich 24 Stunden später je nach verwendeter siRNA 93-94 % der Zellen am Wundrand mit dem Antikörper für den Proliferationsmarker Ki67 anfärben (siehe Abb. 3.41), was auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollzellen und etwas über dem Wert der AS-siRNA-Kontrolle lag, aber keinen signifikanten Unterschied zu den beiden Kontrollen darstellte. Bei Kultivierung der Keratinozyten mit DermaLife zeigten sich durchschnittlich 94-96 % der Zellen am Wundrand positiv für Ki67, was wiederum keine signifikante Abweichung von den Werten der beiden Kontrollen darstellte (siehe Abb. 3.41).

Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten nach Occludin-Knockdown

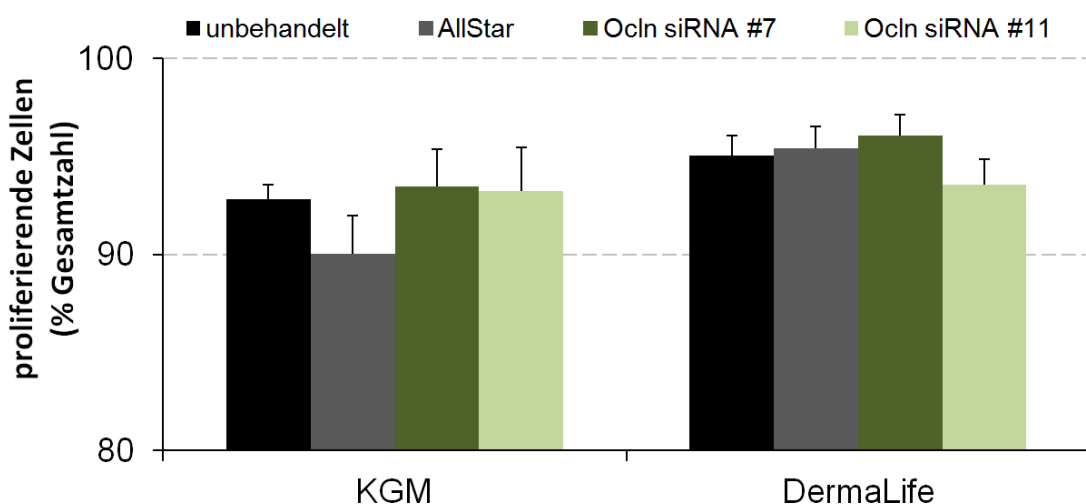


Abb. 3.41 Proliferation der Keratinozyten bei Occludin-Knockdown

Anteil Ki67-positiv gefärbter und damit proliferativ aktiver Keratinozyten am Wundrand der Scratchwunden 24 Stunden nach Verwundung in den verschiedenen Behandlungsansätzen bei Kultivierung der Zellen in KGM bzw. DL. n = 8 für beide Kontrollen, 5 für die Occludin-siRNAs

3.2.4.3. Effekt auf Scratch-Wundheilung unter mechanischem Stress

Aufgrund früherer Experimente der Arbeitsgruppe zum Einfluss eines Knockdowns von Occludin auf Zell-Zell-Verbindungen von Keratinozyten (Rachow et al, 2013) die zeigten, dass der Knockdown von Occludin zu einer verminderten Zell-Zell-Adhäsion führt, und da auch *in vivo* Wunden durch die Bewegung der Patienten gewissen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, wurden die Versuche zur *in vitro*-Scratch-Wundheilung unter modifizierten Bedingungen wiederholt, um die Auswirkungen des Occludin-Knockdowns unter mechanischem Stress zu überprüfen. Um die Vergleichbarkeit mit den früheren Experimenten zur Zell-Zell-Adhäsion zu gewährleisten, bei denen die „Negative Control“-siRNA als Kontroll-siRNA benutzt worden war, wurden auch die Versuche zum Einfluss von mechanischem Stress mit dieser Kontroll-siRNA durchgeführt, um einen gemeinsamen Referenzpunkt zu haben. Zuerst wurden die Experimente bei Kultivierung der Zellen mit niedriger Calcium-Konzentration durchgeführt. Beim Vergleich der Wundheilung zwischen geschüttelten und ungeschüttelten Zellen zeigte sich für unbehandelte Keratinozyten kein eindeutiger Effekt durch den mechanischen Stress (siehe Abb. 3.42), und auch die Vitalität der Zellen, ermittelt über einen MTT-Assay, wurde nicht signifikant beeinflusst (geschüttelte Zellen mit $89 \% \pm 12 \%$, normiert auf ungeschüttelte Zellen).

Scratch-Wundheilung unter mechanischer Belastung

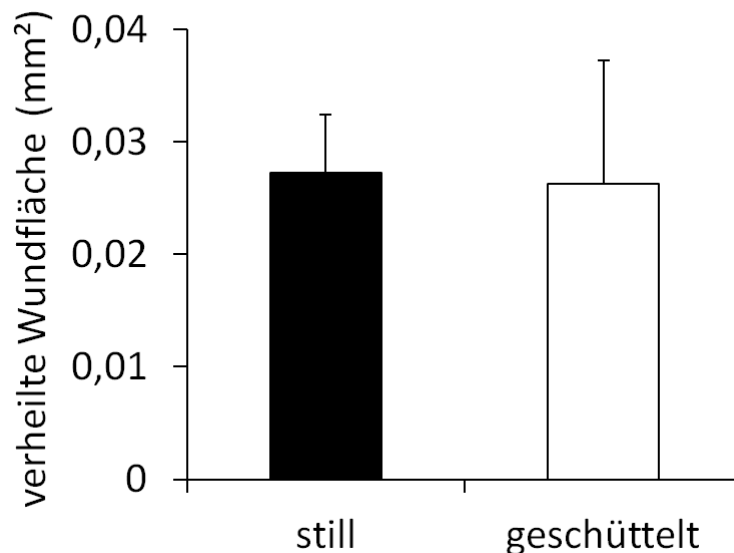


Abb. 3.42 Vergleich Scratch-Assay ohne und mit mech. Stress

Durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) der ungeschüttelten bzw. geschüttelten Keratinozyten sechs Stunden nach Wundsetzung bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM mit niedriger Calcium-Konzentration. $n = 3$

Die Inkubation der Keratinozyten mit der Kontroll-siRNA bewirkte keine signifikante Beeinflussung der Wundheilung durch den zusätzlichen Stress (siehe Abb. 3.43) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Für die mit Occludin-siRNA behandelten Zellen zeigte sich eine Verringerung der verheilten Wundfläche in den ersten sechs Stunden nach Wundsetzung im Vergleich zu den mit der Kontroll-siRNA behandelten Keratinozyten, wobei dieser Effekt mit der siRNA #7 stärker, aber nicht signifikant war ($p = 0,098$), wohingegen der schwächere Effekt bei mit Occludin-siRNA #11 behandelten Zellen statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,015$) (siehe Abb. 3.43). Auch im direkten Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen war die Abweichung für die Behandlung mit der Occludin-siRNA #11 signifikant ($p = 0,035$), für die Behandlung mit der Occludin-siRNA #7 wiederum nicht.

Scratch-Wundheilung unter mechanischer Belastung

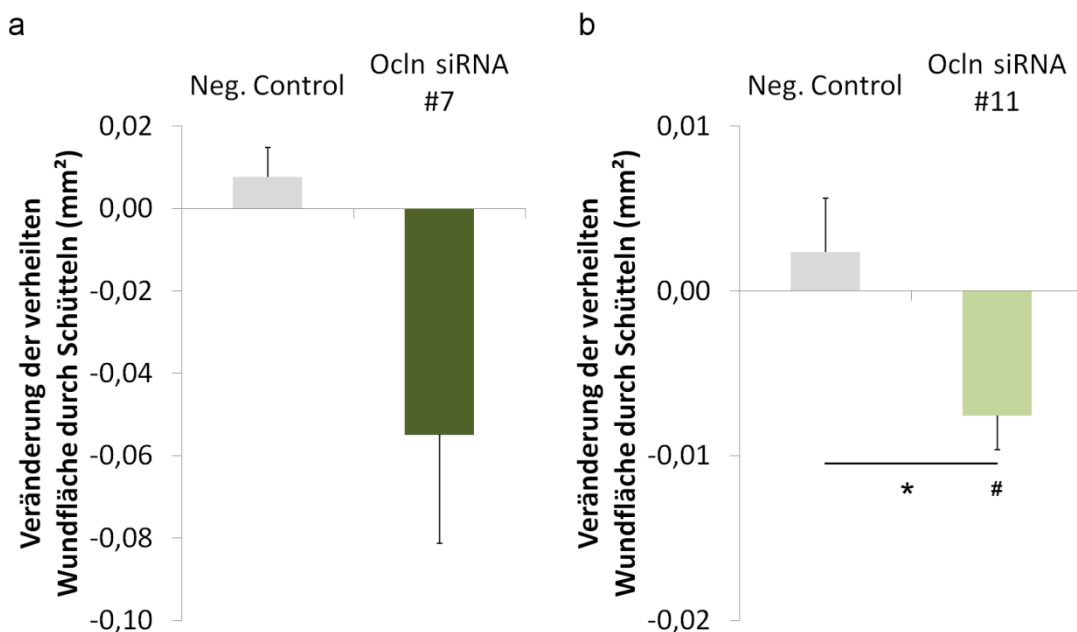


Abb. 3.43 Scratch-Assay mit Occludin-Knockdownzellen unter mech. Stress

Unterschied in der Wundfläche, die von den Keratinozyten mit den verschiedenen Behandlungen unter normalen bzw. gestressten Bedingungen innerhalb der ersten 6 Stunden nach Scratch bedeckt wurden. Alle Werte jeweils normiert auf die Veränderung in der unbehandelten Kontrolle. Negative Werte bedeuten eine kleinere verheilte Wundfläche im gerüttelten Scratch-Ansatz. Signifikante Unterschiede sind entsprechend ihrem Signifikanzniveau mit einem * (Vergleich zwischen Kontroll-siRNA und Occludin-siRNA) oder # (Vergleich zur unbehandelten Kontrolle). markiert. $n = 4$; $*/\# = p < 0,05$

Des Weiteren wurden die Experimente auch mit Keratinozyten in Hoch-Calcium-Medium durchgeführt (siehe Abb. 3.44). Unter diesen Bedingungen zeigte die Behandlung mit der Kontroll-siRNA erneut keinen signifikanten Einfluss auf die Wundheilung. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Experimenten mit niedriger

Calcium-Konzentration veränderte auch die Inkubation der Zellen mit der Occludin-siRNA #7 bzw. #11 die Reaktion der Zellen auf den mechanischen Stress nicht.

Scratch-Wundheilung unter mechanischer Belastung in Hoch-Calcium-Medium

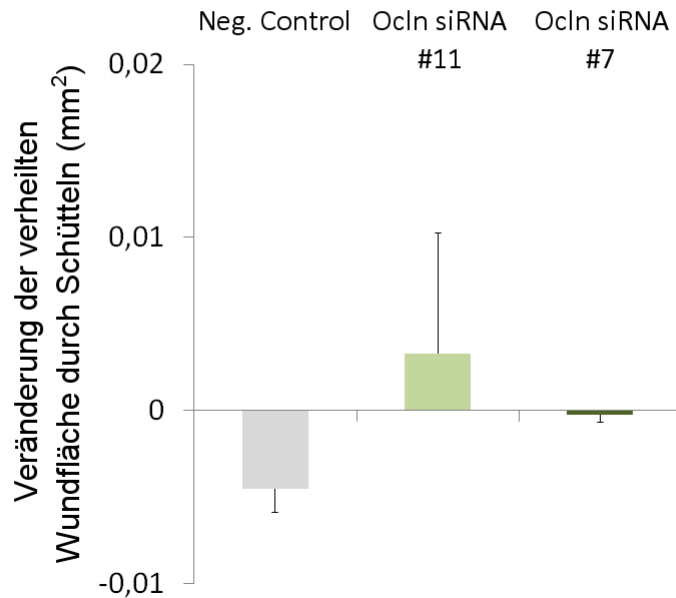


Abb. 3.44 Scratch-Assay mit Occln-KD-Zellen unter mech. Stress in Hoch-Calcium-Medium

Unterschied in der Wundfläche, die von den Keratinozyten in Hoch-Calcium-KGM mit den verschiedenen Behandlungen unter normalen bzw. gestressten Bedingungen innerhalb der ersten 6 Stunden nach Scratch bedeckt wurden. Alle Werte jeweils normiert auf die Veränderung in den unbehandelten Kontrollen. Negative Werte bedeuten eine kleinere verheilte Wundfläche im gerüttelten Scratch-Ansatz. n = 3

3.2.4.4. Zusammenfassung der Effekte des Occludin-Knockdowns

Zusammenfassend betrachtet zeigte der Knockdown von Occludin nur unter bestimmten Voraussetzungen, nämlich bei Kultivierung der Zellen mit einer geringen Calcium-Konzentration und gleichzeitiger mechanischer Belastung, Auswirkungen auf die *in vitro* Wundheilung (siehe Tab. 3.3), wobei besonders die starke Beeinträchtigung der Migration und Proliferation sowie die Beeinflussung der AKT-Kinase hervorstechen.

untersuchter Parameter	Effekt des Occludin-Knockdowns
<i>in vitro</i> Wundheilung	keine eindeutige Veränderung
Proliferation	keine eindeutige Veränderung
<i>in vitro</i> Wundheilung bei mech. Stress	verlangsamte Wundheilung (nur in Niedrig-Calcium-KGM)
Claudin-1	Herabregulation
ZO-1	keine eindeutige Veränderung

Tab. 3.4 Zusammenfassung der Effekte des Occludin-Knockdowns

Tabellarische Übersicht der Auswirkungen des Occludin-Knockdowns in primären humanen Keratinozyten. Rot hinterlegte Felder kennzeichnen eine signifikante Verringerung des entsprechenden Parameters im Vergleich zur siRNA-Kontrolle.

3.2.5. Knockdown von ZO-1

Der Knockdown des TJ-Proteins ZO-1 erfolgte in den allerersten *in vitro* Wundheilungsversuchen, bei ausschließlicher Kultivierung der Zellen im DermaLife-Medium, mit zwei verschiedenen siRNAs, der ZO-1-siRNA #6 bzw. ZO-1-siRNA #7 (siehe Abb. 3.45 für einen exemplarischen Western-Blot). Beide siRNAs bewirkten eine signifikante Verringerung der Proteinmenge im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ($26 \% \pm 16 \%$, $p = 0,016$ bzw. $12 \% \pm 12 \%$, $p = 0,006$ für ZO-1-siRNA #6 bzw. #7), und auch im Vergleich zur AS-siRNA-Kontrollbehandlung war die Herabregulation von ZO-1 durch die beiden siRNAs tendenziell deutlich (ZO-1 siRNA #6) bzw. signifikant (ZO-1 siRNA #7; $p = 0,026$) stärker. Die mit der ZO-1-siRNA #7 erreichte Absenkung der ZO-1-Proteinmenge war zudem noch einmal signifikant ($p = 0,047$) stärker als bei Verwendung der ZO-1-siRNA #6. Auf Ebene der mRNA zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden siRNAs, die im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen und der AS-siRNA-Behandlung eine gleich starke, signifikante Verringerung der ZO-1 mRNA bewirkten ($23 \% \pm 26 \%$, $p = 0,04$ (zu unbehandelt) bzw. $p = 0,025$ (zu AS-siRNA) für ZO-1-siRNA #6; $27 \% \pm 21 \%$, $p = 0,03$ (zu unbehandelt) bzw. $p = 0,016$ (zu AS-siRNA) für ZO-1-siRNA #7). Spätere Versuche, parallel durchgeführt in DermaLife und dem alternativen Zellkulturmedium KGM, beschränkten sich aufgrund des Ausbleibens eines signifikanten Effekts in den vorhergehenden Scratch-Versuchen auf den Einsatz der bezüglich des Knockdowns effektiveren ZO-1-siRNA #7. Die in diesen Versuchen erreichten KD-Effizienzen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Medien und erreichten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, und auch der AS-siRNA-Kontrolle, unter beiden Kulturbedingungen statistische Signifikanz ($17 \% \pm 6 \%$ in KGM, $p < 0,001$ (zu unbehandelt) bzw. $p = 0,036$ (zu AS-siRNA); $32 \% \pm 35 \%$ in DL, $p = 0,005$ (zu unbehandelt) bzw. $p = 0,021$ (zu AS-siRNA))(siehe Abb. 3.45 für einen exemplarischen Western-Blot).

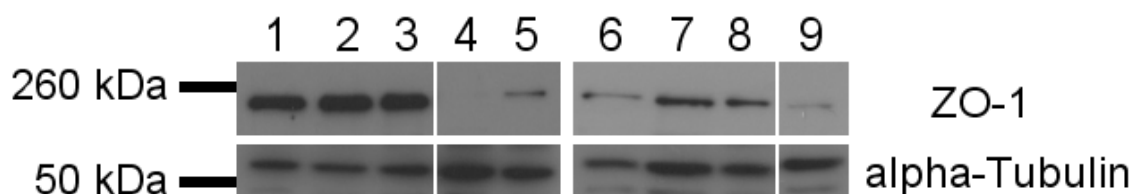


Abb. 3.45 Western-Blot von ZO-1

Western-Blot von Proteinisolaten aus Keratinozyten, die in DermaLife (1-5) bzw. KGM (6-9) kultiviert wurden und entweder unbehandelt (1,6) oder mit AllStars- (2,7) bzw. NeKo-siRNA (3,8) oder ZO-1-siRNA #6 (4) bzw. #7 (5,9) inkubiert worden waren. Das Zielprotein des zur Markierung der Banden verwendeten Antikörpers ist neben dem jeweiligen Blotabschnitt notiert. α -Tubulin wurde hier als Ladekontrolle verwendet.

Der Knockdown von ZO-1 mit der ZO-1 siRNA #7 führte bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM zu keinem einheitlichen Trend bezüglich einer veränderten Regulation der Proteinmenge von Occludin ($91 \% \pm 47 \%$) und Claudin-1 ($98 \% \pm 40 \%$). Wurden die Zellen in DermaLife gezüchtet, zeigten sich signifikant reduzierte Proteinmengen sowohl für Occludin ($53 \% \pm 34 \%$; $p = 0,006$ (zu unbehandelt) bzw. $p = 0,037$ (zu AS-siRNA)) als auch Claudin-1 ($55 \% \pm 43 \%$; $p = 0,022$ (zu unbehandelt)). Auf mRNA-Ebene zeigte sich durch den Knockdown von ZO-1 ein Trend zur Herabregulation von Claudin-1 ($51 \% \pm 34 \%$), für Occludin hingegen war keine eindeutige Regulation zu erkennen ($81 \% \pm 47 \%$).

3.2.5.1. Effekt auf die Scratch-Wundheilung

Nach Inkubation der primären humanen Keratinozyten mit der ZO-1-siRNA #7 zeigte sich bei Kultivierung in KGM eine leicht verlangsamte Wundheilung auf bzw. knapp unter dem Niveau der AS-siRNA-Kontrolle, sodass sich zu 24 und 36 Stunden nach dem Scratch im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, aber nicht zur AS-siRNA-Kontrollbehandlung, ein kleiner aber signifikanter Unterschied in der verheilten Wundfläche ergab (siehe Abb. 3.46). Gegenüber der AS-siRNA-Kontrolle war die Wundheilung bei einem Knockdown von ZO-1 nicht signifikant verändert, sondern tendenziell nur leicht beeinträchtigt.

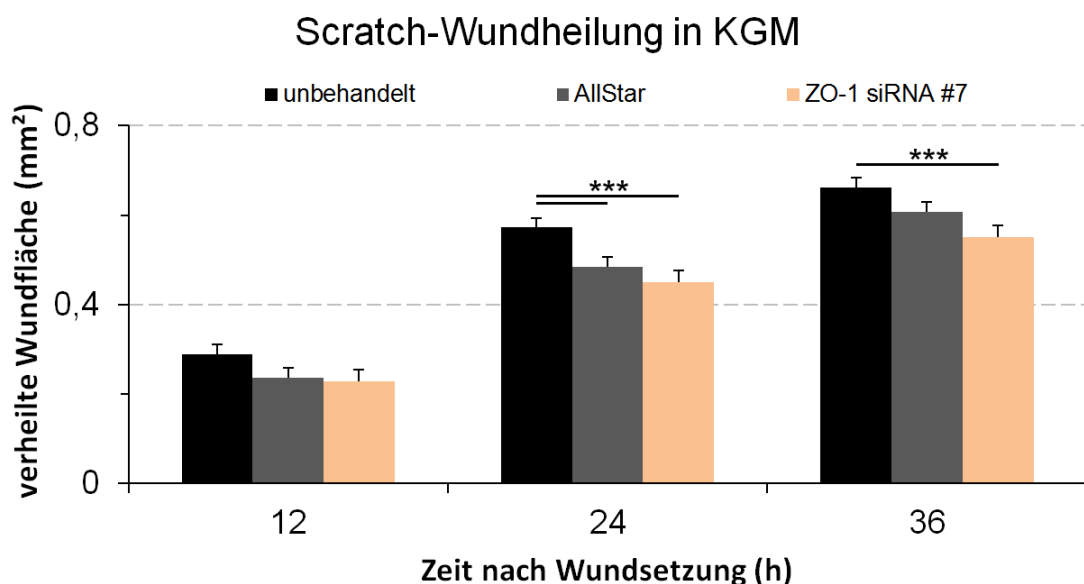


Abb. 3.46 Effekt des ZO-1-Knockdowns im Scratch-Assay in KGM

Durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) der ZO-1-Knockdown- und Kontrollzellen für die angegebenen Zeitpunkte von 12 bis 36 Stunden nach Wundsetzung bei Kultivierung der Keratinozyten in KGM. Signifikante Unterschiede sind entsprechend ihrem Signifikanzniveau mit * gekennzeichnet. $n = 16, 17, 9$ (v. l. n. r.); *** $p < 0,001$

Wurden die Zellen in DermaLife kultiviert, zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle tendenziell ein leicht negativer Effekt durch die Behandlung mit der ZO-1-siRNA, der aber auf dem gleichen Niveau lag wie die Beeinflussung durch die AS-siRNA-Kontrollbehandlung (siehe Abb. 3.47). Signifikante Unterschiede zu den Kontrollbehandlungen wurden zu keiner Zeit beobachtet.

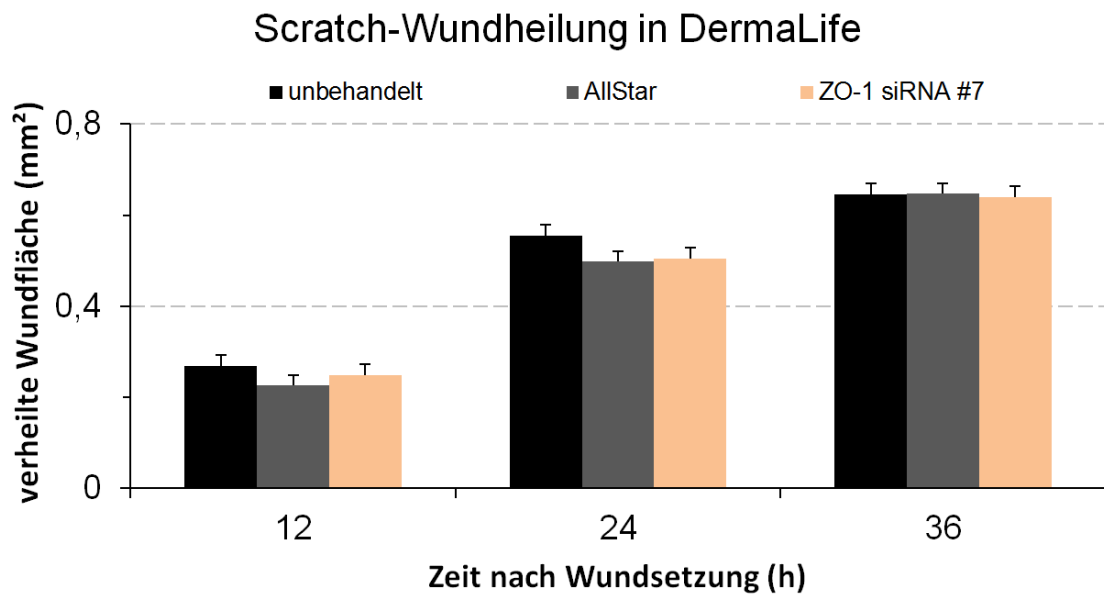


Abb. 3.47 Effekt des ZO-1-Knockdowns im Scratch-Assay in DermaLife

Durchschnittliche verheilte Wundfläche (mit Standardfehler) der ZO-1-Knockdown- und Kontrollzellen für die angegebenen Zeitpunkte von 12 bis 36 Stunden nach Wundsetzung bei Kultivierung der Keratinozyten in DermaLife. n = 13, 14, 12 (v. l. n. r.)

3.2.5.2. Effekt auf die Proliferation

Die Bestimmung des Anteils der proliferierenden Keratinozyten am Rand der Scratchwunde von ZO-1-Knockdownzellen erbrachte ebenfalls keine auffälligen Ergebnisse, da sowohl bei Kultivierung der Zellen in KGM (90 % ± 6 %) als auch in DermaLife (93 % ± 4 %) die ermittelten Werte nicht signifikant von denen der unbehandelten Kontrolle bzw. mit der AS-siRNA behandelten Keratinozyten abwichen (siehe Abb. 3.48).

Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten nach ZO-1-Knockdown

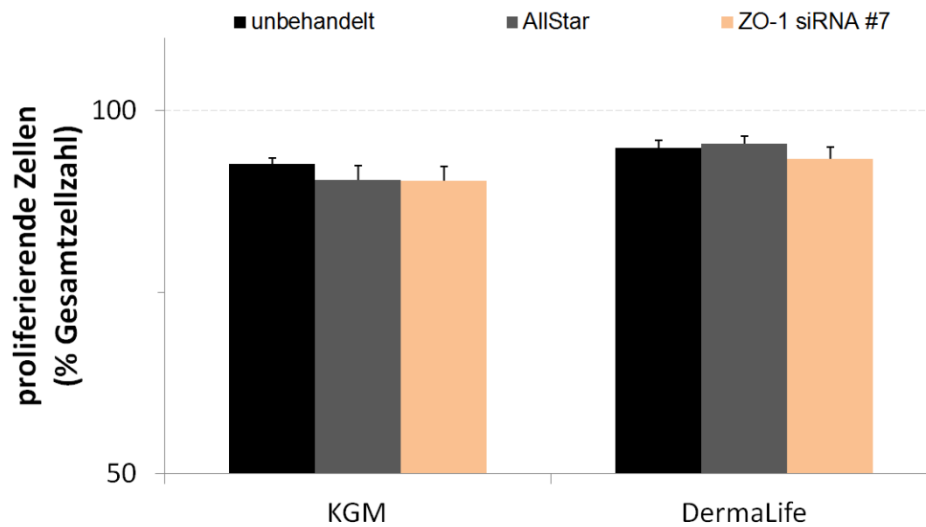


Abb. 3.48 Proliferation der Keratinozyten bei ZO-1-Knockdown

Dargestellt ist der Anteil Ki67-positiv gefärbter und damit proliferativ aktiver Keratinozyten am Wundrand der Scratchwunden 24 Stunden nach Verwundung in den verschiedenen Behandlungsansätzen bei Kultivierung der Zellen in KGM bzw. DermaLife. n = 8 für beide Kontrollen, 6 für die ZO-1-siRNA

3.2.5.3. Zusammenfassung der Effekte des ZO-1-Knockdowns

Bei der zusammenfassenden Betrachtung der Effekte des gezielten Knockdowns von ZO-1 (Tab. 3.5) in primären humanen Keratinozyten lässt sich feststellen, dass der Knockdown keinen Einfluss auf die untersuchten zellphysiologischen Parameter des Wundheilungsvermögens der Zellen hatte. Der einzige Unterschied zur siRNA-Kontrollbehandlung mit statistischer Signifikanz ist die Verringerung der Proteinmenge von Occludin bei Kultivierung der Keratinozyten in DermaLife, wobei allerdings kein eindeutiger Effekt auf die Menge der Occludin-mRNA gefunden wurde.

untersuchter Parameter	Effekt des ZO-1-Knockdowns
<i>in vitro</i> Wundheilung	keine eindeutige Veränderung
Proliferation	keine eindeutige Veränderung
Claudin-1	Herabregulation (nur in DermaLife)
Occludin	Herabregulation (nur in DermaLife)

Tab. 3.5 Zusammenfassung der Effekte des ZO-1-Knockdowns

Tabellarische Übersicht der Auswirkungen des Occludin-Knockdowns in primären humanen Keratinozyten. Rot hinterlegte Felder kennzeichnen eine signifikante Verringerung des entsprechenden Parameters im Vergleich zur siRNA-Kontrolle.

4. Diskussion

4.1. Lokalisation und Expression der TJ-Moleküle während der Wundheilung und die daraus resultierenden Effekte

4.1.1. Lokalisation der TJ-Moleküle in der Epidermis in humanen akuten Wunden sowie *in vivo* und *ex vivo* WHM

Für die TJ-Proteine Occludin und ZO-1 konnte nach Verwundung der WHM in dem untersuchten frühen Wundheilungsstadium sowohl am Wundrand als auch in der regenerierenden Epidermis eine Veränderung der Lokalisation beobachtet werden. Claudin-1 dagegen zeigte sich in dieser frühen Phase nicht verändert im Vergleich zur Situation in unverletzter Haut, nur in den vordersten Zellen der Wundzunge war Claudin-1, wie auch Occludin, in einigen Proben nicht nachzuweisen.

Bei Betrachtung der Verteilung der drei Proteine (siehe Kapitel 3.1.1.1 ff.) zeigte sich kein auffälliger Unterschied zwischen den Ergebnissen der Untersuchung der beiden Stanzbiopsien aus akuten, frühen Wunden humaner Probanden und den insgesamt sechs analysierten humanen *ex vivo* Wundheilungsmodellen im frühen Wundheilungsstadium. Somit scheint zu diesem frühen Zeitpunkt der Wundheilung die Lokalisierung der TJ-Proteine nicht maßgeblich von extra-epidermalen Faktoren abhängig zu sein, da bei Kultivierung der *ex vivo* Wundheilungsmodelle zwar noch ein kleiner Anteil Dermis vorhanden war, darüber hinaus aber keine physiologische Versorgung mit eventuellen Botenstoffen oder anderen physiologisch wichtigen Molekülen stattfand. Die Versorgung mit den verschiedensten Faktoren, die während des Wundheilungsprozesses *in vivo* über das Blutgefäßsystem bereitgestellt werden, kann im Labor durch das verwendete Kulturmedium wahrscheinlich nicht vollumfänglich bewerkstelligt werden, sodass bei längeren Inkubationszeiten möglicherweise mit Abweichungen zwischen *ex vivo* und *in vivo* geheilten Wunden zu rechnen ist. Für eine endgültige Beurteilung der Vergleichbarkeit von *in vivo* und *ex vivo* WHM bezüglich der Regulation der TJ-Proteine wären daher weitere Untersuchungen und damit einhergehend ein größerer Stichprobenumfang notwendig. Bei anderen Untersuchungen von humaner unverwundeter Haut bzw. der unbeteiligten Epidermis humaner WHM sowie zeigte sich für die drei Proteine eine vergleichbare Lokalisation wie in den Proben der vorliegenden Arbeit (Pummi et al., 2001; Brandner et al., 2002; Malminen et al., 2003). Auch für den Wundrand wurden größtenteils übereinstimmende Lokalisationsmuster für Claudin-1, Occludin und ZO-1 beschrieben (Brandner et al., 2002; Malminen et al., 2003), nur Occludin war in einer Arbeit etwas

breiter exprimiert (Malminen et al., 2003). Für die regenerierende Epidermis findet sich für Claudin-1 ebenfalls eine Bestätigung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten mit der Ausnahme, dass im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit kein Verlust des Proteins in den vordersten Zellen der Wundzunge berichtet wurde (Brandner et al., 2002). Occludin wurde entgegen den Beobachtungen in dieser Arbeit nur in der obersten Zellschicht der Neoepidermis berichtet (Brandner et al., 2002; Malminen et al., 2003), und die hier beobachtete Lokalisation von ZO-1 in der regenerierenden Epidermis wurde durch eine frühere Arbeit bestätigt (Brandner et al., 2002), während Malminen et al. (2003) abweichend davon ZO-1 nur in den oberen Zellschichten fand.

In den grundlegenden Zügen lassen sich die Erkenntnisse der verschiedenen Forschungsarbeiten gut miteinander vereinbaren. Die Abweichungen zur Arbeit von Malminen et al. (2003) könnten eventuell durch das unterschiedliche Wundheilungsstadium der untersuchten Modelle (4 bzw. 6 Tage nach Verwundung bei Malminen et al. im Gegensatz zu max. 2 Tage nach Verwundung in dieser Arbeit), die unterschiedlichen Verwundungsmechanismen (Saugblasentechnik bei Malminen et al. im Gegensatz zur Stanzbiopsie) und/oder mögliche Unterschiede zwischen der Heilung von *in vivo* (diese Arbeit) und *ex vivo* (Malminen et al.) Wundheilungsmodellen erklärt werden.

4.1.2. Vergleich der Lokalisation der TJ-Moleküle in der Epidermis zwischen akuten und chronischen Wunden

Wie in den Kapiteln 3.1.1.1 bis 3.1.1.3 beschrieben, zeigten sich in aller Regel deutliche Unterschiede in der Lokalisation der drei TJ-Proteine Claudin-1, Occludin und ZO-1 zwischen frühen akuten und chronischen humanen Wunden. Der Vergleich der chronischen mit den frühen akuten Wunden erfolgte trotz des an sich höheren Alters der chronischen Wunden aufgrund der Tatsache, dass die chronischen Wunden nur geringe Wundheilungsfortschritte zeigten und daher eher den akuten Wunden in einer frühen Wundheilungsphase entsprechen. In dieser frühen Phase sollte primär die Proliferation und Migration von Bedeutung sein im Gegensatz zur späten Wundheilungsphase, in der die Differenzierung der Zellen und die Wiederherstellung der physiologischen Hautbarriere im Vordergrund stehen. Aufgrund der im vorigem Abschnitt beschriebenen Vergleichbarkeit der frühen akuten *in vivo* und *ex vivo* Wundheilungsmodelle werden diese hier beim Vergleich zusammengefasst betrachtet. Bei den chronischen Wunden handelt es sich um chronische Bein-Ulzera weiblicher und männlicher Patienten mit Gefäß-bedingtem bzw. diabetischem Ursprung. Für die Klärung der möglichen Effekte, die eine veränderte Lokalisation der TJ-Proteine in

chronischen Wunden nach sich ziehen, werden die Erkenntnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente mit primären humanen Keratinozyten herangezogen. Diese wurden, sofern nicht explizit erwähnt, in Medien mit niedriger Calcium-Konzentration kultiviert und somit in einem möglichst undifferenzierten Status verwendet, um die basalen Zellen der Epidermis, die *in vivo* für die Proliferation (Jones et al., 1995) und Migration (Safferling et al. 2013) verantwortlich sind, zu repräsentieren. Auch ohne Induktion der Differenzierung durch Zugabe von Calcium werden in Keratinozyten bereits TJ-Proteine exprimiert und können daher untersucht werden (Kirschner et al., 2013; diese Arbeit).

4.1.2.1. Unterschiede in der Verteilung von Claudin-1 und mögliche Effekte

Für Claudin-1 zeigte sich bereits in der Epidermis hinter dem Wundrand der chronischen Wunden mit der Beschränkung des Proteins auf die Zellschichten des oberen *Stratum spinosum* und des *Stratum granulosum* eine Veränderung der Verteilung, die in den akuten frühen Wunden nicht beobachtet wurde. Am Wundrand chronischer Wunden setzte sich dieses veränderte Lokalisationmuster von Claudin-1 weiter fort, und in einigen Fällen war Claudin-1 sogar komplett abwesend, was wie auch die Beschränkung auf suprabasale Schichten in akuten Wunden nie beobachtet wurde. Damit erweitert diese Arbeit frühere Erkenntnisse aus vergleichenden Untersuchungen von gesunder Haut und dem Rand nicht-heilender Ulzera, bei denen eine signifikante Herabregulation von Claudin-5 und Claudin-8 auf mRNA-Ebene festgestellt wurde (Stojadinovic et al., 2008), sich für Claudin-1 aber keine signifikante Veränderung nachweisen ließ. Unter Berücksichtigung der Umstände, dass die basale Zellschicht der Epidermis die proliferativ aktiven Zellen beinhaltet und im Falle einer Verwundung der Haut in einem gewissen Umkreis um die Wunde herum unter physiologischen Bedingungen eine erhöhte Proliferationsaktivität berichtet wurde (Safferling et al., 2013), scheint sich die für chronische Wunden beobachtete Abwesenheit von Claudin-1 in gerade dieser Schicht sowohl am Wundrand, als auch in den noch dahinter liegenden Bereichen als ein erwähnenswerter Faktor darzustellen, der zur verminderten Wundheilung von chronischen Wunden beitragen könnte. Denn wie in den Zellkulturversuchen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, führt die gezielte Herabregulation von Claudin-1 in Keratinozyten zu einer signifikanten Verminderung der Proliferation (siehe Kapitel 3.2.3.3), sodass sich spekulieren lässt, dass der in den chronischen Wunden beobachtete Verlust von Claudin-1 gerade in den für die Proliferation verantwortlichen Zellen einen wichtigen Baustein der gestörten Wundheilung bildet. Bezüglich eines Zusammenhangs zwischen Claudin-1 und der

Proliferationsaktivität von Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass der Knockdown von Claudin-1 in Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur (Fujita et al., 2011), der endometrialen Karzinomzelllinie KLE (Fortier et al., 2013) und in 3D-Softagar kultivierten Magenkrebszellen eine Reduktion der Proliferationsrate bewirkte (Huang et al., 2015). Darüber hinaus wurde für Keratinozyten berichtet, dass der Knockdown von Claudin-1 zu einer erhöhten Proliferationsrate führt (De Benedetto et al., 2011). Zu beachten ist bei dieser Studie allerdings, dass Claudin-1 nur auf rund 50 % der Ausgangsproteinmenge herunterreguliert wurde, und zudem die Keratinozyten nicht wie in der vorliegenden Arbeit am Wundrand, sondern unter normalen, stressfreien Bedingungen untersucht wurden. Desweiteren wurden die entsprechenden Versuche mit differenzierten Keratinozyten durchgeführt, was ebenfalls ein Unterschied zu den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen darstellt. Ein direkter Vergleich ist somit, trotz der Untersuchung von humanen Keratinozyten, nicht möglich. Darüber hinaus wurde auch in Atopische-Dermatitis-ähnlichen Mausekzemen eine Korrelation von verringerter Claudin-1-Expression mit verstärkter Proliferation beobachtet (Gruber et al., 2015). Insgesamt zeigt sich also definitiv ein Zusammenhang zwischen Claudin-1 und der proliferativen Aktivität von verschiedenen Zellarten, wodurch auch die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit grundsätzlich bestätigt werden. Die Betrachtung der verschiedenen Studienergebnisse führt darüber hinaus vor Augen, dass das Microenvironment, in dem die Veränderung der Expression von Claudin-1 stattfindet, offenbar bestimmt, in welche Richtung die Proliferation letztlich beeinflusst wird.

In einem Großteil der chronischen Wunden wurde auch in der regenerierenden Epidermis ein weitreichender Verlust von Claudin-1 beobachtet, was sich in den frühen akuten humanen Wunden nicht beobachten ließ. Der somit als pathologisch zu betrachtende häufige Verlust von Claudin-1 in der regenerierenden Epidermis chronischer Wunden könnte neben einer verminderten Proliferation vor allem auch über die Beeinträchtigung der Migration an der gestörten Wundheilung chronischer Wunden beteiligt sein. Einen Hinweis darauf liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, bei denen der Knockdown von Claudin-1 im Scratch-Assay nach Vorbehandlung der Keratinozyten mit Mitomycin C, das die Proliferation von Zellen hemmt und somit erlaubt, ausschließlich den Einfluss des Knockdowns auf die Migrationsfähigkeit zu untersuchen, zu verminderter Wundheilung führte (siehe Kapitel 3.2.3.2). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression von Claudin-1 und der Migrationsfähigkeit von Zellen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen untersucht, wobei sich in der Lungenkarzinomzelllinie A549 (Shiozaki et al., 2012), der Leberzellkarzinomzelllinie HepG2 und der endometrialen Karzinomzelllinie KLE (Fortier et al., 2013) wie in der vorliegenden Arbeit ein negativer Einfluss einer verringerten

Claudin-1-Proteinmenge zeigte, der sich neben der direkten Beeinflussung der Migration auch auf die Regulation der Expression von MMP-2 und MMP-9 zu erstrecken scheint (Fortier et al., 2013), wobei die Expression von MMP-9 durch die Verwundung von Keratinozyten induziert wird (Turchi et al., 2003) und MMP-9, genau wie MMP-2, mit einem bislang ungeklärten Mechanismus die Reepithelialisierung fördert (Rohani & Parks, 2015).

Somit lässt sich zusammenfassen, dass der in chronischen Wunden beobachtete Verlust von Claudin-1 in den basalen Schichten hinter dem Wundrand, und vor allem am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis ein wichtiger Faktor der gestörten Wundheilung sein kann, da Claudin-1 nachgewiesenermaßen in zwei für die Wundheilung wichtige Prozesse, nämlich die Proliferation und die Migration der Keratinozyten, eingebunden ist und ein Fehlen von Claudin-1 diese Vorgänge behindert. Anzumerken ist dabei, dass die Herabregulation von Claudin-1 die Wundheilung sowohl in Zellen verminderte, die in Medium mit einem geringen Calcium-Gehalt kultiviert wurden und somit undifferenziert waren, als auch bei Kultivierung der Zellen in einem Medium mit hohem Calcium-Gehalt, das die Differenzierung der Zellen und damit auch die Ausbildung von TJ-Strukturen bewirkte, wobei der Effekt des Knockdowns unter diesen Bedingungen noch stärker war. Die Funktionen von Claudin-1, die eine Beeinflussung der Proliferation und Migration bewirken, müssen somit zumindest zum Teil unabhängig von funktionellen TJs sein, da sie bereits bei Kultivierung mit geringer Calcium-Konzentration wirken. Da der Effekt in differenzierten Keratinozyten aber noch deutlicher ist, scheint auch der Verlust von Claudin-1 in funktionellen TJ-Strukturen negative Auswirkungen auf das Wundheilungsvermögen zu haben, die offenbar die TJ-unabhängigen Effekte additiv ergänzen.

Um mögliche Signalwege für die Regulation der Migration und Proliferation zu bestimmen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die drei Kinasen AKT (bzw. Proteinkinase B), ERK 1/2 und p38-MAPK untersucht (siehe Kapitel 3.2.3.5). Dabei zeigte sich in Claudin-1-Knockdownzellen nach Verwundung des Monolayers ein signifikantes Absinken der Gesamtproteinmenge von AKT im Vergleich zum Ausgangswert, während in den Kontrollen tendenziell eher ein leichter Anstieg im Verlauf der Wundheilung zu verzeichnen war. Ein ähnlicher Gegensatz zeigte sich auch für die phosphorylierte Fraktion der AKT-Kinase, wo der Claudin-1-Knockdown die Hochregulation zehn Minuten nach Verwundung des Monolayers inhibierte und nach sechs Stunden eine signifikante Herabregulation bewirkte. Die Herabregulation von Claudin-1 hat also direkte Auswirkungen auf die Gesamtmenge der AKT-Kinase sowie auf die Menge der phosphorylierten und damit aktiven Fraktion und könnte somit wiederum Einfluss auf verschiedene, von der AKT-Kinase vermittelte Signalwege

haben. Wie Scratch-Assays mit einer Vorbehandlung der Keratinozyten zur Inhibition der AKT-Kinase-Aktivität mittels MK-2206 zeigten, bewirkt die Herabregulation der Menge an phosphoryliertem, aktiven AKT eine dosis-abhängige und signifikante Beeinträchtigung der Wundheilung (siehe Kapitel 3.2.3.6), was somit einen Mechanismus für die Wirkung des Claudin-1-Knockdowns aufzeigt. Ob der Effekt der Inhibition der AKT-Kinase in den Versuchen dieser Arbeit auf einer Beeinträchtigung der Proliferation oder Migrationsfähigkeit der Keratinozyten beruht, wurde im Rahmen der Arbeit nicht untersucht, zu beiden Möglichkeiten gibt es allerdings Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen.

Eine direkte Assoziation zwischen der Aktivität von AKT und der Migration fand sich in zwei verschiedenen Studien mit primären humanen Keratinozyten (Haase et al., 2003; Pankow et al., 2006) und bei HaCaT-Zellen (Liu et al., 2009). Auch für die Regulation der Proliferation fanden sich Hinweise auf eine direkte positive Korrelation mit der Aktivität der AKT-Kinase in HaCaT-Zellen (Pankow et al., 2006; Lee et al., 2012; Zhao et al., 2016). Eine einzige Studie zeigte sowohl für die Migration, als auch für die Proliferation genau gegenteilige Ergebnisse, nämlich eine beschleunigte *in vitro*-Wundheilung nach Block der Phosphorylierung der AKT-Kinase in primären humanen Keratinozyten (Fitsialos et al., 2007). Somit scheint p-AKT sowohl über die Regulation der Proliferation als auch der Migration in die Wundheilung involviert zu sein, wobei offenbar gewisse Faktoren eine Umkehr der häufiger beobachteten positiven Korrelation zwischen AKT-Kinase-Aktivität und Migration bzw. Proliferation bewirken können.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Herabregulation von Claudin-1 in den Versuchen dieser Arbeit sowohl mit einer eingeschränkten Wundheilung, als auch einer verringerten Menge an p-AKT assoziiert ist, und die Inhibition der AKT-Kinase ebenfalls eine Beeinträchtigung der Wundheilung zur Folge hatte, scheint p-AKT unter den vorliegenden Bedingungen, wie auch in der Vielzahl der erwähnten Publikationen, eine positive Rolle für die Wundheilung zu spielen. Die die durch den Claudin-1-Knockdown verursachte Herabregulation der Menge an p-AKT ist somit sehr wahrscheinlich zum Teil für die eingeschränkte Wundheilungsfähigkeit der Knockdownzellen verantwortlich, wobei in Anbetracht der weniger stark ausgeprägten Herabregulation von p-AKT in Claudin-1-Knockdownzellen im Vergleich zum Effekt des Inhibitors MK-2206 die verminderte Wundheilungsfähigkeit der Knockdownzellen vermutlich nicht alleine mit der Beeinflussung der AKT-Kinase zu begründen ist. Mit Rücksicht auf das dieser Arbeit zugrunde liegende Thema der gestörten Wundheilung ist zudem noch eine weitere Publikation erwähnenswert, die nicht nur einen Anstieg von p-AKT in den Keratinozyten am Wundrand akuter Verletzungen von gesunden

Mäusen zeigen konnte, was erneut für eine positive Rolle von p-AKT in der Wundheilung spricht, sondern zusätzlich in den chronischen Wunden diabetischer Mäuse eine nahezu komplettes Fehlen von p-AKT berichtete (Goren et al., 2009), was die Ergebnisse dieser Arbeit und die daraus abgeleiteten Erkenntnisse bekräftigt.

Der Frage nach dem möglichen Mechanismus einer Beteiligung von p-AKT an dem Migrationsprozess wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen nachgegangen, wobei sich die Lokalisation von p-AKT an der *leading edge* der Zellmembran als gemeinsames Merkmal in verschiedenen Zelltypen zeigte (Kim et al., 2001; Enomoto et al., 2005; Fortier et al., 2013), wodurch die AKT-Kinase an der notwendigen Reorganisation des Cytoskeletts (Kim et al., 2001) und der Ausbildung von Lamellipodien (Enomoto et al., 2005) mitwirken kann. Eine direkte Interaktion zwischen Claudin-1 und AKT wurde bislang nicht nachgewiesen, es gibt aber Hinweise auf eine indirekte Beeinflussung von PI3K durch Claudin-1, wodurch eine Regulation der AKT-Kinase-Aktivität und Rekrutierung an die Zellmembran möglich wird (Fortier et al., 2013).

Auch die Kinasen ERK 1/2 zeigten sich beim Knockdown von Claudin-1 verändert, wobei es sowohl im Vergleich zu den Kontrollen, als auch im Verlauf der Scratch-Wundheilung von Claudin-1-Knockdownzellen zu einer signifikanten Verringerung der Gesamtmenge der beiden Kinasen kam. Für die phosphorylierte Fraktion der Kinasen zeigte sich keine eindeutige Veränderung im beobachteten Zeitraum. Weiterführende Studien zu diesem Aspekt sollten daher die Regulation der ERK-1/2-Kinase über einen längeren Zeitraum beobachten, um die Möglichkeit einer signifikanten Beeinflussung der phosphorylierten und damit aktiven Fraktion der Kinase durch den Knockdown im späteren Verlauf der *in vitro* Wundheilung zu untersuchen.

Für die letzte der drei untersuchten Kinasen, die p38-MAP-Kinase, zeigte sich insgesamt nur eine leicht verringerte Proteinmenge in Claudin-1-Knockdownzellen am Endpunkt der Beobachtung sowohl im Vergleich zum eigenen Ausgangswert, als auch zum 6-Stunden-Wert der siRNA-Kontrolle. Von vermutlich größerer Bedeutung dürfte die beobachtete Veränderung im phosphoryliertem Anteil der Kinase sein, der bei Herabregulation von Claudin-1 sechs Stunden nach Verwundung tendenziell auf dem Niveau des 10-Minuten-Höchstwertes verblieb, wohingegen in den Kontrollen zu diesem Zeitpunkt bereits ein deutlicher Abfall der Menge an p-p38 zu verzeichnen war. Auffällig ist allerdings, dass sowohl die beiden Kontroll-siRNA-Behandlungen, als auch die Inkubation mit der Claudin-1 siRNA #8 zu einem signifikanten Anstieg der Menge an p-p38 zehn Minuten nach der Verwundung führte, wohingegen in den unbehandelten Kontrollen keine signifikante Veränderung zu beobachten war. Somit muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die starke Hochregulation der

Menge phosphorylierter p38-MAP-Kinase in allen mit siRNA behandelten Zellen auf einer Stressreaktion beruht, die durch die Transfektion in Verbindung mit der Verwundung hervorgerufen wurde. Wie Studien an verschiedenen Zellen zeigten, ist allerdings eine derartige stressbedingte Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges mit einer gleichzeitigen Unterdrückung der ERK-Aktivität verbunden (Xia et al., 1995; Liu & Hofmann, 2004; Junttila et al., 2007), was in den Versuchen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht beobachtet wurde. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass der beobachtete Effekt des Claudin-1-Knockdowns auf die p38-MAP-Kinase unspezifisch durch eine Stressreaktion der Zellen auf die Transfektion und Verwundung hervorgerufen wurde, sollte in zukünftigen Studien besonderer Wert auf diesen Aspekt gelegt werden und über die Verwendung anderer Transfektionsreagenzien oder komplett anderer Methoden zur Regulation der Proteinexpression, beispielsweise ein shRNA-vermittelter Knockdown (Moore et al., 2010) oder ein Knockout mithilfe des CRISPR-Cas9-Systems (Liang et al., 2015), ein Weg zur Vermeidung der Stressreaktion gesucht werden.

Neben der Proliferation und Migration ist auch die Differenzierung der Keratinozyten ein wichtiger Aspekt im Rahmen der Wundheilung. Eine direkte Bedeutung von Claudin-1 für die korrekte Differenzierung der Keratinozyten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden (siehe auch Gruber et al., 2015). Diese Ergebnisse bestätigen vorangehende Untersuchungen an Maus und Mensch (Kirschner et al., 2011; Kirschner et al., 2013; Sugawara et al., 2013). Eine Störung der Differenzierung wirkt sich generell negativ auf die Wundheilung aus (Cheng et al., 2013; Wikramanayake et al., 2014). Der Verlust von Claudin-1 im Wundrand und der regenerierenden Epidermis von chronischen Wunden könnte somit über die Störung der drei Prozesse Migration, Proliferation und Differenzierung an der Beeinträchtigung der Wundheilung beteiligt sein.

Darüber hinaus trägt zum einen eine geordnete Differenzierung zur korrekten Bildung der Stratum corneum-Barriere bei (Proksch et al., 2006; Houben et al., 2007; Proksch et al., 2008), zum anderen konnte der direkte Einfluss von Claudin-1 auf die TJ-Barriere gezeigt werden (Furuse et al., 2002; Tunggal et al., 2005; Kirschner et al., 2013; Sugawara et al., 2013). Beide Barrieren sind Teil der Hautbarriere, die wichtig ist für die Abwehr von Pathogenen (Bäsler et al., 2016).

4.1.2.2. Unterschiede in der Verteilung von Occludin und mögliche Effekte

Wie schon für Claudin-1 zeigte sich auch für Occludin in den Proben der chronischen Wunden bereits im Bereich hinter dem Wundrand eine Veränderung in der

Lokalisation. Statt wie bei akuten frühen humanen Wunden auf das *Stratum granulosum* beschränkt zu sein, zeigte sich hier Occludin in der Mehrheit der Fälle verbreitert bis in das obere *Stratum spinosum*, in einigen Fällen aber auch komplett abwesend. Am Wundrand war dann bereits in den meisten chronischen Wunden das vollständige Fehlen von Occludin zu verzeichnen, wohingegen frühe akute humane Wunden Occludin im *Stratum granulosum* und nur vereinzelt auch noch im oberen *Stratum spinosum* aufwiesen. Die regenerierende Epidermis schließlich zeigte sich in den chronischen Wunden stets frei von Occludin, während die Proben der frühen humanen *ex vivo* WHM Occludin in den meisten Fällen zumindest in der obersten Zellschicht zeigten, zum Teil aber auch in allen epidermalen Schichten, was die Untersuchung der frühen humanen *in vivo* Wunden bestätigte. Nur in einem Fall war die Neoepidermis einer humanen akuten Wunde frei von Occludin. Zusammenfassend betrachtet zeichneten sich die untersuchten chronische Wunden damit eindeutig durch einen Verlust von Occludin aus, der stets die regenerierende Epidermis und oftmals auch den Wundrand betraf und sich damit noch deutlicher darstellte als bei Claudin-1. Eine Bestätigung für diese Beobachtungen wurde bereits auf Ebene der mRNA geliefert, wo sich am Rand nicht-heilender Ulzera eine signifikante Herabregulation von Occludin im Vergleich zu gesunder Haut zeigte (Stojadinovic et al., 2008). Wie die *in vitro*-Versuche dieser Arbeit zu den Auswirkungen einer Herabregulation von Occludin zeigten, kann die Abwesenheit von Occludin in chronischen Wunden mit der gestörten Reepithelialisierung assoziiert werden, da die Occludin-Knockdownzellen im Scratch-Assay mit mechanischer Belastung eine beeinträchtigte Wundheilung zeigten. Zu erwähnen ist hier, dass dieser Effekt nur beobachtet wurde, wenn die Keratinozyten mit wenig Calcium kultiviert wurden und somit keine funktionellen TJs bilden konnten. Wurden die Zellen dagegen unter Hoch-Calcium-Bedingungen während des *in-vitro*-Wundheilungsversuchs mechanischem Stress ausgesetzt, zeigte sich keine Beeinträchtigung durch den Knockdown von Occludin. Damit scheint der beobachtete Effekt auf eine Funktion für Occludin hinzudeuten, die nur bei Abwesenheit von funktionellen TJs (Yuki et al., 2007) sowie anderen Zell-Zell-Adhäsionsverbindungen (O'Keefe et al., 1987) unter diesen Niedrig-Calcium-Bedingungen von Occludin erfüllt werden kann bzw. einen messbaren Einfluss hat. Verursacht werden könnte diese Störung des Wundheilungsprozesses möglicherweise durch eine infolge der Herabregulation von Occludin verursachte Verschlechterung der Zell-Zell-Adhäsion, da der Einfluss von Occludin auf die Zell-Zell-Adhäsion sowohl anhand eines Knockdowns von Occludin in humanen Keratinozyten (Rachow et al., 2013) sowie einer induzierten Expression von Occludin in Nierenepithelzellen und Fibroblasten von Ratten (Van Itallie & Anderson, 1997) mit daraus resultierender Verschlechterung bzw.

Verbesserung der interzellulären Adhäsion bereits nachgewiesen wurde. Durch die verminderte interzelluläre Adhäsion könnte der Zellmonolayer an Stabilität verlieren und somit die Keratinozyten während der Krafteinwirkung aufgrund des unzureichenden Zusammenhalts aus dem Zellverband gelöst werden und verloren gehen. Übertragen auf *in vivo* Wunden kann eine derartige mechanische Belastung durch die Bewegung des Körpers verursacht werden, da durch die Bewegung innerhalb des Gewebes Spannungen entstehen und somit verschiedene mechanische Kräfte in der Wunde wirken können. Eine direkte mechanische Belastung durch Kontakt mit anderen Objekten sollte, sofern die chronische Wunde ärztlich versorgt und daher mit einem Verband bedeckt ist, unter normalen Umständen keine Rolle spielen, könnte aber bei mangelhafter medizinischer Versorgung zum Tragen kommen, wenn die unbedeckte Wunde zum Beispiel dem Kontakt mit Kleidungsstücken ausgesetzt wird. Da mit Berücksichtigung dieser Faktoren eine durchaus regelmäßige mechanische Belastung (chronischer) Wunden vorstellbar ist, wäre auch eine negative Auswirkung des Verlusts von Occludin in den chronischen Wunden analog zu den Zellkulturergebnissen durchaus nachvollziehbar. Auch beim Aufbau einer regenerierenden Epidermis konnte für Occludin in *in vitro*-Experimenten eine wichtige Rolle für die interzelluläre Adhäsion nachgewiesen werden, wonach die Keratinozyten bei Blockierung von Occludin in großer Zahl nicht fest in die suprabasalen Schichten integriert werden konnten (Safferling et al., 2013). Schon früh wurde ein übermäßiger Verlust von Zellen als wichtige Ursache für die verschlechterte Heilung chronischer Wunden vermutet (Adair, 1977), was sich anhand der in dieser Arbeit gezeigten und in weiteren Publikationen berichteten Konsequenzen einer Herabregulation bzw. Blockierung von Occludin in Keratinozyten in einen direkten Zusammenhang mit dem beobachteten Verlust dieses TJ-Proteins in chronischen Wunden bringen lässt. Da die regenerierende Epidermis und besonders die leading edge aus undifferenzierten Keratinozyten aufgebaut sind, könnte eine verminderte Zell-Zell-Adhäsion zwischen diesen Zellen durch den Verlust von Occludin den Reepithelialisierungsvorgang stark beeinträchtigen.

Wie schon für Claudin-1 diskutiert ist auch Occludin an der Regulation der Differenzierung von Keratinozyten beteiligt (Rachow et al., 2013), sodass die fehlende Expression in chronischen Wunden auch dadurch zu einer gestörten Wundheilung beitragen könnte. Darüber hinaus ist Occludin ebenfalls an der Barrierefunktion von TJs beteiligt (Kirschner et al., 2013).

Ein Einfluss auf die Proliferation der Keratinozyten konnte für den Knockdown von Occludin in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, was vorhergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigt (Rachow et al., 2013).

Zusammengefasst kann der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Verlust von Occludin im Wundrand und der regenerierenden Epidermis chronischer Wunden also über mehrere Prozesse an der gestörten Wundheilung beteiligt sein. Zum einen über eine gestörte Zell-Zell-Adhäsion, die unter mechanischer Belastung einen Zellverlust bewirken kann und so die Wundheilung beeinträchtigt. Zum anderen ist auch eine Störung des Differenzierungsprozesses und der TJ-Barriererebildung der Keratinozyten wahrscheinlich, was zu einer eingeschränkten Hautbarriere führen könnte, die eine Besiedlung des Wundgebietes durch pathogene Bakterien erleichtert. Für die in chronischen Wunden mehrheitlich verbreiterte Lokalisation von Occludin in der Epidermis hinter dem Wundrand lässt sich anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit noch keine Aussage treffen.

4.1.2.3. Unterschiede in der Verteilung von ZO-1 und mögliche Effekte

Das TJ-Protein ZO-1 fand sich in chronischen Wunden bereits hinter dem Wundrand in den meisten Fällen mit einer im Vergleich zu den akuten humanen Wunden verbreiterten Lokalisation. Während in den Proben der frühen humanen akuten Wunden ZO-1 stets beschränkt auf das *Stratum granulosum* war, wiesen chronische Wunden häufig eine starke Verbreiterung über alle suprabasalen Schichten auf, die somit als pathologisch angesehen werden muss. Auch am Wundrand konnte häufig eine verbreiterte Verteilung von ZO-1 beobachtet werden, die sich so nicht in den humanen akuten Wunden fand. Auf Ebene der mRNA wurde für das verwandte Protein ZO-3 eine signifikante Herabregulation im Randgebiet nicht-heilender Ulzera im Vergleich zu gesunder Haut nachgewiesen (Stojadinovic et al., 2008), während für ZO-1 in dieser Studie keine auffällige Veränderung beobachtet wurde.

In der regenerierenden Epidermis zeigte sich in chronischen Wunden schließlich ein zweigeteiltes Bild. In der Hälfte aller Proben war ZO-1 nicht mehr nachzuweisen, die übrigen Proben hingegen zeigten das Protein verbreitert, am häufigsten vom *Stratum granulosum* bis in das untere *Stratum spinosum*. Auch in akuten humanen Wunden war die Lokalisation heterogen. Hier fand sich ZO-1 am häufigsten in der gesamten Neoepidermis, war in manchen Proben aber auch beschränkt auf die suprabasalen Bereiche oder komplett abwesend.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zu den Auswirkungen einer Herabregulation von ZO-1 in Keratinozyten zeigten keinen negativen Einfluss auf die Migration oder Proliferation der Zellen. Dass sich unter den gewählten Versuchsbedingungen mit möglichst undifferenzierten Zellen kein Effekt durch den Knockdown von ZO-1 auf die Wundheilungsfähigkeit der Zellen nachweisen ließ legt

für die untersuchten zellphysiologischen Parameter dar, dass ZO-1 hier keine TJ-unabhängigen Funktionen wahrnimmt. Dies bestätigt indirekt die Rolle von ZO-1 als TJ-Plaques-Protein mit Bedeutung für den Aufbau der TJs (siehe Kapitel 1.3.1.3), die in undifferenzierten Zellen noch gar nicht vorhanden sind (Yuki et al., 2007). Als Erklärung für ein Ausbleiben messbarer Effekte in den Experimenten der vorliegenden Arbeit ist ebenso denkbar, dass der Knockdown von ZO-1 durch ein anderes Protein der Zonula Occludens-Proteinfamilie kompensiert wurde und sich deshalb keine Veränderungen in den untersuchten Parametern zeigten. Zusammen mit einer Untersuchung dieser Hypothese müsste gleichzeitig die Lokalisation von ZO-2 und ZO-3 in akuten und chronischen Wunden aufgeklärt werden, um die Möglichkeit und damit Relevanz einer solchen Kompensation *in vivo* zu überprüfen.

In parallelen Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte allerdings nachgewiesen werden, dass ein Knockdown von ZO-1 in Keratinozyten zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von IL-1 β führt (Bäsler & Brandner, 2016). Da massiv erhöhte Konzentrationen dieses Cytokins als charakteristisch für chronische Wunden beschrieben wurden (Tarnuzzer & Schultz, 1996; Trengove et al., 2000; Pukstad et al., 2010; Wiegand et al., 2010), könnte sich darüber eine relevante Funktion des Verlustes von ZO-1 in einem Teil der chronischen Wunden erklären. Zudem führte die Injektion von IL-1 β in epidermale Hautmodelle zu einer partiell verringerten Immunfärbung von Claudin-1 und die Inkubation von kultivierten Keratinozyten zu einer langfristigen Verminderung des Claudin-1 Proteinlevels (Kirschner et al., 2009). Somit könnte eventuell ein Verlust von ZO-1 in chronischen Wunden über die verstärkte Ausschüttung von IL-1 β den für chronische Wunden ebenfalls charakteristischen Verlust von Claudin-1 induzieren oder unterstützen. Allerdings wurde in mehr Wunden ein Verlust von Claudin-1 als von ZO-1 beobachtet, sodass die Herabregulation von Claudin-1 in chronischen Wunden zusätzlich durch andere Faktoren bedingt sein muss. Zusätzlich konnte für Mauskeratinozyten nachgewiesen werden, dass über Inkubation mit IL-1 β die Synthese des Cytokins TNF- α induziert wurde (Lisby & Hauser, 2002). Da auch TNF- α in chronischen Wunden in deutlich höheren Mengen als in akuten Wunden gemessen wurde (Tarnuzzer & Schultz, 1996; Trengove et al., 2000), könnte der Verlust von ZO-1 auf diese Weise in bedeutender Form zum pro-inflammatorischen Milieu chronischer Wunden beitragen. Weiterhin zeigten Experimente an Keratinozyten aus Plattenepithelkarzinomen einen direkten negativen Effekt des Knockdowns von ZO-1 auf die Migrationsfähigkeit der Zellen während der *in vitro*-Wundheilung (Masterarbeit Anna Rudi, 2013). Da sich Plattenepithelkarzinome zum Teil aus chronischen Wunden entwickeln können, ähneln ihre Zellen möglicherweise mehr den Keratinozyten in chronischen Wunden als die in dieser Arbeit

verwendeten gesunden primären Keratinozyten, was mithilfe einer Genexpressionsanalyse untersucht werden könnte. Somit könnte sich über die Ergebnisse der Untersuchung der Plattenepithelkarzinomzellen eventuell noch eine weitere Rolle für das fehlende ZO-1 in chronischen Wunden herleiten lassen, sodass neben dem Verlust von Claudin-1 auch der Verlust von ZO-1 für die gestörte Migration mitverantwortlich wäre. Wie bereits erwähnt betrifft der Verlust von ZO-1 allerdings nur einen Teil der chronischen Wunden, sodass die besprochenen Effekte einer Herabregulation von ZO-1 auch nur in einem Teil der chronischen Wunden zum Tragen kommen würden. Für die in chronischen Wunden mehrheitlich deutlich verbreiterte Lokalisation von ZO-1 in der Epidermis hinter dem Wundrand lässt sich anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit noch keine Aussage treffen. Da diese verbreiterte Expression allerdings nahezu alle untersuchten chronischen Wunden betrifft, erscheinen zukünftige Untersuchungen zu den Auswirkungen dieser veränderten Lokalisation lohnenswert.

4.1.2.4. Zusammenfassung der Effekte

Bei Betrachtung aller diskutierten Effekte des Verlustes von Claudin-1, Occludin sowie ZO-1 (siehe Abb. 4.1 **b**) zeigt sich, dass der Verlust jedes der drei TJ-Proteine in andere Prozesse der physiologischen Wundheilung eingreift (vergleiche Abb. 4.1 **a**) und damit die korrekte Expression und Lokalisation aller drei Proteine für ein Überwinden der Wundheilungsstörung chronischer Wunden von Bedeutung ist.

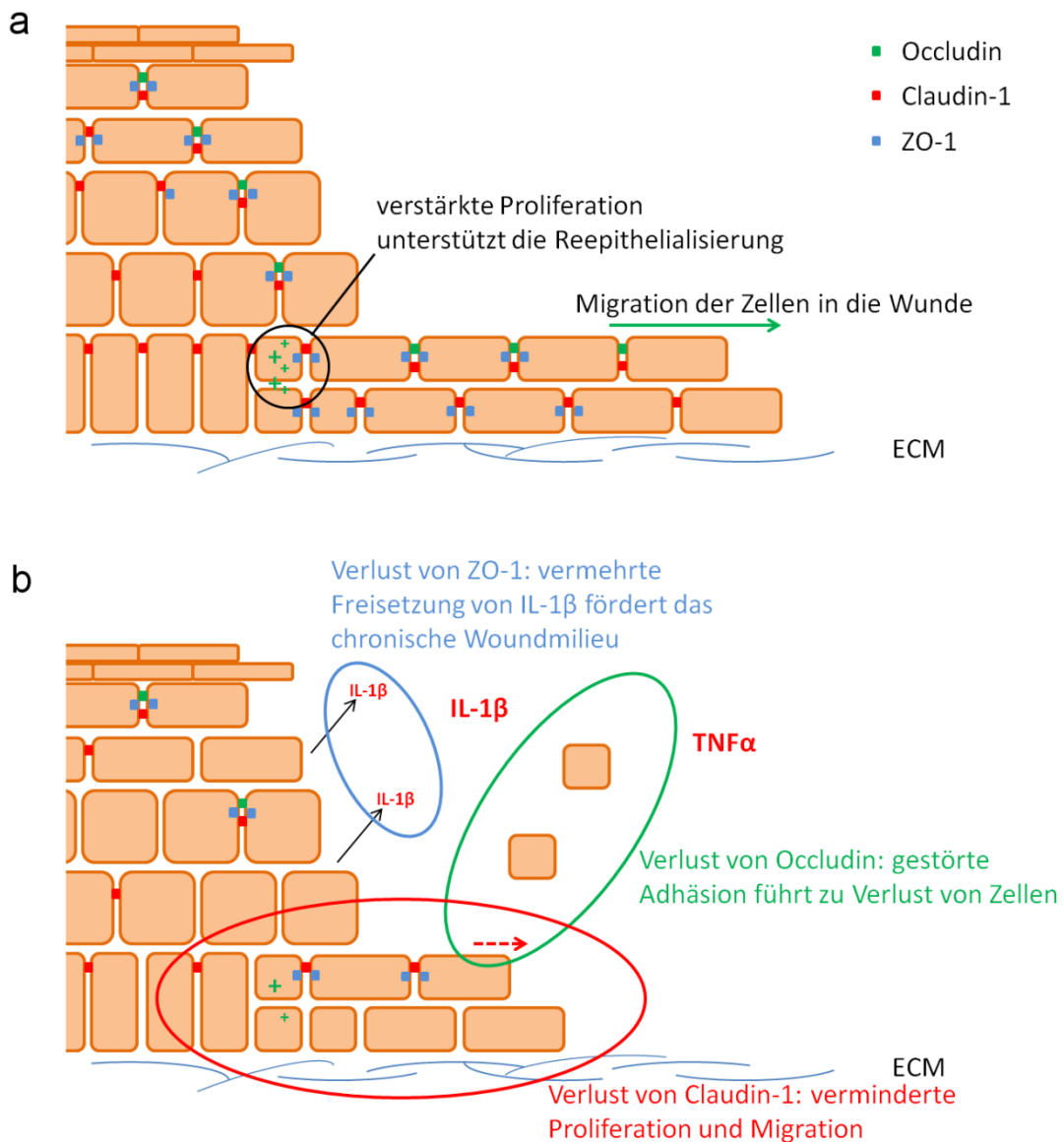


Abb. 4.1 TJ-Proteine in der Wundheilung

Das Schema zeigt die Lokalisation der drei TJ-Proteine Claudin-1, Occludin und ZO-1 (**a**) während einer regulären Wundheilung und (**b**) in einer chronischen Wunde, und stellt die in der Diskussion erläuterten Auswirkungen eines Verlustes der TJ-Proteine graphisch dar.

Zukünftige Forschungsbemühungen sollten daher auf die Untersuchung der Mechanismen gerichtet sein, die den beobachteten Effekten des Knockdowns der

verschiedenen TJ-Proteine zugrundeliegen. Durch Kenntnis der mechanistischen Auswirkungen des Verlustes der TJ-Proteine in chronischen Wunden könnten dann zielgerichtete Therapiemaßnahmen eingeleitet werden. Mit dem Nachweis der Bedeutung der AKT-Kinase-Aktivität für die Wundheilungsfähigkeit der Keratinozyten in dieser Arbeit ist ein erster Schritt in diese Richtung getan. Im Falle von Occludin, das offenbar direkt an der Zell-Zell-Adhäsion in der Neoepidermis beteiligt ist, wäre die Stimulation der Expression bzw. die direkte Einbringung des Proteins über Nanocarrier-Systeme möglicherweise eine zu erforschende Therapieoption. Aufgrund der Tatsache, dass die pathologisch erhöhte Konzentration pro-inflammatorischer Cytokine wie IL-1 β und TNF- α in chronischen Wunden bereits seit vielen Jahren bekannt ist (Tregrove et al., 2000), wird bereits an geeigneten Gegenmaßnahmen zur Aufhebung dieses pathologischen Wundmilieus gearbeitet, wobei Wundverbände mit Collagen Typ I die Konzentration von IL-1 β in der Wunde massiv senken können (Wiegand et al., 2010), und der anti-TNF- α -Antikörper Infliximab bei topischer Applikation auf chronische Wunden eine heilungsfördernde Wirkung zeigte (Streit et al., 2006).

4.1.3. Vergleich mit den Daten zur Lokalisation der TJ-Proteine in porzinen *ex vivo* WHM

Aufgrund der deutlich besseren Verfügbarkeit wurden von Dr. Heilmann für die Untersuchung der Dynamik der TJ-Proteine porzine *ex vivo* Wundheilungsmodelle verwendet. Dies geschah auf Basis früherer Erfahrungen des Labors sowie verschiedenen Publikationen (Meyer, 1996; Sullivan et al., 2001; Liu et al., 2010; Seaton et al., 2015), welche die Haut des Schweins als in vielen Punkten der menschlichen Haut sehr ähnlich beschreiben und ihre Verwendung als Ersatzmodell für dermatologische Untersuchungen befürworten. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden diese Daten neu und entsprechend dem Wundheilungsfortschritt sortiert, sodass jetzt zwischen Wunden direkt nach Wundsetzung (keine Reepithelialisierung), Wunden mit <50 % Reepithelialisierung, Wunden mit 50-99 % Wundverschluss und komplett geschlossenen Wunden unterschieden wurde. Im Vergleich mit den Erkenntnissen aus der Untersuchung der humanen Wundheilungsmodelle zeigte sich, dass vor allem für Claudin-1 und Occludin die Verteilung sowohl in gesunder Haut als auch während der frühen Phase der Wundheilung hinter dem und direkt am Wundrand übereinstimmt. Die regenerierende Epidermis in der Wunde präsentierte sich dann mit leichten Differenzen für die Verteilung dieser beiden Proteine. Dabei muss es sich allerdings nicht zwangsläufig

um einen realen Effekt handeln, der auf Unterschieden zwischen humaner und porciner Haut beruht. Möglich ist ebenso, dass aufgrund der kleineren Fallzahl in humanen WHM ($n = 4$ für humane; $n = 12$ für porcine WHM) diese Beobachtung in der vorliegenden Arbeit ausgeblieben ist. Darüber hinaus muss beim Vergleich der Ergebnisse bedacht werden, dass die humanen WHM aus adulter Haut stammten, die porcinen WHM dagegen aus quasi jugendlichen Schweinen. Da mit fortschreitendem Alter die Migrationsfähigkeit abnimmt, die Proliferationsrate der Keratinozyten sinkt und sich die Turnover-Zeit, d. h. die Dauer der Differenzierung und der damit verbundenen Migration vom *Stratum basale* bis in das *Stratum corneum*, verlängert (Xia et al., 2001), muss mit Abweichungen in der Wundheilungsgeschwindigkeit, die beim Vergleich der Wundheilung humaner Probanden unterschiedlichen Alters nachgewiesen wurde (Holt et al., 1992), und den einhergehenden Prozessen wie der Differenzierung der Neoepidermis gerechnet werden.

Die in den chronischen Wunden oftmals beobachtete Abwesenheit von Claudin-1 konnte auch durch die Daten der porcinen WHM nicht erklärt werden, da porcine WHM mit fortgeschrittener Wundheilung nur selten einen solchen Verlust zeigten und dieser somit auch im späteren Wundheilungsverlauf nicht regulär aufzutreten scheint.

Bezogen auf Occludin fand sich in den porcinen WHM mit einer fortgeschrittenen Wundheilung zum Teil eine ähnlich verbreiterte Lokalisation hinter dem Wundrand wie in den chronischen Wunden, sodass sich diese Beobachtung möglicherweise mit der zeitlichen Dauer des Wundheilungsprozesses und nicht dem tatsächlichen Wundheilungsfortschritt in Verbindung bringen lässt, wobei aber zu beachten ist, dass die chronischen Wunden deutlich längere Zeit bestanden als die Wunden der porcinen WHM. Für den Wundrand und die regenerierende Epidermis fand sich in den porcinen WHM mit fortgeschrittener Wundheilung kein Verlust von Occludin, sodass diese Beobachtung aus chronischen Wunden mit den vorliegenden Daten nicht über das Alter der Wunde erklärt werden kann.

Für ZO-1 zeigten sich größere Unterschiede zwischen den porcinen und den humanen *ex vivo* WHM. Hinter dem Wundrand fand sich ZO-1 in allen humanen WHM beschränkt auf das *Stratum granulosum*, porcine WHM in der frühen Wundheilungsphase dagegen zeigten in gut der Hälfte der Fälle aber eine leicht verbreiterte Expression, die aber nicht bei Erklärung der nochmals deutlich breiteren Lokalisation in chronischen Wunden half, zumal weiter fortgeschrittene porcine WHM überwiegend wieder eine Beschränkung von ZO-1 auf das *Stratum granulosum* zeigten. Am Wundrand ließen sich in frühen humanen und porcinen WHM zwar die gleichen Verteilungsmuster erkennen, aber stärker verheilte porcine WHM zeigten nicht die starke Verbreiterung wie in chronische Wunden und können damit nicht zur

Aufklärung beitragen. In der regenerierenden Epidermis zeigten sich dann frühe humane und porcine WHM mit deutlich abweichender Lokalisation für ZO-1 mit einer Beschränkung von ZO-1 in den prozinen WHM auf die oberen Zellschichten, sodass eine spezies-spezifische Regulation und/oder ein alters-abhängiger Einfluss vermutet werden kann. Porzine WHM mit fortgeschrittener Reepithelialisierung zeigten dann ZO-1 allerdings auch überwiegend mäßig und teilweise stark verbreitert lokalisiert, jedoch in keinem Fall einen Verlust des Proteins. Aufgrund der bereits zu Beginn der Wundheilung abweichenden Lokalisation von ZO-1 in der regenerierenden Epidermis zwischen humanen und porcinen WHM ist ein Vergleich der porcinen WHM mit fortgeschrittener Wundheilung mit den chronischen Wunden nicht sinnvoll.

Da in Proben beider Spezies sowohl Claudin-1 als auch Occludin in ähnlichen Mustern verteilt waren, scheint sich der für ZO-1 beobachtete Unterschied offenbar nicht auf die Lokalisation der beiden anderen TJ-Proteine auszuwirken. Rückschlüsse auf mögliche funktionelle Unterschiede lassen sich allein anhand der Immunfärbungen nicht ziehen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die porcinen WHM während der untersuchten frühen Wundheilungsphase bezüglich der Lokalisation der TJ-Proteine Occludin und Claudin-1 große Übereinstimmungen mit den humanen WHM aufzeigten und die gefundenen Unterschiede sich möglicherweise durch die geringere Fallzahl und damit statistisch weniger aussagekräftige Auswertung der humanen WHM erklären lassen, oder alternativ bzw. zusätzlich wie bereits diskutiert der Altersunterschied zwischen den humanen und porcinen Gewebespendern einen Einfluss auf die Lokalisation hatte.

Grundsätzlich ist neben der unvorhersehbaren und generell deutlich schlechteren Verfügbarkeit humaner Hautproben als weiteres Argument für die porcinen WHM zu bedenken, dass diese stets auf Gewebe von gleichaltrigen Schweinen basieren, wohingegen die humanen Gewebe von Patienten unterschiedlichen Alters stammen, was zu einer größeren Diversität der Beobachtungen führt. Weiterhin besteht die Gefahr nicht diagnostizierter (Haut-) Krankheiten der Patienten, die zu abweichenden Beobachtungen im Vergleich mit gesunden Patienten führen könnten. Nicht vergessen werden sollte aber, dass Schweinehaut, und auch generell Schweine, trotz ihrer vielen anatomischen Übereinstimmungen mit Menschen auch Unterschiede aufweisen, die sicherlich noch nicht erschöpfend erforscht sind. Eine sich vom Menschen unterscheidende Expression von Proteinen in Schweinegewebe wurde beispielsweise für Integrin $\alpha 3$ gezeigt, das in humaner Epidermis auf das *Stratum basale* beschränkt, in porciner Haut aber auch in suprabasalen Schichten vorhanden ist (Zhang et al., 1997). Auch das porcine Äquivalent zum humanen CFTR zeigte eine in Teilen abweichende Lokalisation bzw. Expression, da der porcine CFTR weder in den Nieren,

noch dem Gehirn oder der Haut exprimiert wird (Plog et al., 2010). Ebenso zeigten sich einige Unterschiede bezüglich der Stärke der Expression der ABC-Transporter P-gp und BCRP, wobei P-gp im Colon und besonders den Nieren, BCRP dagegen in der Leber von Schweinen vergleichsweise schwach exprimiert ist (Schricks, 2006). Die Nutzung von porzinen Modellen sollte daher stets mit einer Charakterisierung des physiologischen Normalzustandes einhergehen, um die Vergleichbarkeit zum Menschen zu gewährleisten.

4.2. Anmerkungen zum Einfluss von Medium, Keratinozyten-Ursprung und Negativkontrollen auf die Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich Einflüsse durch die Verwendung der beiden verschiedenen Medien, der verschiedenen Spender der kultivierten Keratinozyten und auch durch die Verwendung der verschiedenen Kontroll-siRNAs (siehe dazu auch Kapitel 3.2.2.4) auf die Ergebnisse.

4.2.1. Einfluss des Mediums

Aufgrund der früheren Erfahrungen unserer und anderer Arbeitsgruppen, dass das Zellkulturmedium zellbiologische Vorgänge stark beeinflusst (Lamb & Ambler, 2013; Zare et al., 2014; Zorn-Kruppa et al., 2016), wurden in dieser Arbeit zwei Kulturmedien parallel verwendet. Tatsächlich zeigte sich im Laufe der Arbeit, dass das Zellkulturmedium ein Einflussfaktor auf das Wundheilungsvermögen und auch andere zellphysiologische Parameter ist. Bei Verwendung des Zellkulturmediums KGM zeigten die komplett unbehandelten Keratinozyten im Durchschnitt eine leicht verbesserte Wundheilung im Vergleich mit den in DermaLife kultivierten Zellen. Sobald die Zellen aber mit siRNA behandelt wurden, führte eine Kultivierung in KGM stets zu einer schlechteren Wundheilung als bei Kultivierung in DL (siehe Kapitel 3.2.1). Trotz der veränderten Wundheilungsgeschwindigkeit fand sich nur ein minimaler, nicht signifikanter Unterschied von zwei Prozentpunkten bezüglich der proliferativen Aktivität der Zellen am Wundrand der Scratchwunden, wobei die Zellen in KGM eine niedrigere Aktivität aufwiesen. Somit scheint das Medium auch und vor allem einen direkten Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Keratinozyten zu haben. Als ebenfalls vom Medium beeinflusst zeigten sich auch die Proteinmengen der untersuchten TJ-Proteine (siehe Kapitel 3.2.1). Aufgrund dieser unterschiedlichen Proteinmengen und den teilweise leicht unterschiedlichen Knockdown-Effizienzen ergeben sich auch leichte Unterschiede für die verbleibende Restproteinmenge in den jeweiligen

Knockdownzellen, die ebenfalls mit verantwortlich sein könnten für die beobachteten Unterschiede zwischen den Auswirkungen des Knockdowns in den beiden Medien.

Die Beobachtung dieser unterschiedlichen Auswirkungen der Zellkulturmedien auf die Keratinozyten führt zwangsweise zu der Frage nach den genauen Ursachen. Da es sich bei beiden Medien um kommerzielle Produkte handelt und nicht um selbst hergestellte Medien, stehen für diese Fragestellung leider nicht alle notwendigen Daten zur Verfügung, da die Anbieter der beiden Medien verständlicherweise die genaue Zusammensetzung nicht öffentlich bekanntgeben. Anhand der bei beiden Medien manuell hinzuzufügenden Supplemente kann aber zumindest ein teilweiser Vergleich erfolgen. Ein wichtiger Faktor könnte dabei der *epidermal growth factor* (EGF) sein, der in KGM in einer Konzentration von 0,15 ng / ml vorliegt. EGF bewirkt eine verringerte Expression der TJ-Proteine Claudin-1 und ZO-1 und erhöht die parazelluläre Permeabilität primärer humaner Keratinozyten (Tran et al., 2012), darüber hinaus fördert er auch die Migration von Keratinozyten (Gibbs et al., 2000; Lee et al., 2005; Barrientos et al., 2008; Peplow & Chatterjee, 2013). Leider liegen für das DermaLife-Medium keine Angaben zu EGF vor, allerdings könnte ein geringerer Gehalt von EGF in diesem Medium dazu führen, dass die Keratinozyten damit vergleichsweise mehr Claudin-1 produzieren, was zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit passen würde. Allerdings konnte für ZO-1 kein Unterschied festgestellt werden, was somit zumindest gegen einen nur auf EGF beruhenden Effekt spricht. Im Gegensatz zu KGM enthält das Medium DermaLife allerdings den *transforming growth factor-alpha* (TGF- α), ein Mitglied der EGF-Familie, welcher ebenfalls an den EGF-Rezeptor bindet. Wie bereits früh gezeigt wurde ist TGF- α sogar ein potenter Aktivator für den EGF-Rezeptor (Ebner & Derynck, 1991), was in Verbindung mit der im Vergleich höheren Konzentration (0,5 ng / ml TGF- α in DL; 0,15 ng / ml EGF in KGM) theoretisch dazu führen sollte, dass Keratinozyten in DL schneller migrieren können und weniger Claudin-1 sowie ZO-1 exprimieren. Da in der vorliegenden Arbeit in unbehandelten Zellen gerade dazu entgegengesetzte Beobachtungen gemacht wurden, scheint es noch weitere Faktoren zu geben, die der zu erwartenden EGF-Rezeptor-vermittelten Regulation entgegenwirken.

Bezüglich des Effekts von Glucocorticoiden, die in KGM in Form von Hydrocortison deutlich höher konzentriert vorliegen als in DL (0,91 μ M in KGM bzw. 0,22 μ M in DL), existieren verschiedene wissenschaftliche Studien, die sowohl einen positiven Einfluss auf die Hautbarriere (Sevilla et al., 2013) als auch eine Verstärkung der TJ-Bildung in humanen Atemwegsepithelzellen (Sekiyama et al., 2012) zeigten. Eine weitere Studie zeigte zudem einen Dosis-abhängigen Effekt von Hydrocortison in immortalisierten, mikrovaskulären Endothelzellen aus der Retina von Rindern, die bei einer geringen

Dosis von 0,1 μM am meisten Occludin in ihrer Membran beinhalteten, hingegen aber sowohl bei völliger Abwesenheit von Hydrocortison als auch bei einer Konzentration von 3 μM kein membran-assoziiertes Occludin aufwiesen (Deissler et al., 2008). Die mechanistische Aufklärung betreffend wurde bereits gezeigt, dass der Glucocorticoid-Rezeptor in endothelialen Zellen an den Promotor für Occludin bindet (Förster et al., 2005; Felinski et al., 2008; Harke et al., 2008). Andererseits konnte bei zehntägiger Applikation eines Glucocorticoids auf die Haut von Mäusen eine Herabregulation von Claudin-1, Claudin-4 und Occludin gezeigt werden, was sich aber in Anbetracht der bereits erwähnten Dosis-Abhängigkeit des Hydrocortison-Effekts ebenfalls in die Überlegungen integrieren lässt. Somit besteht ganz offensichtlich die Möglichkeit, dass sich auch dieser Aspekt der Medienzusammensetzung in einer Veränderung der Zellphysiologie niederschlägt. Berichte über einen negativen Einfluss von Glucocorticoiden auf die Wundheilung und Keratinozytenmigration (Lee et al., 2005; Vukelic et al., 2011) vereinfachen die Erklärungsversuche leider nicht, da untransfizierte Zellen in KGM tendenziell eine leicht bessere Wundheilung als bei Verwendung des DermaLife-Mediums zeigten, und erst nach Behandlung mit den verschiedenen siRNAs ein negativer Effekt durch das Medium KGM beobachtet werden konnte.

Darüber hinaus müssen noch die Wachstumsfaktor- und Hormonmische erwähnt werden, die den beiden Medien vor Verwendung zugesetzt werden. Während bei KGM Rinderhypophysenextrakt verwendet wird, ist für DL ein Zusatz namens Extract-P vorgesehen. Da es sich in beiden Fällen um ein nicht näher beschriebenes Gemisch aus verschiedenen Hormonen und Wachstumsfaktoren handelt, lässt sich eine Beteiligung dieser Substanzen an den beobachteten Unterschieden nicht ausschließen, aber darüber hinaus nicht weiter diskutieren. Da es sich zudem zumindest beim Rinderhypophysenextrakt des KGM-Mediums um ein Naturprodukt handelt, sind gewisse Abweichungen zwischen verschiedenen Chargen ebenfalls nicht auszuschließen, was sich auf die Streubreite der Messwerte auswirken kann. Bei einer zusammenfassenden Betrachtung der Effekte der beiden verschiedenen Medien bleibt festzuhalten, dass die Keratinozyten in DL eine höhere Proteinexpression für Claudin-1 und Occludin zeigten und tendenziell etwas langsamer migrierten, was auf eine etwas höhere Differenzierung der Zellen hindeutet. Da die im Fokus der Arbeit stehende Wundheilung *in vivo* vor allem von basalen, undifferenzierten Keratinozyten durch Migration und Proliferation vorangetrieben wird, stellen die offenbar etwas weniger differenzierten Zellen in KGM die *in vivo* Situation vermutlich repräsentativer dar.

4.2.2. Einfluss des Spenders

Für die Interpretation der Ergebnisse der Zellkultur-Experimente der vorliegenden Arbeit muss beachtet werden, dass diese mit primären Zellen verschiedener Spender durchgeführt wurden. Dies führt, im Gegensatz zur Arbeit mit immortalisierten Zelllinien, zwangsläufig zu einer größeren Streuung der untersuchten Parameter, da die einzelnen Zellpräparationen analog zu den jeweiligen Gewebespendern einen individuellen, einzigartigen genetischen Background haben, und sich daher in einem gewissen Rahmen hinsichtlich ihrer Reaktionen auf die verschiedenen Behandlungen und Kultivierungsbedingungen voneinander unterscheiden (Moule et al., 1995; Schlaak et al., 2002; Stoddart et al., 2012; Wieczorek et al., 2013). Darüber hinaus ist zu beachten, dass diese Unterschiede in verschiedenen Medien unterschiedlich stark zur Ausprägung kommen (Zorn-Kruppa et al., 2016). Um die zu erwartenden Schwankungen auszugleichen und gesicherte Aussagen treffen zu können sind daher, wie in der Literatur vorgeschlagen (Stoddart et al., 2012), alle Versuche mit Zellen von mindestens drei verschiedenen Spendern durchgeführt worden.

4.2.3. Einfluss der Behandlung mit den Negativ-Kontroll-siRNAs

Um die Auswirkungen der Behandlung der primären humanen Keratinozyten mit den verschiedenen Protein-spezifischen siRNAs beurteilen zu können, war die parallele Durchführung einer Kontroll- bzw. Scheinbehandlung erforderlich. Da für die erfolgreiche transiente Transfektion der Zellen die siRNA zusammen mit der Transfektionsreagenz HiPerfect appliziert werden muss, sollte sich die ideale Kontrollbehandlung auf die Inkubation der Keratinozyten mit der Transfektionsreagenz beschränken. Leider führte die Behandlung mit HiPerfect ohne gleichzeitige Zugabe von siRNA zu einer starken Beeinträchtigung der Zellen, sodass diese nicht als Negativkontrollen zu Vergleichszwecken herangezogen werden konnten. Somit war es erforderlich, die Kontrollbehandlung mit unspezifischen non-target siRNAs durchzuführen. Die Inkubation der Keratinozyten mit den beiden verwendeten derartigen siRNAs, „AllStars Negative Control“ und „Negative Control“ der Firma Qiagen, zeigte im Rahmen der Arbeit allerdings durchaus Einflüsse auf verschiedene zellphysiologische Parameter (siehe Tab. 3.1 und Tab. 3.2).

Wie bereits in Kapitel 3.2.2.4 diskutiert wurde die „AllStars Negative Control“ Kontroll-siRNA als Referenz gewählt, da diese einen geringeren Einfluss auf die wichtigen Auswerteparameter zeigte und dichter am Niveau der unbehandelten Kontrollzellen lag als die Zellen, die mit der „Negative Control“-siRNA behandelt worden waren. Dafür

wurde auch in Kauf genommen, dass die AS-siRNA einen, wenn auch deutlich schwächeren Effekt als der gezielte Knock-Down, herabregulieren Effekt auf Claudin-1 hatte. Da das Niveau von Claudin-1 in allen Experimenten überprüft wurde, konnte dieser Parameter immer berücksichtigt werden.

Da sich die beiden Kontroll-siRNAs derart in ihren Auswirkungen auf die Keratinozyten unterscheiden, muss leider angenommen werden, dass die beobachteten Effekte nicht allein auf die Behandlung mit der Transfektionsreagenz HiPerfect zurückzuführen sind, sondern auch die eigentlich an keinerlei mRNA bindenden Kontroll-siRNAs in irgendeiner Form Einfluss auf die Zellphysiologie nehmen. Aufgrund der Tatsache, dass die Zielsequenz der AS-siRNA nicht veröffentlicht wurde, kann diese Aussage des Herstellers nicht einfach nachgeprüft werden. Für die NeKo-siRNA hingegen ist die 21 Nukleotide umfassende Zielsequenz bekannt (siehe Kapitel 3.2.2), und eine Suche mithilfe des online verfügbaren BLAST-Tools des nationalen US-Gesundheitsinstituts NIH (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) findet einen kurzen, 13 Nukleotide umfassenden Bereich dieser Zielsequenz in der mRNA der humanen STE20-like kinase (hSLK). Da dieser Bereich der mRNA-Sequenz von hSLK erst im März 2015 veröffentlicht wurde, kann er beim Design der einige Jahre älteren NeKo-siRNA nicht berücksichtigt worden sein und beeinflusste auch nicht die Wahl der siRNA für die vorliegende Arbeit. Ob diese teilweise Übereinstimmung jedoch ausreicht, um eine Bindung der NeKo-siRNA an die mRNA der hSLK zu ermöglichen und somit eventuell eine Veränderung der Proteinmenge von hSLK bewirkt ist eher zu bezweifeln, da für die Bindung der siRNA an ihre Zielsequenz eigentlich eine perfekte Übereinstimmung vorausgesetzt wird, und müsste experimentell überprüft werden. Sollte eine Interaktion der NeKo-siRNA mit der mRNA für hSLK möglich sein, könnte sich die schlechtere Wundheilung der Keratinozyten nach Inkubation mit dieser siRNA möglicherweise durch eine negative Beeinflussung von hSLK erklären lassen, da für hSLK eine Beteiligung an verschiedenen Prozessen wie z.B. auch der Migration nachgewiesen wurde (Al-Zahrani et al., 2013). Diese Möglichkeit sollte bei zukünftigen Anwendungen der NeKo-siRNA berücksichtigt und idealerweise aufgeklärt werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht weiter untersucht da dies nicht Ziel der Arbeit war und eine alternative Kontroll-siRNA zur Verfügung stand.

4.2.4. Vergleich der Effekte der für den KD der verschiedenen Proteine eingesetzten siRNAs

Die Inkubation der primären humanen Keratinozyten mit den beiden Claudin-1-siRNAs führte zu einer deutlichen und signifikanten Verringerung der Menge an Claudin-1, die

in den Proteinextrakten der Zellen nachgewiesen werden konnte, wobei die siRNA #8 die bessere Effizienz zeigte. Diese bessere Effizienz spiegelt sich auch in den Daten der *in vitro* Wundheilungsversuche wieder, bei denen die Inkubation der Zellen mit der Claudin-1 siRNA #8 zu einer signifikant verlangsamten Wundheilung führte (siehe Kapitel 3.2.3.1). Bei Verwendung der siRNA #5 kam es zwar ebenfalls zu einer Verlangsamung der Wundheilung, allerdings erreichte diese keine signifikanten Ausmaße. Aufgrund der ebenfalls leicht unterschiedlichen Effizienz der beiden siRNAs bezüglich des Claudin-1-Knockdowns ließe sich hier vermuten, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an Claudin-1 und der beobachteten Wundheilungsgeschwindigkeit besteht. Der regulatorische Einfluss unterschiedlicher Claudin-1-Proteinlevel wurde bereits für das Wundheilungsvermögen humaner epithelialer Brustkrebszellen (Blanchard et al., 2013) sowie die Ausprägung der Kennzeichen Atopischer Dermatitis in einem Mausmodell gezeigt (Tokumasu et al., 2016). Bezüglich der beiden anderen TJ-Proteine Occludin und ZO-1 kam es mit beiden siRNAs in vergleichbarem Ausmaß zu Veränderungen in den Proteinleveln (siehe Kapitel 3.2.3).

Wurden die primären humanen Keratinozyten mit den beiden Occludin-siRNAs behandelt, so führte dies zu einer deutlichen und signifikanten Verringerung der Proteinmenge von Occludin, wobei die siRNA #11 effizienter war als siRNA #7. Die unterschiedlichen Effizienzen spiegeln sich interessanterweise nicht im Einfluss auf den normalen und den gestressten Scratch-Wundheilungsversuch wider.

Die Behandlung der humanen Keratinozyten mit gegen das TJ-Protein ZO-1 gerichteter siRNA führte zu einer Verringerung der Protein- und mRNA-Menge des Zielproteins, wobei die siRNA #7 eine etwas bessere Effizienz aufwies. Beide siRNAs führten zu keinen auffälligen Veränderungen des Verhaltens der Keratinozyten im *in vitro*-Wundheilungsversuch oder in der Proliferation, sodass sich auch kein Dosis-abhängiger Effekt feststellen ließ.

5. Zusammenfassung

Chronische Wunden sind charakterisiert durch das Verharren in der inflammatorischen Phase sowie die Fehlregulation verschiedener Prozesse der Wundheilung, beispielsweise der Proliferation und dem Vorbereiten der extrazellulären Matrix der Dermis für die Reepithelialisierung. Da in normalen heilenden Wunden eine dynamische Regulation verschiedener TJ-Proteine beobachtet wurde, ergab sich die Frage nach einer möglichen Beteiligung dieser Proteine an den Wundheilungsvorgängen und einer Störung dieser Funktion in chronischen Wunden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten eindeutige Unterschiede in der Lokalisation der TJ-Proteine Claudin-1 und Occludin zwischen chronischen Wunden und akuten, regulär heilenden Wunden nachgewiesen werden; für ZO-1 waren eindeutige Unterschiede vor allem hinter dem Wundrand erkennbar, während sich für die regenerierende Epidermis kein klares Muster zeigte. Dabei wurde vor allem für Claudin-1 und Occludin, aber auch ZO-1 in bemerkenswerter Häufigkeit ein Verlust des Proteins in der regenerierenden Epidermis beobachtet, der sich zum Teil auch am Wundrand zeigte. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde mit Hilfe verschiedener *in vitro* Zellkulturexperimente an primären humanen Keratinozyten untersucht, welche Auswirkungen die massive Herabregulation jeweils eines dieser TJ-Proteine auf verschiedene, für die epidermale Wundheilung bedeutsame physiologische Prozesse der Zellen hat. Durch die Verwendung von Keratinozyten unter Niedrig-Calcium-Bedingungen beschränken sich die möglichen Effekte dabei auf Funktionen der TJ-Proteine, die außerhalb von funktionellen TJ-Strukturen wahrgenommen werden können und damit eine Ergänzung zu den TJ-abhängigen Barrierefunktionen darstellen. Für Claudin-1 und Occludin wurden zusätzlich ergänzende Untersuchungen mit Zellen unter Hoch-Calcium-Bedingungen, die eine Ausbildung von TJs erlaubten, durchgeführt. Dabei zeigten sich für den Verlust von Claudin-1 unter beiden Kultivierungsbedingungen direkte negative Auswirkungen auf die Wundheilung, die in der verminderten Proliferation und Migrationsfähigkeit der Keratinozyten begründet waren. Untersuchungen von Proteinkinasen, die wichtig für diese beiden Prozesse sind, zeigten, dass Claudin-1 einen signifikant negativen Einfluss auf die Aktivierung von AKT hat, während bezüglich ERK nur ein Effekt auf das Gesamtprotein beobachtet werden konnte und der Einfluss auf p-38-MAPK gering war. Zusätzlich konnte bewiesen werden, dass die Inhibition der AKT-Kinase einen negativen Effekt auf die *in vitro*-Wundheilung hat, und somit einen möglichen Mechanismus für die Wirkung des Claudin-1-Knockdowns darstellt. Der Knockdown von Occludin führte im normalen Scratch-Wundheilungsversuch zu keinen Veränderungen, erst im Rahmen eines

Scratch-Wundheilungsversuches mit zusätzlichem mechanischem Stress zeigte sich eine verzögerte Wundheilung, wobei der Effekt nur unter Niedrig-Calcium-Bedingungen beobachtet wurde. Dies beruht vermutlich auf einer bereits zuvor gezeigten Rolle von Occludin in der Zell-Zell-Adhäsion. Für ZO-1 konnte in den Versuchen dieser Arbeit kein direkter Effekt des Protein-Knockdowns auf die Scratch-Wundheilung nachgewiesen werden. Frühere Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten aber die erhöhte Freisetzung des pro-inflammatorischen Cytokins IL-1 β nach Knockdown von ZO-1. Wie die Untersuchungen der Proben aus chronischen Wunden humaner Patienten zeigten, tritt der Verlust von Claudin-1 und Occludin oft gemeinsam auf, wodurch die negativen Auswirkungen möglicherweise kumulieren und synergistisch zu dem gestörten Heilungsprozess in chronischen Wunden beitragen. Neben den bekannten Beeinträchtigungen eines Verlusts der TJ-Proteine Claudin-1 und Occludin durch eine gestörte Differenzierung und damit einhergehenden Barrieredefekten, die das Eindringen von Pathogenen ermöglichen und darüber eine Beeinträchtigung der Wundheilung verursachen können liefert die vorliegende Arbeit Beweise für TJ-unabhängige Funktionen dieser beiden Proteine, die somit im Rahmen der Wundheilung besonders für die an der Migration und Proliferation beteiligten basalen, undifferenzierten Zellen von Bedeutung sind, wobei Claudin-1 darüber hinaus auch in differenzierten Zellen diese Funktionen ausüben kann.

Abstract

Tight Junction (TJ)-Proteine sind bekannt für ihre Beteiligung an der Proliferation und Differenzierung. Da diese Vorgänge essenziell für die normale Wundheilung der Haut sind, wurden in der vorliegenden Arbeit die TJ-Proteine Claudin-1, Occludin und ZO-1 in *ex vivo* Wundheilungsmodellen und Gewebeproben von akuten und chronischen humanen Wunden untersucht, um ihre Rolle in der gestörten Wundheilung zu ermitteln. Besonders für Claudin-1 und Occludin wurden bedeutende Unterschiede in der Lokalisation/Expression gefunden, wobei chronische Wunden oftmals einen Verlust der Proteine am Wundrand und/oder der regenerierenden Epidermis zeigten. Knockdown-Experimente mit primären humanen Keratinozyten, die entweder mit geringen oder hohen Calcium-Konzentrationen kultiviert wurden, um die Ausbildung funktioneller TJs zu verhindern bzw. zu induzieren, zeigten unter beiden Kultivierungsbedingungen, dass eine reduzierte Claudin-1-Expression zu einer signifikant beeinträchtigten Scratch-Wundheilung führte, verursacht durch verzögerte Migration und verminderte Proliferation. Die Aktivierung des AKT-Kinase-Signalweges war nach dem Claudin-1-Knockdown ebenfalls signifikant abgeschwächt und der Proteinlevel der ERK 1/2-Kinase reduziert. Die selektive Inhibition der AKT-Kinase-Aktivität mittels MK-2206 verzögerte ebenso die Scratch-Wundheilung und bestätigte damit die Rolle des veränderten AKT-Kinase-Signalings in der Vermittlung des Effekts des Claudin-1-Knockdowns. Darüber hinaus konnte auch ein Einfluss des Claudin-1-Knockdowns auf die Expression verschiedener Proteine gezeigt werden, die in die Differenzierung von Keratinozyten involviert sind. Der Knockdown von Occludin zeigte erst dann einen Einfluss auf die Scratch-Wundheilung, wenn die Zellen zusätzlich mechanischem Stress – der regulär in *in vivo* Wunden auftritt – ausgesetzt waren, wobei die Wundheilung nur in Niedrig-Calcium-Bedingungen beeinträchtigt wurde. Für den Knockdown von ZO-1 konnte kein Einfluss auf die Scratch-Wundheilung nachgewiesen werden. Da die meisten der beobachteten Effekte des Knockdowns von Claudin-1 und Occludin unabhängig von der Ausbildung barrierebildender TJs waren, konnten somit Funktionen der TJ-Proteine in der Haut ohne Bezug zur Barrierebildung demonstriert werden. Für Claudin-1 waren die Effekte auf die Scratch-Wundheilung allerdings stärker, wenn TJs ausgebildet werden konnten. Insgesamt betrachtet liefern die Ergebnisse dieser Arbeit Beweise für eine direkte Rolle von Claudin-1 und Occludin in der epidermalen Wundheilung mit potentieller klinischer Bedeutung.

Tight junction proteins are known to be involved in proliferation and differentiation. Since these processes are essential for normal skin wound healing, the tight junction

proteins claudin-1, occludin and ZO-1 were investigated in ex-vivo skin wound healing models and in tissue samples of acute and chronic human wounds in this study to determine their role in impaired wound healing. Major differences in localization/expression of these proteins, especially for claudin-1 and occludin, were observed, with chronic wounds often showing a loss of the proteins at the wound margins and/or in the regenerating epidermis. Knock-down experiments in primary human keratinocytes, cultured either under low or high calcium conditions to inhibit or induce the assembly of functional tight junctions, showed that decreased claudin-1 expression resulted in significantly impaired scratch wound healing in both conditions, with delayed migration and reduced proliferation. Activation of AKT pathway was significantly attenuated after claudin-1 knock-down, and protein levels of ERK 1/2 kinase were reduced. Selective inhibition of AKT kinase activity using MK-2206 also impaired scratch wound healing, confirming the role of altered AKT signaling in mediating the effect of a claudin-1 knock-down. Furthermore, an impact of claudin-1 knock-down on the expression of several proteins involved in keratinocyte differentiation was shown. For occludin, downregulation had no impact on wound healing in normal scratch assays but after subjecting the cells to mechanical stress – which is normally present in wounds – wound healing was impaired in low, but not in high calcium conditions. Regarding the ZO-1 knock-down, no significant impact on scratch wound healing was found. For claudin-1 and occludin we show that most of these actions are independent from the formation of barrier-forming TJ structures thus demonstrating non-barrier related functions of TJ proteins in the skin. However, for claudin-1 effects on scratch wound healing were more pronounced when TJs could form. Together, our findings provide evidence for a direct role of claudin-1 and occludin in epidermal regeneration with potential clinical importance.

Veröffentlichungen

eingereicht

Volksdorf, T., Heilmann, J., Eming, S. A., Schawjinski, K., Zorn-Kruppa, M., Ueck, C., Vidal-y-Sy, S., Windhorst, S., Jücker, M., Moll, I. und Brandner, J. M. (2017). Tight junction proteins claudin-1 and occludin are important for cutaneous wound healing. *Am J Pathol*

veröffentlicht

Zorn-Kruppa, M., Volksdorf, T., Ueck, C., Zöller, E., Reinshagen, K., Ridderbuch, I., Bruning, G., Houdek, P., Moll, I. und Brandner, J. M. (2016). Major cell biological parameters of keratinocytes are predetermined by culture medium and donor source. *Exp Dermatol* **25**, 242-4.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 schematischer Querschnitt der Haut	2
Abb. 1.2 Ablauf der kutanen Wundheilung	6
Abb. 1.3 Aufbau und Funktion der TJs	8
Abb. 1.4 Verteilung der TJ-Proteine in der Epidermis	9
Abb. 3.1 Lokalisation von Claudin-1 in unverwundeter Haut.....	53
Abb. 3.2 Lokalisation von Claudin-1 in einer akuten Wunde	54
Abb. 3.3 Lokalisation von Claudin-1 in akuten und chronischen humanen Wunden	54
Abb. 3.4 Lokalisation von Claudin-1 in einer chronischen Wunde.....	55
Abb. 3.5 Lokalisation von Occludin in unverletzter Haut	56
Abb. 3.6 Lokalisation von Occludin in einer akuten Wunde	57
Abb. 3.7 Lokalisation von Occludin in akuten und chronischen Wunden	57
Abb. 3.8 Lokalisation von Occludin in einer chronischen Wunde	58
Abb. 3.9 Lokalisation von ZO-1 in unverwundeter Haut.....	59
Abb. 3.10 Lokalisation von ZO-1 in einer akuten Wunde	59
Abb. 3.11 Lokalisation von ZO-1 in einer chronischen Wunde.....	60
Abb. 3.12 Lokalisation von ZO-1 in akuten und chronischen humanen Wunden	61
Abb. 3.13 Einfluss der Zellkulturmedien auf Proliferation und Wundheilung	63
Abb. 3.14 Einfluss der Zellkulturmedien auf die TJ-Proteinexpression.....	64
Abb. 3.15 Einfluss der siRNA-Kontrollen auf die Proliferation.....	65
Abb. 3.16 Einfluss der siRNA-Kontrollen auf die Scratch-Wundheilung.....	66
Abb. 3.17 Einfluss der siRNA-Kontrollen auf die AKT-Kinase.....	69
Abb. 3.18 Einfluss der siRNA-Kontrollen auf die ERK 1/2 Kinase.....	70
Abb. 3.19 Einfluss der siRNA-Kontrollen auf die p38-MAP-Kinase	71
Abb. 3.20 Western-Blot von Claudin-1.....	74
Abb. 3.21 Western-Blot von Claudin-1 in Hoch-Calcium-KGM	74
Abb. 3.22 Effekt des Claudin-1-Knockdowns im Scratch-Assay in KGM.....	76
Abb. 3.23 Effekt des Claudin-1-Knockdowns im Scratch-Assay in DermaLife	77
Abb. 3.24 Effekt des Claudin-1-Knockdowns im Scratch-Assay in Hoch-Calcium-KGM	78
Abb. 3.25 Effekt des Claudin-1-Knockdowns im Scratch-Assay mit Mitomycin C	79
Abb. 3.26 Proliferation der Keratinozyten bei Claudin-1-Knockdown	80
Abb. 3.27 Einfluss des Claudin-1-Knockdowns auf Differenzierungsmarker	81
Abb. 3.28 AKT-Kinase im Western-Blot.....	82
Abb. 3.29 Regulation der AKT-Kinase im Scratchverlauf.....	83
Abb. 3.30 ERK 1/2 Kinase im Western-Blot.....	84

Abb. 3.31 Regulation der ERK-Kinase im Scratchverlauf	85
Abb. 3.32 p38-MAP-Kinase im Western-Blot.....	86
Abb. 3.33 Regulation der p38-MAP-Kinase im Scratchverlauf.....	88
Abb. 3.34 AKT-Kinase im Western-Blot nach Inhibition mit MK-2206	89
Abb. 3.35 Effekt der Inhibition der AKT-Kinase im Scratch-Assay	90
Abb. 3.36 Western-Blot von Occludin	92
Abb. 3.37 Western-Blot von Occludin in Hoch-Calcium-KGM.....	93
Abb. 3.38 Effekt des Occludin-Knockdowns im Scratch-Assay in KGM.....	94
Abb. 3.39 Effekt des Occludin-Knockdowns im Scratch-Assay in Hoch-Calcium-KGM95	
Abb. 3.40 Effekt des Occludin-Knockdowns im Scratch-Assay in DermaLife.....	95
Abb. 3.41 Proliferation der Keratinozyten bei Occludin-Knockdown	96
Abb. 3.42 Vergleich Scratch-Assay ohne und mit mech. Stress	97
Abb. 3.43 Scratch-Assay mit Occludin-Knockdownzellen unter mech. Stress	98
Abb. 3.44 Scratch-Assay mit Occludin-KD-Zellen unter mech. Stress in Hoch-Calcium-Medium	99
Abb. 3.45 Western-Blot von ZO-1.....	101
Abb. 3.46 Effekt des ZO-1-Knockdowns im Scratch-Assay in KGM.....	102
Abb. 3.47 Effekt des ZO-1-Knockdowns im Scratch-Assay in DermaLife	103
Abb. 3.48 Proliferation der Keratinozyten bei ZO-1-Knockdown	104
Abb. 4.1 TJ-Proteine in der Wundheilung	118

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1 Zusammenfassung der Effekte der AllStar-siRNA	73
Tab. 3.2 Zusammenfassung der Effekte der Neg. Control-siRNA.....	73
Tab. 3.3 Zusammenfassung der Effekte des Claudin-1-Knockdowns	91
Tab. 3.4 Zusammenfassung der Effekte des Occludin-Knockdowns	100
Tab. 3.5 Zusammenfassung der Effekte des ZO-1-Knockdowns	104

Anhang

Exemplarische Syntax für die Auswertung der Daten der Scratch-Wundheilungsverusche mit Hilfe eines Random Intercept Models in SPSS:

```
MIXED DIFF_Baseline BY Behandlung Medium WITH Zeitpunkt WG_Baseline
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1)
SINGULAR(0.000000000001) HCONVERGE(0, ABSOLUTE) LCONVERGE(0,
ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED=Behandlung Medium Behandlung*Medium Zeitpunkt
Behandlung*Medium*Zeitpunkt Zeitpunkt*Zeitpunkt*Behandlung WG_Baseline | SSTY
PE(3)
/METHOD=REML
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(ID) COVTYPE(VC)
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(ID*Well_ID) COVTYPE(VC)
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(ID*Well_ID*Position) COVTYPE(VC)
/EMMEANS=TABLES(Behandlung*Medium) WITH(Zeitpunkt=12)
COMPARE(Medium) ADJ(BONFERRONI)
/EMMEANS=TABLES(Behandlung*Medium) WITH(Zeitpunkt=24)
COMPARE(Medium) ADJ(BONFERRONI)
/EMMEANS=TABLES(Behandlung*Medium) WITH(Zeitpunkt=36)
COMPARE(Medium) ADJ(BONFERRONI)
/EMMEANS=TABLES(Behandlung*Medium) WITH(Zeitpunkt=12)
COMPARE(Behandlung) ADJ(BONFERRONI)
/EMMEANS=TABLES(Behandlung*Medium) WITH(Zeitpunkt=24)
COMPARE(Behandlung) ADJ(BONFERRONI)
/EMMEANS=TABLES(Behandlung*Medium) WITH(Zeitpunkt=36)
COMPARE(Behandlung) ADJ(BONFERRONI).
```

Literaturverzeichnis

Adair, H. M. (1977). Epidermal repair in chronic venous ulcers. *Br J Surg* **64**, 800-4.

Agren, M. S., Steenfoss, H. H., Dabelsteen, S., Hansen, J. B. and Dabelsteen, E. (1999). Proliferation and mitogenic response to PDGF-BB of fibroblasts isolated from chronic venous leg ulcers is ulcer-age dependent. *J Invest Dermatol* **112**, 463-9.

Al-Zahrani, K. N., Baron, K. D. and Sabourin, L. A. (2013). Ste20-like kinase SLK, at the crossroads: a matter of life and death. *Cell Adh Migr* **7**, 1-10.

Anderson, J. M. (1996). Cell signaling: MAGUK magic. *Curr Biol* **6**, 382-4.

Anderson, J. M. (2001) Molecular Structure of Tight Junctions and Their Role in Epithelial Transport. *News Physiol Sci* **16**, 126-130.

Angelow, S., Ahlstrom, R. and Yu, A. S. (2008). Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F867-76.

Bäsler, K and Brandner, J. M. (2016). Tight junctions in skin inflammation. *Pflugers Arch* **469**, 3-14.

Bäsler, K., Bergmann, S., Heisig, M., Naegel, A., Zorn-Kruppa, M. and Brandner, J. M. (2016). The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *J Control Release* **242**, 105-118.

Balda, M. S., Whitney, J. A., Flores, C., González, S., Cereijido, M. and Matter, K. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* **134**, 1031-49.

Balda, M. S. and Matter, K. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J* **19**, 2024-33.

Barr, L., Berger, W. and Dewey, M. M. (1968). Electrical transmission at the nexus between smooth muscle cells. *J Gen Physiol* **51**, 347-68

Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* **16**, 585-601.

Beeman, N., Webb, P. G. and Baumgartner, H. K. (2012). Occludin is required for apoptosis when claudin-claudin interactions are disrupted. *Cell Death Dis* **3**, e273.

Blanchard, A. A., Ma, X., Dueck, K. J., Penner, C., Cooper, S. C., Mulhall, D., Murphy, L. C., Leygue, E. and Myal, Y. (2013). Claudin 1 expression in basal-like breast cancer is related to patient age. *BMC Cancer* **13**:268.

Bowman, N. N., Donahue, H. J. and Ehrlich, H. P. (1998). Gap junctional intercellular communication contributes to the contraction of rat osteoblast populated collagen lattices. *J Bone Miner Res* **13**, 1700-6.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.

Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W. W. and Moll, I. (2002). Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol* **81**, 253-63.

Brandner, J. M., Houdek, P., Hüsing, B., Kaiser, C. and Moll, I. (2004). Connexins 26, 30, and 43: differences among spontaneous, chronic, and accelerated human wound healing. *J Invest Dermatol* **122**, 1310-20.

Buchstein, N., Hoffmann, D., Smola, H., Lang, S., Paulsson, M., Niemann, C., Krieg, T. and Eming, S. A. (2009). Alternative proteolytic processing of hepatocyte growth factor during wound repair. *Am J Pathol* **174**, 2116-28.

Buschmann, M. M., Shen, L., Rajapakse, H., Raleigh, D. R., Wang, Y., Lingaraju, A., Zha, J., Abbott, E., McAuley, E. M., Breskin, L. A., Wu, L., Anderson, K., Turner, J. R. and Weber, C. R. (2013). Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol Biol Cell* **24**, 3056-68.

Chapnick, D. A. and Liu, X. (2014). Leader cell positioning drives wound-directed collective migration in TGF β -stimulated epithelial sheets. *Mol Biol Cell* **25**, 1586-93.

Chen, Y., Merzdorf, C., Paul, D. L. and Goodenough, D. A. (1997). COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *J Cell Biol* **138**, 891-9.

Cheng, T. L., Wu, Y. T., Lai, C. H., Kao, Y. C., Kuo, C. H., Liu, S. L., Hsu, Y. Y., Chen, P. K., Cho, C. F., Wang, K. C., Lin, W. L., Chang, B. I., Chen, C. M., Weiler, H., Shi, G. Y. and Wu, H. L. (2013). Thrombomodulin regulates keratinocyte differentiation and promotes wound healing. *J Invest Dermatol* **133**, 1638-45.

Cooper, D. M., Yu, E. Z., Hennessey, P., Ko, F. and Robson, M. C. (1994). Determination of endogenous cytokines in chronic wounds. *Ann Surg* **219**, 688-91.

Cullum, N., Fletcher, A., Semlyen, A. and Sheldon, T. A. (1997). Compression therapy for venous leg ulcers. *Qual Health Care* **6**, 226-31.

Cummins, P. M. (2012). Occludin: one protein, many forms. *Mol Cell Biol* **32**, 242-50.

Das Sarma, J., Wang, F. and Koval, M. (2002). Targeted gap junction protein constructs reveal connexin-specific differences in oligomerization. *J Biol Chem* **277**, 20911-8.

De Benedetto, A., Rafaels, N. M., McGirt, L. Y., Ivanov, A. I., Georas, S. N., Cheadle, C., Berger, A. E., Zhang, K., Vidyasagar, S., Yoshida, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L. C., Hanifin, J. M., Gallo, R. L., Novak, N., Weidinger, S., Beaty, T. H., Leung, D. Y., Barnes, K. C. and Beck, L. A. (2011). Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **127**, 773-86.

Deissler, H., Deissler, H., Lang, S. and Lang, G. E. (2008). VEGF-induced effects on proliferation, migration and tight junctions are restored by ranibizumab (Lucentis) in microvascular retinal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* **92**, 839-43.

Dewey, M. M. and Barr, L. (1962). Intercellular Connection between Smooth Muscle Cells: the Nexus. *Science* **137**, 670-2.

Di, W. L., Rugg, E. L., Leigh, I. M. and Kelsell, D. P. (2001). Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. *J Invest Dermatol* **117**, 958-64.

DiTommaso, T., Cottle, D. L., Pearson, H. B., Schlüter, H., Kaur, P., Humbert, P. O. and Smyth, I. M. (2014). Keratin 76 is required for tight junction function and maintenance of the skin barrier. *PLoS Genet* **10**, e1004706.

Dörfel, M. J., Westphal, J. K., Bellmann, C., Krug, S. M., Cording, J., Mittag, S., Tauber, R., Fromm, M., Blasig, I. E. and Huber, O. (2013). CK2-dependent phosphorylation of occludin regulates the interaction with ZO-proteins and tight junction integrity. *Cell Commun Signal* **11**:40.

Du, D., Xu, F., Yu, L., Zhang, C., Lu, X., Yuan, H., Huang, Q., Zhang, F., Bao, H., Jia, L., Wu, X., Zhu, X., Zhang, Z. and Chen, Z. (2010). The tight junction protein, occludin, regulates the directional migration of epithelial cells. *Dev Cell* **18**, 52-63.

Duffy, H. S., John, G. R., Lee, S. C., Brosnan, C. F. and Spray, D. C. (2000). Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. *J Neurosci* **20**, RC114.

Duffy, H. S., Delmar, M. and Spray, D. C. (2002). Formation of the gap junction nexus: binding partners for connexins. *J Physiol Paris* **96**, 243-9.

Ebner, R. and Derynck, R. (1991). Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha: differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes. *Cell Regul* **2**, 599-612.

Ehrlich, H. P. and Hunt, T. K. (2012). Collagen organization critical role in wound contraction. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **1**, 3-9.

Elizondo, R. A., Yin, Z., Lu, X. and Watsky, M. A. (2014). Effect of vitamin D receptor knockout on cornea epithelium wound healing and tight junctions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 5245-51.

Eming, S. A., Koch, M., Krieger, A., Brachvogel, B., Kreft, S., Bruckner-Tuderman, L., Krieg, T., Shannon, J. D. and Fox, J. W. (2010). Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds. *J Proteome Res* **9**, 4758-66.

Eming, S. A., Martin, P. and Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* **6**, 265sr6.

Emori, T. G. and Gaynes, R. P. (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* **6**, 428-42.

Enomoto, A., Murakami, H., Asai, N., Morone, N., Watanabe, T., Kawai, K., Murakumo, Y., Usukura, J., Kaibuchi, K. and Takahashi, M. (2005). Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell* **9**, 389-402.

Ey, B., Eyking, A., Gerken, G., Podolsky, D. K. and Cario, E. (2009). TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury. *J Biol Chem* **284**, 22332-43.

Fanning, A. S., James, B. J., Jesaitis, L. A. and Anderson, J. M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **273**, 29745-53.

Fanning, A. S. and Anderson, J. M. (2009). Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci* **1165**, 113-20.

Farkas, A. E., Capaldo, C. T. and Nusrat, A. (2012). Regulation of epithelial proliferation by tight junction proteins. *Ann N Y Acad Sci* **1258**, 115-24.

Felinski, E. A., Cox, A. E., Phillips, B. E. and Antonetti, D. A. (2008). Glucocorticoids induce transactivation of tight junction genes occludin and claudin-5 in retinal endothelial cells via a novel cis-element. *Exp Eye Res* **86**, 867-78.

Fitsialos, G., Chassot, A. A., Turchi, L., Dayem, M. A., LeBrigand, K., Moreilhon, C., Meneguzzi, G., Buscá, R., Mari, B., Barbry, P. and Ponzio, G. (2007). Transcriptional signature of epidermal keratinocytes subjected to in vitro scratch wounding reveals selective roles for ERK1/2, p38, and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *J Biol Chem* **282**, 15090-102.

Fletcher, S. J. and Rappoport, J. Z. (2010). Moving forward: polarized trafficking in cell migration. *Trends Cell Biol* **20**, 71-8.

Fletcher, S. J., Poulter, N. S., Haining, E. J. and Rappoport, J. Z. (2012). Clathrin-mediated endocytosis regulates occludin, and not focal adhesion, distribution during epithelial wound healing. *Biol Cell* **104**, 238-56.

Förster, C., Silwedel, C., Golenhofen, N., Burek, M., Kietz, S., Mankertz, J. and Drenckhahn, D. (2005). Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J Physiol* **565**, 475-86.

Fortier, A. M., Asselin, E. and Cadrin, M. (2013). Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem* **288**, 11555-71.

French, A. D., Fiori, J. L., Camilli, T. C., Leotlela, P. D., O'Connell, M. P., Frank, B. P., Subaran, S., Indig, F. E., Taub, D. D. and Weeraratna, A. T. (2009). *Int J Med Sci* **6**, 93-101.

Fritsch, P. (1998). *Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas, 2. Auflage.* Springer Verlag.

Fujita, H., Chalubinski, M., Rhyner, C., Indermitte, P., Meyer, N., Ferstl, R., Treis, A., Gomez, E., Akkaya, A., O'Mahony, L., Akdis, M. and Akdis, C. A. (2011). Claudin-1 expression in airway smooth muscle exacerbates airway remodeling in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* **127**, 1612-21.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **126**, 1777-88.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* **141**, 1539-50.

Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. and Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* **156**, 1099-111.

Galkowska, H., Wojewodzka, U. and Olszewski, W. L. (2006). Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen* **14**, 558-65.

Garg, S., Md Syed, M. and Kielian, T. (2005). *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan induces Cx43 expression and functional gap junction intercellular communication in microglia. *J Neurochem* **95**, 475-83.

Gebäck, T., Schulz, M. M. P., Koumoutsakos, P. and Detmar, M. (2009). TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Bio Techniques* **46**, 265-74.

Gibbs, S., Silva Pinto, A. N., Murli, S., Huber, M., Hohl, D. and Ponec, M. (2000). Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair Regen* **8**, 192-203.

Goldberg, G. S., Valiunas, V. and Brink, P. R. (2004). Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* **1662**, 96-101.

Goliger, J. A. and Paul, D. L. (1995). Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol Biol Cell* **6**, 1491-501.

Goren, I., Müller, E., Schiefelbein, D., Gutwein, P., Seitz, O., Pfeilschifter, J. and Frank, S. (2009). Akt1 controls insulin-driven VEGF biosynthesis from keratinocytes: implications for normal and diabetes-impaired skin repair in mice. *J Invest Dermatol* **129**, 752-64.

Grande-García, A., Echarri, A., de Rooij, J., Alderson, N. B., Waterman-Storer, C. M., Valdivielso, J. M. and del Pozo, M. A. (2007). Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol* **177**, 683-94.

Grose, R. and Werner, S. (2004). Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol Biotechnol* **28**, 147-66.

Gruber, R., Börnchen, C., Rose, K., Daubmann, A., Volksdorf, T., Wladykowski, E., Vidal-Y-Sy, S., Peters, E. M., Danso, M., Bouwstra, J. A., Hennies, H. C., Moll, I., Schmuth, M. and Brandner, J. M. (2015). Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis. *Am J Pathol* **185**, 2777-89.

Günzel, D. and Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* **93**, 525-69.

Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, **453**, 314–21.

Haase, I., Evans, R., Pofahl, R. and Watt, F. M. (2003). Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signaling pathways. *J Cell Sci* **116**, 3227-38.

Harke, N., Leers, J., Kietz, S., Drenckhahn, D. and Förster, C. (2008). Glucocorticoids regulate the human occludin gene through a single imperfect palindromic glucocorticoid response element. *Mol Cell Endocrinol* **295**, 39-47.

Harris, H. J., Davis, C., Mullins, J. G., Hu, K., Goodall, M., Farguhar, M. J., Mee, C. J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., Balfe, P. and McKeating, J. A. (2010). *J Biol Chem* **285**, 21092-102.

Hervé, J. C., Derangeon, M., Sarrouilhe, D. and Bourmeyster, N. (2014). Influence of the scaffolding protein Zonula Occludens (ZO) on membrane channels. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 595-604.

Hill, M. M., Daud, N. H., Aung, C. S., Loo, D., Martin, S., Murphy, S., Black, D. M., Barry, R., Simpson, F., Liu, L., Pilch, P. F., Hancock, J. F., Parat, M. O. and Parton, R. G. (2012). Co-regulation of cell polarization and migration by caveolar proteins PTRF/Cavin-1 and caveolin-1. *PLoS One* **7**, e43041, Epub.

Hirashima, T., Hosokawa, Y., Iino, T. and Nagayama, M. (2013). On fundamental cellular processes for emergence of collective epithelial movement. *Biol Open* **2**, 660-6.

Holt, D. R., Kirk, S. J., Regan, M. C., Hurson, M., Lindblad, W. J. and Barbul, A. (1992). Effect of age on wound healing in healthy human beings. *Surgery* **112**, 239-7.

Hossini, A. M., Quast, A. S., Plötz, M., Grauel, K., Exner, T., Kuchler, J., Stachelscheid, H., Eberle, J., Rabien, A., Makrantonaki, E. and Zouboulis, C. C. (2016). PI3K/AKT signaling pathway is essential for survival of induced pluripotent stem cells. *PLoS One* **11**, e0154770.

Houben, E., De Paepe, K. and Rogiers, V. (2007). A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol Physiol* **20**, 122-32.

Huang, J., Zhang, L., He, C., Qu, Y., Li, J., Zhang, J., Du, T., Chen, X., Yu, Y., Liu, B. and Zhu, Z. (2015). Claudin-1 enhances tumor proliferation and metastasis by regulating cell anoikis in gastric cancer. *Oncotarget* **6**, 1652-65.

Huang, C., Liao, R., Wang, F. and Tang, S. (2016). Characteristics of Reconstituted Tight Junctions After Corneal Epithelial Wounds and Ultrastructure Alterations of Corneas in Type 2 Diabetic Rats. *Curr Eye Res* **41**, 783-90.

Hunter, A. W., Barker, R. J., Zhu, C. and Gourdie, R. G. (2005). Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol Biol Cell* **16**, 5686-98.

Ichikawa-Tomikawa, N., Sugimoto, K., Satohisa, S., Nishiura, K. and Chiba, H. (2011). Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. *J Biomed Biotechnol* 2011:253048.

Ikari, A., Takiguchi, A., Atomi, K., Sato, T. and Sugatani, J. (2011). Decrease in claudin-2 expression enhances cell migration in renal epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Physiol* **226**, 1471-8.

Ikari, A., Watanabe, R., Sato, T., Taga, S., Shimobaba, S., Yamaguchi, M., Yamazaki, Y., Endo, S., Matsunaga, T. and Sugatani, J. (2014). Nuclear distribution of claudin-2 increases cell proliferation in human lung adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 2079-88.

Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2008). Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* **19**, 4687-93.

Jackson, B., Peyrollier, K., Pedersen, E., Basse, A., Karlsson, R., Wang, Z., Lefever, T., Ochsenbein, A. M., Schmidt, G., Aktories, K., Stanley, A., Quondamatteo, F., Ladwein, M., Rottner, K., van Hengel, J. and Brakebusch, C. (2011). RhoA is dispensable for skin development, but crucial for contraction and directed migration of keratinocytes. *Mol Biol Cell* **22**, 593-605.

Jian, Y., Chen, C., Li, B. and Tian, X. (2015). Delocalized claudin-1 promotes metastasis of human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **466**, 356-61.

Jones, P. H., Harper, S. and Watt, F. M. (1995). Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* **80**, 83-93.

Jung, E. G. (1995). *Dermatologie - Duale Reihe* (3. Auflage). Hippokrates Verlag Stuttgart.

Jung, K., Covington, S., Sen, C. K., Januszyk, M., Kirsner, R. S., Gurtner, G. C. and Shah, N. H. (2016). Rapid identification of slow healing wounds. *Wound Repair Regen* **24**, 181-8.

Junttila, M. R., Li, S. P. and Westermarck, J. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* **22**, 954-65.

Kim, D., Kim, S., Koh, H., Yoon, S. O., Chung, A. S., Cho, K. S. and Chung, J. (2001). Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J* **15**, 1953-62.

Kirschner, N., Poetzl, C., von den Driesch, P., Wladykowski, E., Moll, I., Behne, M. J. and Brandner, J. M. (2009). Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol* **175**, 1095-106.

Kirschner, N., Houdek, P., Fromm, M., Moll, I. and Brandner, J. M. (2010). Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol* **89**, 839-42.

Kirschner, N., Haftek, M., Niessen, C. M., Behne, M. J., Furuse, M., Moll, I. and Brandner, J. M. (2011). CD44 regulates tight-junction assembly and barrier function. *J Invest Dermatol* **131**, 932-43.

Kirschner, N., Rosenthal, R., Furuse, M., Moll, I., Fromm, M. and Brandner, J. M. (2013). Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J Invest Dermatol* **133**, 1161-9.

Klemke, R. L., Cai, S., Giannini, A. L., Gallagher, P. J., de Lanerolle, P. and Cheresch, D. A. (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* **137**, 481-92.

Kloos, W. E. (1980). Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol* **34**, 559-92.

Kojima, T., Kokai, Y., Chiba, H., Yamamoto, M., Mochizuki, Y. and Sawada, N. (2001). Cx32 but not Cx26 is associated with tight junctions in primary cultures of rat hepatocytes. *Exp Cell Res* **263**, 193-201.

Kojima, T., Spray, D. C., Kokai, Y., Chiba, H., Mochizuki, Y. and Sawada, N. (2002). Cx32 formation and/or Cx32-mediated intercellular communication induces expression and function of tight junctions in hepatocytic cell line. *Exp Cell Res* **276**, 40-51.

Kojima, T., Murata, M., Go, M., Spray, D. C. and Sawada, N. (2007). Connexins induce and maintain tight junctions in epithelial cells. *J Membr Biol* **217**, 13-9.

Krause, G., Protze, J. and Piontek, J. (2015). Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Semin Cell Dev Biol* **42**, 3-12.

Kuhn, S., Koch, M., Nübel, T., Ladwein, M., Antolovic, D., Klingbeil, P., Hildebrand, D., Moldenhauer, G., Langbein, L., Franke, W. W., Weitz, J. and Zöller, M. (2007). A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* **5**, 553-67.

Kwak, B. R., Pepper, M. S., Gros, D. B. and Meda, P. (2001). Inhibition of endothelial wound repair by dominant negative connexin inhibitors. *Mol Biol Cell* **12**, 831-45.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

Laird, D. W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* **394**, 527-43.

Lal-Nag, M. and Morin, P. J. (2009). The claudins. *Genome Biol* **10**, 235.

Lamb, R. and Ambler, C. A. (2013). Keratinocytes propagated in serum-free, feeder-free culture conditions fail to form stratified epidermis in a reconstituted skin model. *PLoS One* **8**, e52494.

Lampe, P. D. and Lau, A. F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1171-86.

Lazarus, G. S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Percoraro, R. E., Rodeheaver, G. and Robson, M. C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair Regen* **2**, 165-70.

Lee, B., Vouthounis, C., Stojadinovic, O., Brem, H., Im, M. and Tomic-Canic, M. (2005). From an enhanceosome to a repressosome: molecular antagonism between glucocorticoids and EGF leads to inhibition of wound healing. *J Mol Biol* **345**, 1083-97.

Lee, S. H., Zahoor, M., Hwang, J. K., Min do, S. and Choi, K. Y. (2012). Valproic acid induces cutaneous wound healing in vivo and enhances keratinocyte motility. *PLoS One* **7**, e48791.

Lee, S. H., Paek, A. R., Yoon, K., Kim, S. H., Lee, S. Y. and You, H. J. (2015). Tight junction protein 1 is regulated by transforming growth factor- β and contributes to cell motility in NSCLC cells. *BMB Rep* **48**, 115-20.

Lentfer, J. S. (2012). Regulation von Tight Junction Proteinen in der kutanen Wundheilung. Dissertation, Universität Hamburg.

Li, W., Henry, G., Fan, J., Bandyopadhyay, B., Pang, K., Garner, W., Chen, M. and Woodley, D. T. (2004). Signals that initiate, augment, and provide directionality for human keratinocyte motility. *J Invest Dermatol* **123**, 622-33.

Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., Carte, J., Chen, W., Roark, N., Ranganathan, S., Ravinder, N. and Chesnut, J. D. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol* **208**, 44-53.

Lin, J. H., Takano, T., Cotrina, M. L., Arcuino, G., Kang, J., Liu, S., Gao, Q., Jiang, L., Li, F., Lichtenberg-Frate, H., Haubrich, S., Willecke, K., Goldman, S. A. and Nedergaard, M. (2002). Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J Neurosci* **22**, 4302-11.

Lin, J. H.-C., Yang, J., Liu, S., Takano, T., Wang, X., Gao, Q., Willecke, K. and Nedergaard, M. (2003). Connexin Mediates Gap Junction-Independent Resistance to Cellular Injury. *J Neurosci* **23**, 430-41.

Lingaraju, A., Long, T. M., Wang, Y., Austin, J. R. 2nd and Turner, J. R. (2015). Conceptual barriers to understanding physical barriers. *Semin Cell Dev Biol* **42**, 13-21.

Lisby, S. and Hauser, C. (2002). Transcriptional regulation of tumor necrosis factor-alpha in keratinocytes mediated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Exp Dermatol* **11**, 592-8.

Liu, Q. and Hofmann, P. A. (2004). Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H2204-12.

Liu, Y., Petreaca, M., Yao, M. and Martins-Green, M. (2009). Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. *BMC Cell Biol* **10**:1.

Liu, Y., Chen, J. Y., Shang, H. T., Liu, C. E., Wang, Y., Niu, R., Wu, J. and Wie, H. (2010). Light microscopic, electron microscopic, and immunohistochemical comparison of Bama minipig (*sus scrofa domestica*) and human skin. *Comp Med* **60**, 142-8.

Loots, M. A., Lamme, E. N., Zeegelaar, J., Mekkes, J. R., Bos, J. D. and Middelkoop, E. (1998). Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* **111**, 850-7.

Lucke, T., Choudhry, R., Thom, R., Selmer, I. S., Burden, A. D. and Hodgins, M. B. (1999). Upregulation of connexin 26 is a feature of keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis, vaginal epithelium, and buccal epithelium. *J Invest Dermatol* **112**, 354-61.

Luo, X., Jin, R., Wang, F., Jia, B., Luan, K., Cheng, F. W., Li, L., Sun, L. D., Yang, S., Zhang, S. Q. and Zhang, X. J. (2016). Interleukin-15 inhibits the expression of differentiation markers induced by Ca(2+) in keratinocytes. *Exp Dermatol* **25**, 544-7.

Ma, X., Fan, P. X., Li, L. S., Qiao, S. Y., Zhang, G. L. and Li, D. F. (2012). Butyrate promotes the recovering of intestinal wound healing through its positive effect on the tight junctions. *J Anim Sci* **90** S4, 266-8.

Malminen, M., Koivukangas, V., Peltonen, J., Karvonen, S. L., Oikarinen, A. and Peltonen, S. (2003). Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis. *Br J Dermatol* **149**, 255-60.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1989). Molecular cloning, A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Marchiando, A. M., Shen, L., Graham, W. V., Weber, C. R., Schwarz, B. T., Austin, J. R. 2nd, Raleigh, D. R., Guan, Y., Watson, A. J., Montrose, M. H. and Turner, J. R. (2010). Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol* **189**, 111-26.

Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75-81.

Martin, F. J. and Prince, A. S. (2008). TLR2 regulates gap junction intercellular communication in airway cells. *J Immunol* **180**, 4986-93.

Martin, T. A., Jordan, N., Davies, E. L. and Jiang, W. G. (2016). Metastasis to bone in human cancer is associated with loss of occludin expression. *Anticancer Res* **36**, 1287-93.

Matsubayashi, Y., Ebisuya, M., Honjoh, S. and Nishida, E. (2004). ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing. *Curr Biol* **14**, 731-5.

Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A. and Balda, M. S. (2005). Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 453-8.

MDI GmbH, (2012). Bessere Behandlungserfolge bei chronischen Wunden dringend geboten // Ärzte und Pfleger verlangen wirksame und bezahlbare Therapeutika für Patienten: weniger Amputationen und bessere Lebensqualität. Pressemitteilung vom 02.02.2012, URL: <http://www.presseportal.de/pm/79730/2191834> (Stand: 21.07.2016)

Mendez, M. V., Stanley, A., Park, H. Y., Shon, K., Phillips, T. and Menzoian, J. O. (1998). Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg* **28**, 876-83.

Mendez, M. V., Raffetto, J. D., Phillips, T., Menzoian, J. O. and Park, H. Y. (1999). The proliferative capacity of neonatal skin fibroblasts is reduced after exposure to venous ulcer wound fluid: A potential mechanism for senescence in venous ulcers. *J Vasc Surg* **30**, 734-43.

Mese, G., Richard, G., and White, T. W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, **127**, 2516–24.

Meyer, W. (1996). Bemerkungen zur Eignung der Schweinehaut als biologisches Modell für die Haut des Menschen. *Hautarzt* **47**, 178-82.

Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K. and Tsukita, S. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* **585**, 606-12.

Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T. and Taxman, D. J. (2010). Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol* **629**, 141-58.

Mori, R., Power, K. T., Wang, C. M., Martin, P., and Becker, D. L. (2006). Acute downregulation of connexin43 at wound sites leads to a reduced inflammatory response, enhanced keratinocyte proliferation and wound fibroblast migration. *J Cell Sci*, **119**, 5193–203.

Morita, K., Itoh, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Furuse, M., Yoneda, K., Imamura, S., Fujimoto, K. and Tsukita, S. (1998). Subcellular distribution of tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, ZO-2) in rodent skin. *J Invest Dermatol* **110**, 862-6.

Morita, K., Tsukita, S. and Miyachi, Y. (2004). Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. *Br J Dermatol* **151**, 328-34.

Moule, A. J., Li, H. and Bartold, P. M. (1995). Donor variability in the proliferation of human dental pulp fibroblasts. *Aust Dent J* **40**, 110-4.

Moyer, K. E., Davis, A., Siggers, G. C., Mackay, D. R. and Ehrlich, H. P. (2002). Wound healing: the role of gap junctional communication in rat granulation tissue maturation. *Exp Mol Pathol* **72**, 10-6.

Murakami, T., Felinski, E. A. and Antonetti, D. A. (2009). Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J Biol Chem* **284**, 21036-46.

Murata, M., Kojima, T., Yamamoto, T., Go, M., Takano, K., Osanai, M., Chiba, H. and Sawada, N. (2005). Down-regulation of survival signaling through MAPK and Akt in occludin-deficient mouse hepatocytes in vitro. *Exp Cell Res* **310**, 140-51.

Mustoe, T. (2004). Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am J Surg* **187**, 65S-70S.

Nagasawa, K., Chiba, H., Fujita, H., Kojima, T., Saito, T., Endo, T. and Sawada, N. (2006). Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *J Cell Physiol* **208**, 123-32.

Nguyen, D. H., Catling, A. D., Webb, D. J., Sankovic, M., Walker, L. A., Somiyo, A. V., Weber, M. J. and Gonias, S. L. (1999). Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol* **146**, 149-64.

Nunan, R., Campbell, J., Mori, R., Pitulescu, M. E., Jiang, W. G., Harding, K. G., Adams, R. H., Nobes, C. D. and Martin, P. (2015). Ephrin-Bs drive junctional downregulation and actin stress fiber disassembly to enable wound re-epithelialization. *Cell Rep* **13**, 1380-95.

Nusrat, A., Chen, J. A., Foley, C. S., Liang, T. W., Tom, J., Cromwell, M., Quan, C. and Mrsny, R. J. (2000). The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* **275**, 29816-22.

O'Keefe, E. J., Briggaman, R. A. and Herman, B. Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes. *J Cell Biol* **105**, 807-17.

Ongenaes, K. C., Phillips, T. J. and Park, H. Y. (2000). Level of fibronectin mRNA is markedly increased in human chronic wounds. *Dermatol Surg* **26**, 447-51.

O'Quinn, M. P., Palatinus, J. A., Harris, B. S., Hewett, K. W., Gourdie, R. G. (2001). A peptide mimetic of the connexin43 carboxyl terminus reduces gap junction remodeling and induced arrhythmia following ventricular injury. *Circ Res* **108**, 704-15.

Pankow, S., Bamberger, C., Klippel, A. and Werner, S. (2006). Regulation of epidermal homeostasis and repair by phosphoinositide 3-kinase. *J Cell Sci* **119**, 4033-46.

Panuncialman, J. and Falanga, V. (2010). Unusual causes of cutaneous ulceration. *Surg Clin North Am* **90**, 1161-80.

Pastar, I., Stojadinovic, O., Krzyzanowska, A., Barrientos, S., Stuelten, C., Zimmermann, K., Blumenberg, M., Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2010). Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers. *Mol Med* **16**, 92-101.

Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., Patel, S. B., Khalid, L., Isseroff, R. R. and Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **3**, 445-464.

Pearson, R. A., Dale, N., Llaudet, E. and Mobbs, P. (2005). ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* **46**, 731-44.

Peckham, M., Knibbs, A. and Paxton, S. (2003). Layers in the epidermis. in: *Histology Guide*. URL: www.histology.leeds.ac.uk/skin/epidermis_layers.php (Stand: 10.06.2016)

Pelletier, D. B. and Boynton, A. L. (1994). Dissociation of PDGF receptor tyrosine kinase activity from PDGF-mediated inhibition of gap junctional communication. *J Cell Physiol* **158**, 427-34.

Peplow, P. V. and Chatterjee, M. P. (2013). A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. *Cytokine* **62**, 1-21.

Phillips, S. J. (2000). Physiology of wound healing and surgical wound care. *ASAIO J* **46**, S2-5.

Plog, S., Mundhenk, L., Bothe, M. K., Klymiuk, N. and Gruber, A. D. (2010). Tissue and cellular expression patterns of porcine CFTR: similarities to and differences from human CFTR. *J Histochem Cytochem* **58**, 785-97.

Pollok, S., Pfeiffer, A. C., Lobmann, R., Wright, C. S., Moll, I., Martin, P. E. and Brandner, J. M. (2011). Connexin 43 mimetic peptide Gap27 reveals potential differences in the role of Cx43 in wound repair between diabetic and non-diabetic cells. *J Cell Mol Med* **15**, 861-73.

Proksch, E., Fölster-Holst, R. and Jensen, J. M. (2006). Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci* **43**, 159-69.

Proksch, E., Brandner, J. M. and Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* **17**, 1063-72.

Pukstad, B. S., Ryan, L., Flo, T. H., Stenvik, J., Moseley, R., Harding, K., Thomas, D. W. and Espevik, T. (2010). Non-healing is associated with persistent stimulation of the innate immune response in chronic venous leg ulcers. *J Dermatol Sci* **59**, 115-22.

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

Rachow, S., Zorn-Kruppa, M., Ohnemus, U., Kirschner, N., Vidal-y-Sy, S., von den Driesch, P., Börnchen, C., Eberle, J., Mildner, M., Vettorazzi, E., Rosenthal, R., Moll, I. and Brandner, J. M. (2013). Occludin is involved in adhesion, apoptosis, differentiation and Ca²⁺-homeostasis of human keratinocytes: implications for tumorigenesis. *PLoS One* **8**, e55116.

Rangel, L. B., Agarwal, R., D'Souza, T., Pizer, E. S., Alò, P. L., Lancaster, W. D., Gregoire, L., Schwartz, D. R., Cho, K. R. and Morin, P. J. (2003). Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res* **9**, 2567-75.

Rees, R. S., Robson, M. C., Smiell, J. M. and Perry, B. H. (1999). Becaplermin gel in the treatment of pressure ulcers: a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Wound Repair Regen* **7**, 141-7.

Ren, Y., Wu, Q., Liu, Y., Xu, X. and Quan, C. (2013). Gene silencing of claudin-6 enhances cell proliferation and migration accompanied with increased MMP-2 activity via p38 MAPK signaling pathway in human breast epithelium cell line HBL-100. *Mol Med Rep* **8**, 1505-10.

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

Rittié, L. (2016). Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *J Cell Commun Signal* **10**, 103-20.

Rohani, M. G. and Parks, W. C. (2015). Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol* **44-46**, 113-21.

Rudi, A. (2012). Der Einfluss von ZO-1 auf das Aktinzytoskelett in Melanomzellen und Spindelzellkarzinomzellen. Masterarbeit, Universität Hamburg.

Runkle, E. A., Sundstrom, J. M., Runkle, K. B., Liu, X. and Antonetti, D. A. (2011). Occludin localizes to centrosomes and modifies mitotic entry. *J Biol Chem* **286**, 30847-58.

Ryan, G. B., Cliff, W. J., Gabbiani, G., Irlé, C., Montandon, D., Statkov, P. R. and Majno, G. (1974). Myofibroblasts in human granulation tissue. *Hum Pathol* **5**, 55-67.

Safferling, K., Sütterlin, T., Westphal, K., Ernst, C., Breuhahn, K., James, M., Jäger, D., Halama, N. and Grabe, N. (2013). Wound healing revised: a novel reepithelialization mechanism revealed by in vitro and in silico models. *J Cell Biol* **203**, 691-709.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.-D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occluding, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* **11**, 4131-42.

Schaberg, D. R. and Zervos, M. J. (1986). Intergenic and interspecies gene exchange in Gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* **30**, 817-22.

- Schlaak, J. F., Hilkens, C. M., Costa-Pereira, A. P., Strobl, B., Aberger, F., Frischauf, A. M. and Kerr, I. M. (2002). Cell-type and donor-specific transcriptional responses to interferon-alpha. Use of customized gene arrays. *J Biol Chem* **277**, 49428-37.
- Schneeberger, E. E. and Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C1213-28.
- Schricks, J. A. (2006). ABC-transporters in the pig. Ph.D. thesis; Veterinary Pharmacology, Pharmacy and Toxicology (Utrecht University, Utrecht), 93-110.
- Seaton, M., Hocking, A. and Gibran, N. S. (2015). Porcine models of cutaneous wound healing. *ILAR J* **56**, 127-38.
- Sevilla, L. M., Latorre, V., Sanchis, A. and Pérez, P. (2013). Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* **133**, 361-70.
- Sekiyama, A., Gon, Y., Terakado, M., Takeshita, I., Kozu, Y., Maruoka, S., Matsumoto, K. and Hashimoto, S. (2012). Glucocorticoids enhance airway epithelial barrier integrity. *Int Immunopharmacol* **12**, 350-7.
- Shah, J. M., Omar, E., Pai, D. R. and Sood, S. (2012). Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian J Plast Surg* **45**, 220-8.
- Sharma, G. D., He, J. and Bazan, H. E. (2003). p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem* **278**, 21989-97.
- Sheperd, J., Douglas, I., Rimmer, S., Swanson, L. and MacNeil, S. (2009). *Tissue Eng Part C Methods* **15**, 475-84.
- Shi, F. and Sottile, J. (2008). Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. *J Cell Sci* **121**, 2360-71.
- Shiozaki, A., Bai, X. H., Shen-Tu, G., Moodley, S., Takeshita, H., Fung, S. Y., Wang, Y., Keshavjee, S. and Liu, M. (2012). Claudin 1 mediates TNF α -induced gene expression and cell migration in human lung carcinoma cells. *PLoS One* **7**, e38049.

Sibbald, M. J., Ziebandt, A. K., Engelmann, S., Hecker, M., de Jong, A., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., Stokroos, I., Arends, J. P., Dubois, J. Y. and van Dijk, J. M. (2006). Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol* **70**, 755-88.

Simpson, I., Rose, B. and Loewenstein, W. R. (1977). Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* **195**, 294-6.

Singer, A. J. and Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, **341**, 738-46.

Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S. and Goodenough, D. A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* **103**, 755-66.

Stoddart, M. J., Richards, R. G. and Alini, M. (2012). In vitro experiments with primary mammalian cells: to pool or not to pool? *Eur Cell Mater* **24**, i-ii.

Stojadinovic, O., Pastar, I., Vukelic, S., Mahoney, M. G., Brennan, D., Krzyzanowska, A., Golinko, M., Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2008). Deregulation of keratinocyte differentiation and activation: a hallmark of venous ulcers. *J Cell Mol Med* **12**, 2675-90.

Stoll, S. W., Kansra, S. and Elder, J. T. (2003). Keratinocyte outgrowth from human skin explants cultures is dependent upon p38 signaling. *Wound Repair Regen* **11**, 346-53.

Streit, M., Beleznyay, Z. and Braathen, L. R. (2006). Topical application of the tumour necrosis factor- α antibody infliximab improves healing of chronic wounds. *Int Wound J* **3**, 171-9.

Sugawara, T., Iwamoto, N., Akashi, M., Kojima, T., Hisatsune, J., Sugai, M. and Furuse, M. (2013). Tight junction dysfunction in the Stratum granulosum leads to aberrant Stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *J Dermatol Sci* **70**, 12-8.

Sullivan, T. P., Eaglstein, W. H., Davis, S. C. and Mertz, P. (2001). The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* **9**, 66-76.

Tabariès, S., Dupuy, F., Dong, Z., Monast, A., Annis, M. G., Spicer, J., Ferri, L. E., Omeroglu, A., Basik, M., Amir, E., Clemons, M. and Siegel, P. M. (2012). Claudin-2 promotes breast cancer liver metastasis by facilitating tumor cell interactions with hepatocytes. *Mol Cell Biol* **32**, 2979-91.

Tanaka, M., Kamata, R. and Sakai, R. (2005). Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contact formation. *EMBO J* **24**, 3700-11.

Tarnuzzer, R. W. and Schultz, G. S. (1996). Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* **4**, 321-5.

Thévenin, A. F., Kowal, T. J., Fong, J. T., Kells, R. M., Fisher, C. G. and Falk, M. M. (2013). Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation. *Physiology (Bethesda)* **28**, 93-116.

Todaro, G. J., De Larco, J. E., Fryling, C., Johnson, P. A. and Sporn, M. B. (1981). Transforming growth factors (TGFs): properties and possible mechanisms of action. *J Supramol Struct Cell Biochem* **15**, 287-301.

Tokumasu, R., Yamaga, K., Yamazaki, Y., Murota, H., Suzuki, K., Tamura, A., Bando, K., Furuta, Y., Katayama, I. and Tsukita, S. (2016). Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, E4061-8.

Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L. O., Conway, D. E., Randi, A. M., Schwartz, M. A., Matter, K. and Balda, M. S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol* **208**, 821-38.

Tran, Q. T., Kennedy, L. H., Leon Carrion, S., Bodreddigari, S., Goodwin, S. B., Sutter, C. H. and Sutter, T. R. (2012). EGFR regulation of epidermal barrier function. *Physiol Genomics* **44**, 455-69.

Trengove, N. J., Stacey, M. C., MacAuley, S., Bennett, N., Gibson, J., Burslem, F., Murphy, G. and Schultz, G. (1999). Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* **7**, 442-52.

Trengove, N. J., Bielefeldt-Ohmann, H. and Stacey, M. C. (2000). Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen* **8**, 13-25.

Tummler, B. and Kiewitz, C. (1999). Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol Med Today* **5**, 351-8.

Tunggal, J. A., Helfrich, I., Schmitz, A., Schwarz, H., Günzel, D., Fromm, M., Kemler, R., Krieg, T. and Niessen, C. M. (2005). E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J* **24**, 1146-56.

Tuomi, S., Mai, A., Nevo, J., Laine, J. O., Vilkki, V., Ohman, T. J., Gahmberg, C. G., Parker, P. J. and Ivaska, J. (2009). PKCepsilon regulation of an alpha5 integrin-ZO-1 complex controls lamellae formation in migrating cancer cells. *Sci Signal* **2**, ra32.

Turchi, L., Chassot, A. A., Bourget, I., Baldescchi, C., Ortonne, J. P., Meneguzzi, G., Lemichez, E. and Ponzio, G. (2003). Cross-talk between RhoGTPases and stress activated kinases for matrix metalloproteinase-9 induction in response to keratinocytes injury. *J Invest Dermatol* **121**, 1291-300.

Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* **126**, 741-54.

Van Itallie, C. M. and Anderson, J. M. (1997). Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J Cell Sci* **110**, 1113-21.

Van Itallie, C. M., Fanning, A. S., Holmes, J. and Anderson, J. M. (2010). Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell Sci* **123**, 2844-52.

Van Itallie, C. M., Aponte, A., Tietgens, A. J., Gucek, M., Fredriksson, K. and Anderson, J. M. (2013). The N and C termini of ZO-1 are surrounded by distinct proteins and functional protein networks. *J Biol Chem* **288**, 13775-88.

Van Itallie, C. M. and Anderson, J. M. (2013). Claudin interactions in and out of the tight junction. *Tissue Barriers* **1**, e25247.

Vedula, S. R., Leong, M. C., Lai, T. L., Hersen, P., Kabla, A. J., Lim, C. T. and Ladoux, B. (2012). Emerging modes of collective cell migration induced by geometrical constraints. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 12974-9.

Vukelic, S., Stojadinovic, O., Pastar, I., Rabach, M., Krzyzanowska, A., Lebrun, E., Davis, S. C., Resnik, S., Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2011). Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. *J Biol Chem* **286**, 10265-75.

Wachtel, M., Frei, K., Ehler, E., Fontana, A., Winterhalter, K. and Gloor, S. M. (1999). Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition. *J Cell Sci* **112**, 4347-56.

Webb, P. G., Spillman, M. A. and Baumgartner, H. K. (2013). Claudins play a role in normal and tumor cell motility. *BMC Cell Biol* **14**:19.

Widgerow, A. D. (2013). Chronic wounds – is cellular ‘reception’ at fault? Examining integrins and intracellular signaling. *Int Wound J* **10**, 185-92.

Wieczorek, L., Brown, B. K., Delsarto Macedo, C., Wesberry-Schmierer, M., Ngauy, V., Rosa Borges, A., Michael, N. L., Marovich, M. A., Montefiori, D. C. and Polonis, V. R. (2013). Mitigation of variation observed in a peripheral blood mononuclear cell (PBMC) based HIV-1 neutralization assay by donor cell pooling. *Virology* **447**, 240-8.

Wiegand, C., Schönfelder, U., Abel, M., Ruth, P., Kaatz, M. and Hipler, U. C. (2010). Protease and pro-inflammatory cytokine concentrations are elevated in chronic compared to acute wounds and can be modulated by collagen type I in vitro. *Arch Dermatol Res* **302**, 419-28.

Wikramanayake, T. C., Stojadinovic, O. and Tomic-Canic, M. (2014). Epidermal differentiation in barrier maintenance and wound healing. *Adv Wound Care* **3**, 272-280.

Winter, G. D. and Scales, J. T. (1963). Effect of air drying and dressings on the surface of a wound. *Nature* **197**, 91-2.

Wong, V. (1997). Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. *Am J Physiol* **273**, C1859-67.

Wysocki, A. B., Staiano-Coico, L. and Grinnell, F. (1993). Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* **101**, 64-8.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. and Greenberg, M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**, 1326-31.

Xia, Y. P., Zhao, Y., Tyrone, J. W., Chen, A. and Mustoe, T. A. (2001). Differential activation of migration by hypoxia in keratinocytes isolated from donors of increasing age: implication for chronic wounds in the elderly. *J Invest Dermatol* **116**, 50-6.

Yager, D. R., Zhang, L. Y., Liang, H. X., Diegelmann, R. F. and Cohen, I. K. (1996). Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* **107**, 743-8.

Yamamoto, T., Kojima, T., Murata, M., Takano, K., Go, M., Chiba, H. and Sawada, N. (2004). IL-1beta regulates expression of Cx32, occludin, and claudin-2 of rat hepatocytes via distinct signal transduction pathways. *Exp Cell Res* **299**, 427-41.

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

Yuki, T., Haratake, A., Koishikawa, H., Morita, K., Miyachi, Y. and Inoue, S. (2007). Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Exp Dermatol* **16**, 324-30.

Zahler, S., Hoffmann, A., Gloe, T. and Pohl, U. (2003). Gap-junctional coupling between neutrophils and endothelial cells: a novel modulator of transendothelial migration. *J Leukoc Biol* **73**, 118-26.

Zare, S., Zarei, M. A., Ghadimi, T., Fathi, F., Jalili, A. and Hakhamaneshi, M. S. (2014). Isolation, cultivation and transfection of human keratinocytes. *Cell Biol Int* **38**, 444-51.

Zhang, Z. and Monteiro-Riviere, N. A. (1997). Comparison of integrins in human skin, pig skin, and perfused skin: an in vitro skin toxicology model. *J Appl Toxicol* **17**, 247-53.

Zhao, B., Liu, J. Q., Zheng, Z., Zhang, J., Wang, S. Y., Han, S. C., Zhou, Q., Guan, H., Li, C., Su, L. L. and Hu, D. H. (2016). Human amniotic epithelial stem cells promote wound healing by facilitating migration and proliferation of keratinocytes via ERK, JNK and AKT signaling pathways. *Cell Tissue Res* **365**, 85-99.

Zimmer, D. B., Green, C. R., Evans, W. H. and Gilula, N. B. (1987). Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures. *J Biol Chem* **262**, 7751–63.

Zorn-Kruppa, M., Volksdorf, T., Ueck, C., Zöller, E., Reinshagen, K., Ridderbusch, I., Bruning, G., Houdek, P., Moll, I. and Brandner, J. M. (2016). Major cell biological parameters of keratinocytes are predetermined by culture medium and donor source. *Exp Dermatol* **25**, 242-4.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Johanna Brandner für die Bereitstellung des interessanten Themas und die stets engagierte, freundschaftliche Betreuung bedanken. Die ständige Ansprechbarkeit und das entgegengebrachte Vertrauen in die eigene Arbeit, verbunden mit konstruktiver Kritik, erlaubten mir, in ihrem Labor das selbstständige wissenschaftliche Arbeiten zu erlernen. Zudem möchte ich mich auch für die Möglichkeit zur Teilnahme an vielen spannenden Konferenzen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jörg Ganzhorn danke ich ganz herzlich für die Zweitbetreuung seitens des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg.

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

Ebenfalls danke ich allen Mitarbeitern des Zellbiologischen Labors der Klinik für Dermatologie und Venerologie für die herzliche Aufnahme, das entspannte, freundschaftliche Arbeitsklima, die unkomplizierte Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen, Nachfragen und Hilfestellungen. Mein besonderer Dank gilt den technischen Assistentinnen des Labors Sabine Vidal-y-Sy, Pia Houdek und Ewa Wladykowski, die mir nicht nur während meiner Anfangszeit stets hilfsbereit und freundlich mit all ihrer Erfahrung zur Seite standen, um die Arbeit im Labor zu meistern.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, besonders meinen Eltern und Großeltern, bedanken, die meine Promotion mit großer Ausdauer und Verständnis begleitet haben und mich stets auf jede ihnen mögliche Art unterstützten. Ebenso geht mein Dank an Julia, die es immer verstand, mich in den passenden Momenten abzulenken und zu motivieren – nicht selten mit der Unterstützung ihrer Familie, der ich dafür ebenfalls danke.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt durch meine eigene Unterschrift, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die aus den verwendeten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen entsprechend kenntlich gemacht habe.

Hamburg, den 6.02.2017

Thomas Volksdorf