

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan W. Schneider

Der Östrogeneinfluss auf Tight-Junction-Proteine in der ex-vivo porcinen Wundheilung

Dissertation

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

Vorgelegt von:

Kathrin Schawjinski

aus Elmshorn

Hamburg 2019

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.09.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Johanna Brandner

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Leticia Oliveira-Ferrer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	11
1 Einleitung.....	12
1.1 Die Haut	12
1.2 Die Wundheilung	14
1.3 Tight Junctions und Tight-Junction-Proteine	17
1.4 Tight Junctions und Wundheilung	23
1.4.1 Tight Junctions und Wundheilung in verschiedenen Epithelien	23
1.4.2 Tight Junctions und Wundheilung in der Haut.....	24
1.5 Östrogen, Östrogensynthese und Östrogenrezeptoren.....	26
1.6 Östrogeneinfluss auf die Haut	29
1.7 Östrogene und Wundheilung	30
1.8 Östrogene und Tight Junctions	32
1.9 Ziel der Arbeit	34
2 Material.....	35
2.1 Hautproben für das Wundheilungsmodell	35
2.2 Geräte	35
2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	36
2.3.1 Chemikalien.....	36
2.3.2 Verbrauchsmaterial.....	37
2.4 Immunhistochemie.....	38
3 Methoden.....	40
3.1 Das porcine ex-vivo Wundheilungsmodell	40
3.2 Histologische Methoden.....	42
3.2.1 Erstellung von Kryoschnitten	42
3.2.2 HE-Färbung.....	42
3.2.3 Immunhistochemische Färbung (von Kryo-Schnitten).....	43
3.3 Längenvermessung des Wundheilungsfortschrittes	45
3.4 Beurteilung der Wundranderrhaltung mittels Score	46

3.5	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	47
3.5.1	Intensität.....	47
3.5.2	Lokalisation in den Schichten	48
3.5.3	Verteilung (ZZ/IZ)	48
3.6	Statistik.....	49
4	Ergebnisse.....	50
4.1	Wundheilungsfortschritt	50
4.2	Wundranderhaltung	53
4.3	Immunhistochemische Färbung.....	56
4.3.1	Claudin 1	56
4.3.2	Claudin 4	69
4.3.3	ZO-1	86
4.3.4	Occludin	99
5	Diskussion	114
5.1	Der Einfluss von Östrogen auf den Wundheilungsfortschritt im ex-vivo Wundmodell.....	114
5.2	Vergleich der Auswertung des Wundheilungsfortschrittes mittels Score und mittels Längenvermessung unter dem Mikroskop.....	118
5.3	Der Einfluss von Östrogen auf die Wundranderhaltung im ex-vivo Wundmodell 120	
5.4	Der Einfluss von Östrogen auf die TJ-Proteine Claudin 1, Claudin 4, ZO-1 und Occludin.....	121
5.4.1	Claudin 1	123
5.4.2	Claudin 4	126
5.4.3	ZO-1	130
5.4.4	Occludin	135
6	Zusammenfassung	139
7	Summary	142
8	Literaturverzeichnis.....	145
9	Liste bisher veröffentlichter Arbeiten	162
10	Lebenslauf	163
11	Danksagung	164
12	Eidesstattliche Versicherung.....	165

Abkürzungsverzeichnis

AD	atopische Dermatitis
AF	activation function
AGF	angiogenesis growth factors
AKT	Serin/ Threonin-Kinase 1 (auch PKB genannt)
a.u.	arbitrary unit
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAR	coxsackie- and adenovirus receptor
CDK	cyclin dependent kinase
Clnd	Claudin
DHEA/DHEAS	Dehydroepiandrosteron/ Dehydroepiandrosteronsulfat
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure/ Desoxyribonucleinacid
DPN	Diarylpropionitrile
E1	Östron
E2	Östradiol
E3	Östriol
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER α	estrogen receptor α
ER β	estrogen receptor β
ERE	estrogen responsive element
ESAM	endothelial cell-selective adhesion molecule
F-Aktin	filamentöses Aktin
FGF	fibroblast growth factor
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
G-Aktin	globuläres Aktin
GAG	Glycosaminoglycan
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon
GPER/GPR30	G-Protein-gekoppelter Östrogenrezeptor/estrogen receptor
HER2	humaner epidermaler growth factor receptor 2, auch erb-B2
HRT	hormon replacement therapy
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IZ	Intrazellulär/Intrazellularraum
JAM	junctional adhaesion molecule
kan	Kaninchen

KD	Knock-Down
KO	Knock-Out
Konz.	Konzentration
LB	lamellar bodies
LH	luteinisierendes Hormon
M	Mol
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MCF-7	Michigan Cancer Foundation - 7
MIF	macrophage migration inhibitory factor
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
ms	Maus
mRNA	messenger RNA
MUPP-1	multi-PDZ domain protein 1
NISCH (-Syndrom)	neonatal ichthyosis-sclerosing cholangitis (-syndrom)
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
Ocln	Occludin
PDGF	platelet derived growth factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
RNA	ribonucleic acid
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum
SEM	standard error of the mean; Standardfehler
SG	Stratum granulosum
SP	Spitze der Wundzunge
SH3-Domäne	Src-homology 3-Domäne
SS	Stratum spinosum
T84-Zellen	humane epitheliale Zellen einer Lungenmetastase vom Kolonkarzinom
TAMP	tight-junction-associated marvel proteins
TER	transepidermal resistance
TEWL	transepidermal water loss
TF	Transkriptionsfaktor
TF-RE	transcription factor-responsive element

TGFβ	transforming growth factor β
TJ	Tight Junction
TNFα	Tumornekrosefaktor α
UN	Unbeteiligte Epidermis
UV	ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor
WR	Wundrand
WZ	Wundzunge
zi	Ziege
ZO	Zonula Occludens
ZONAB	ZO-1-associated nucleic acid binding protein (TF)
ZZ	Zell-Zell (-Grenzen)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematischer Aufbau der Haut	12
Abbildung 2: Wundheilung, 1.Phase, Hämostase und Inflammation	14
Abbildung 3: 2. Phase der Wundheilung, Proliferations- und Granulationsphase	16
Abbildung 4: 3. Phase der Wundheilung, Remodellierung	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus von Tight Junctions.....	18
Abbildung 6: Verteilung von Tight-Junction-Proteinen in den Schichten der Epidermis	19
Abbildung 7: Lokalisation bestimmter TJ-Proteine	22
Abbildung 8: Schematischer Aufbau der humanem Östrogenrezeptoren α und β im Vergleich.....	26
Abbildung 9: 6 mm Stanzen auf Kulturmedium in Petrischale	40
Abbildung 10: Exemplarische Darstellung einer Wundzunge	45
Abbildung 11: Beispiele für Wundranderhaltung in HE-Bildern.....	46
Abbildung 12: Beispielbild zur Auswertung der Intensität, Schicht und Verteilung der Immunfärbung hier für Claudin 1	47
Abbildung 13: Wundheilung in den verschiedenen Applikationen	50
Abbildung 14: Wundheilung im Gesamtkollektiv in d. verschiedenen Konzentrationen	50
Abbildung 15: Wundheilung unterschieden nach Geschlecht.....	51
Abbildung 16: Wundheilung unterschieden nach Konzentrationen und Geschlecht	52
Abbildung 17: Wundrandscore unterteilt nach Art der Applikation	53
Abbildung 18: Wundrandscore unterschieden nach Konzentration und Art der Applikation	53
Abbildung 19: Wundrandscore unterschieden nach Geschlechtl.....	54
Abbildung 20: Wundrandscore in direkter Applikation unterschieden nach Geschlecht und Konzentration.....	54
Abbildung 21: Wundrandscore indirekte Applikation über das Medium unterschieden nach Geschlecht und Konzentration	55
Abbildung 22: Beispiele für Intensität, Schicht und Verteilung von Claudin 1	56
Abbildung 23: A: Intensität von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten der mit PBS behandelten Kontrolle und allen Konzentrationen.....	57
Abbildung 24: Intensität von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen an allen Messorten.....	58
Abbildung 25: Intensität von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine	58
Abbildung 26: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Intensität der Claudin 1-Färbung an den jeweiligen Messortenl.....	59
Abbildung 27: Schichtverteilung von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei der Kontrolle mit PBS und allen Konzentrationen	60
Abbildung 28: Schichtverteilung von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (an allen Messorten gemeinsam)	61
Abbildung 29: Schichtverteilung von Claudin 1 an einzelnen Messorten in der Immunfluoreszenz und den verschiedenen Konzentrationen	62
Abbildung 30: Schichtverteilung von Claudin 1 am Wundrand in Prozent	63
Abbildung 31: Schichtverteilung von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (über alle Messorte zusammen).....	63

Abbildung 32: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Schichtverteilung der Claudin 1- Färbung an den jeweiligen Messorten	64
Abbildung 33: Verteilung von Claudin 1 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei Behandlung mit PBS und allen Konzentrationen	65
Abbildung 34: Verteilung (ZZ/IZ) von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (über alle Messorte zusammen)	66
Abbildung 35: Verteilung (ZZ/IZ) von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (über alle Messorte gemeinsam).....	66
Abbildung 36: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Verteilung der Claudin 1-Färbung innerhalb der Zellen an den jeweiligen Messorten	67
Abbildung 37: Beispiele für die Intensität, Schicht und Verteilung von Claudin 4.....	69
Abbildung 38: Intensität von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten, Kontrolle mit PBS und allen Konzentrationen.....	70
Abbildung 39: Intensität von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen.....	71
Abbildung 40: Intensität von Claudin 4 an den vier Messorten in der Immunfluoreszenz und den verschiedenen Konzentrationen	72
Abbildung 41: Intensität von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (an allen Messorten gemeinsam)	72
Abbildung 42: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Intensität der Claudin 4-Färbung an den jeweiligen Messorten	73
Abbildung 43: Schichtverteilung von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten.....	74
Abbildung 44: Schichtverteilung von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (über alle Messorte gemeinsam)	75
Abbildung 45: Schichtverteilung von Claudin 4 am Wundrand in Prozent	75
Abbildung 46: Schichtverteilung von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (über alle Messorte gemeinsam).....	76
Abbildung 47: Schichtverteilung von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (alle Konzentrationen gemeinsam).....	76
Abbildung 48: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Schichtverteilung der Claudin 4-Färbung an den jeweiligen Messorten	78
Abbildung 49: Verteilung von Claudin 4 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in der Kontrolle mit PBS und in allen Konzentrationen	79
Abbildung 50: Verteilung von Claudin 4 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen (über alle Messorte gemeinsam).....	80
Abbildung 51: Verteilung von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen, an den verschiedenen Messorten.....	81
Abbildung 52: Verteilung (ZZ/IZ) von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (über alle Messorte gemeinsam).....	82
Abbildung 53: Verteilung (ZZ/IZ) von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine, (alle Konzentrationen gemeinsam).....	82
Abbildung 54: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Verteilung der Claudin 4-Färbung innerhalb der Zellen an den jeweiligen Messorten	84
Abbildung 55: Beispiele für die Intensität, Schicht und Verteilung von ZO-1	86
Abbildung 56: Intensität von ZO-1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in der Kontrolle mit PBS und allen Konzentrationen.....	87

Abbildung 57: Intensität von ZO-1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (über alle Messorte gemeinsam)	88
Abbildung 58: Intensität von ZO-1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (an allen Messorten gemeinsam)	88
Abbildung 59: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Intensität der ZO-1-Färbung an den jeweiligen Messorten	89
Abbildung 60: Schichtverteilung von ZO-1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in der Kontrolle mit PBS und allen Konzentrationen	90
Abbildung 61: Schichtverteilung von ZO-1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (über alle Messorte gemeinsam)	91
Abbildung 62: Schichtverteilung von ZO-1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen an den jeweiligen Messorten	92
Abbildung 63: Schichtverteilung von ZO-1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (an allen Messorten gemeinsam)	92
Abbildung 64: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Schichtverteilung der ZO-1-Färbung an den jeweiligen Messorten	93
Abbildung 65: Verteilung von ZO-1 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei der Kontrolle mit PBS und allen Konzentrationen	94
Abbildung 66: Verteilung von ZO-1 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen	95
Abbildung 67: Verteilung von ZO-1 in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen.....	96
Abbildung 68: Verteilung (ZZ/IZ) von ZO-1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (alle Messorte).....	96
Abbildung 69: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Verteilung der ZO-1-Färbung innerhalb der Zellen an den jeweiligen Messorten	97
Abbildung 70: Beispiele für die Intensität, Schicht und Verteilung von Occludin.....	99
Abbildung 71: Intensität von Occludin in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei der Kontrolle mit PBS und allen Konzentrationen	100
Abbildung 72: Intensität von Occludin in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen.....	101
Abbildung 73: Intensität von Occludin in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen.....	102
Abbildung 74: Intensität von Occludin in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (alle Messorte gemeinsam).....	102
Abbildung 75: Intensität von Occludin in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (alle Konzentrationen gemeinsam).....	103
Abbildung 76: Intensität der Occludinfärbung mittels Score bei männlichen Schweinen an den jeweiligen Messorten, getrennt für die verschiedenen Konzentrationen	104
Abbildung 77: Intensität der Occludinfärbung mittels Score bei weiblichen Schweinen an den jeweiligen Messorten, getrennt für die verschiedenen Konzentrationen	105
Abbildung 78: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Intensität der Occludin-Färbung an den jeweiligen Messorten	106
Abbildung 79: Schichtverteilung von Occludin in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei der Kontrolle mit PBS und allen Konzentrationen	107
Abbildung 80: Schichtverteilung von Occludin in der Immunfluoreszenz in den Konzentrationen (alle Messorte)	108

Abbildung 81: Schichtverteilung von Occludin in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (alle Messorte gemeinsam).....	108
Abbildung 82: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Schichtverteilung der Occludin-Färbung an den jeweiligen Messorten.....	109
Abbildung 83: Verteilung von Occludin innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten	110
Abbildung 84: Verteilung von Occludin innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (an allen Messorten gemeinsam)	111
Abbildung 85: Verteilung (ZZ/IZ) von Occludin in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (über alle Messorte gemeinsam).....	111
Abbildung 86: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Verteilung der Occludin-Färbung innerhalb der Zellen an den jeweiligen Messorten	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Benutzte Geräte	35
Tabelle 2: Benutzte Materialien.....	36
Tabelle 3: Primärantikörper.....	38
Tabelle 4: Negativkontrolle.....	38
Tabelle 5: Sekundärantikörper	39
Tabelle 6: Score für die Schichtverteilung	48
Tabelle 7: Score für die Verteilung (ZZ/IZ)	48

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut ist eines der größten Organe des Menschen. Sie umgibt den Körper und erfüllt verschiedene Funktionen. Sie schützt beispielsweise vor einem Verlust von Wasser über die Körperoberfläche an die Umgebung („inside-out-Barriere“) und begrenzt das Eindringen von Schadstoffen aus der Umgebung in den Körper („outside-in-Barriere“). Sie kann in verschiedene Schichten unterteilt werden. Grob unterscheidet man in (von außen nach innen) Epidermis, Dermis und Subcutis (siehe Abbildung 1).

Die Subcutis (Unterhaut) schließt sich an die Muskeln, Faszien und Sehnen an. Sie enthält neben Arterien und Venen auch Nerven sowie Binde- und Fettgewebe. Die Dermis (Lederhaut) lässt sich unterteilen in Stratum reticulare und Stratum papillare. Sie enthält neben Nerven, Lymph- und Blutgefäßen auch Schweißdrüsen sowie die Haarwurzeln. Die Gefäße und Drüsen sind wichtig für die Thermoregulation.

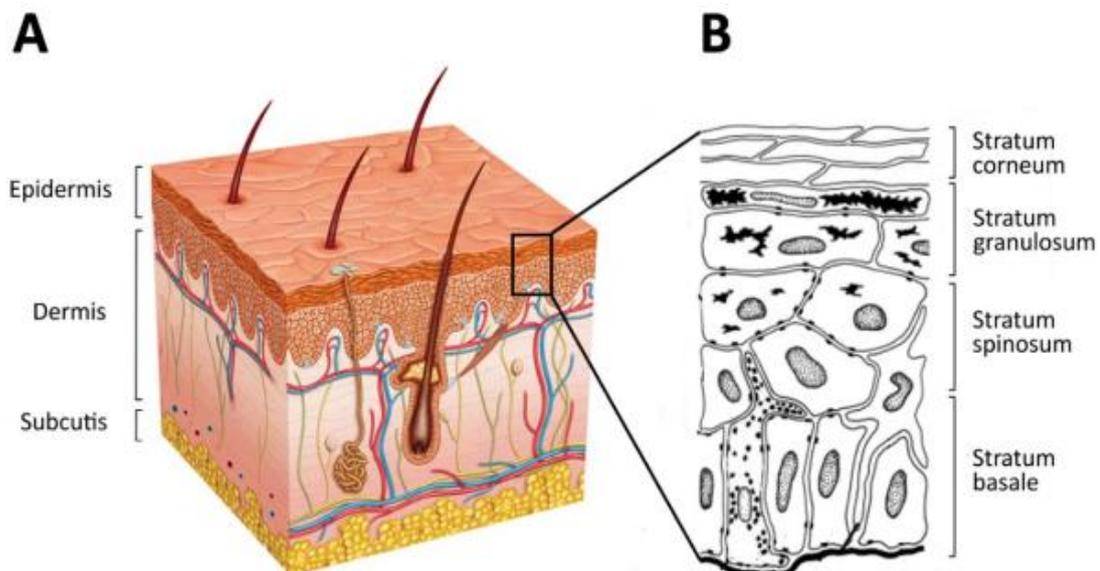


Abbildung 1: A: schematischer Aufbau der Haut; B: vergrößert, schematische Darstellung der Epidermis (Fritsch 1983)

Dermis und Epidermis sind eng miteinander verbunden. Die dermalen Papillen werden von Reteleisten der Epidermis umgeben (Lüllmann-Rauch 2015). Die Epidermis

(Oberhaut) kann wiederum in vier verschiedene Schichten unterteilt werden. Direkt an die Dermis grenzt das Stratum basale (SB). Dieses enthält epidermale Stammzellen, die lange proliferieren können, und andere Zellen, die eine hohe Mitoserate haben und so die Regeneration des Epithels gewährleisten. Daran schließt sich das Stratum spinosum (SS) an. Die Zellen erscheinen „stachelig“, da sie durch das Färben und Fixieren an Flüssigkeit verlieren und schrumpfen. Ihre desmosomalen Zellkontakte bleiben jedoch bestehen. Im Stratum spinosum findet man bereits Keratohyalingranula (zytoplasmatische Organellen, mit dichtem Protein bepackt, z.B. pro-Filaggrin) und frühe Differenzierungsmarker wie Involucrin (Brandner et al. 2015) als Zeichen der beginnenden Verhornung. Im Stratum granulosum (SG) setzt sich die Keratinisierung fort und man findet immer mehr Keratohyalingranula und Lamellar Bodies (LB= Odland-Körperchen). Die Lamellar Bodies enthalten Proteasen (z.B. Cathepsin D und Kallikrein), Lipasen, antimikrobielle Peptide, Cholesterol und auch die Vorstufen der Ceramide, welche im SG freigesetzt werden und im Stratum corneum die Lücken zwischen den Corneozyten in der Hornschicht abdichten (Joshi 2014).

Die äußerste der Hautschichten ist das Stratum corneum (SC). Es besteht aus Corneozyten. Das Stratum corneum bildet die erste Hautbarriere von außen nach innen („outside-in“). Die obersten Schichten schilfern beständig ab und werden durch neue nachfolgende Schichten ersetzt (Lüllmann-Rauch 2015).

Wie zuvor bereits erwähnt, ist die Haut sowohl für die „outside-in“- als auch für die „inside-out“-Barriere wichtig. Zur Aufrechterhaltung dieser Barrierefunktionen tragen verschiedene Komponenten bei. Physikalische Barrieren sind in erster Linie das Stratum corneum und darunter im Stratum granulosum die Tight Junctions. Zudem verfügt die Haut über ein biologisches Mikrobiom auf der Oberfläche des Stratum corneum (Viren, Bakterien, Pilze), welches potentiell pathogen, primär jedoch als residente Flora der Immunität nützlich ist. Eine wichtige Funktion des Mikrobioms als Barriere ist, dass die residente Flora mit Pathogenen um Nährstoffe etc. konkurriert. Zudem prägt es das adaptive Immunsystem und sorgt so für eine verbesserte Immunabwehr.

Ebenfalls zur Hautbarriere trägt die chemische Komponente bei. Dazu zählen beispielsweise der saure pH-Wert der Hautoberfläche sowie antimikrobielle Peptide, die von Keratinozyten produziert werden. Zur immunologischen Abwehrfunktion der Haut zählen zelluläre Komponenten wie Langerhans Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen und T-Lymphozyten, aber auch humorale Faktoren wie Zytokine (Proksch et al. 2008), (umfassend beschrieben in (Bäsler et al. 2016)).

1.2 Die Wundheilung

Als Wunde bezeichnet man laut Duden eine „durch Verletzung oder Operation entstandene offene Stelle in der Haut und im Gewebe“ (Duden 2016). Bei der Einteilung von Wunden kann man zunächst einmal akute von chronischen Wunden unterscheiden. Akute Wunden regenerieren sich selbst in geordneter zeitlicher und struktureller Abfolge (Baum und Arpey 2005, Velnar et al. 2009). Die Wundheilung an sich lässt sich in drei einzelne Phasen (1. Hämostase und Inflammation, 2. Proliferations- und Granulationsphase, 3. Remodellierungsphase) unterteilen, die eng miteinander verbunden und deren Übergänge fließend sind.

Unmittelbar nach einer Verletzung reagiert der Körper zunächst mit Vasokonstriktion, um den Blutverlust zu begrenzen und auch den Eintritt von Krankheitserregern zu minimieren (1. Phase der Wundheilung, Hämostase und Inflammation, siehe Abbildung 2) (Broughton et al. 2006). Die Thrombozyten bilden ein Gerinnsel, dieses wird durch Fibrin quervernetzt und startet die Gerinnungskaskade (Mason und Saba 1978).

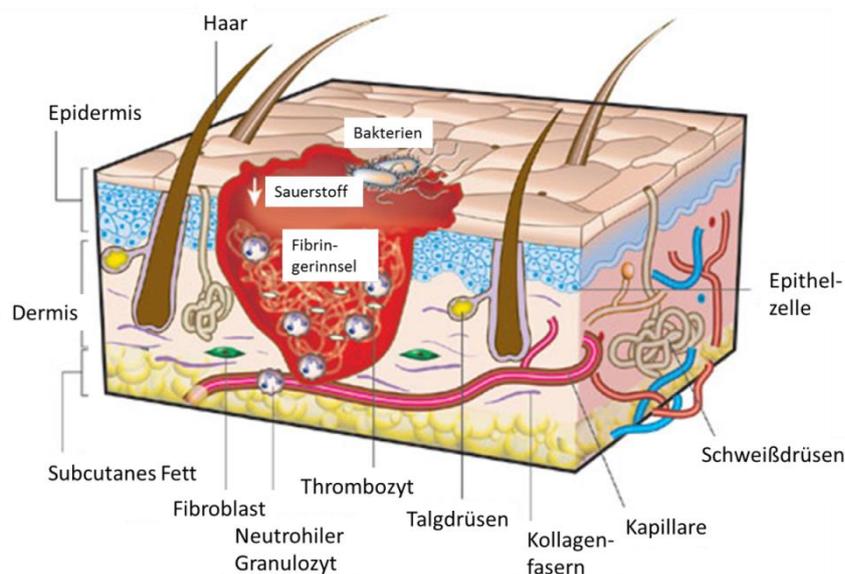


Abbildung 2: Wundheilung, 1.Phase, Hämostase und Inflammation, modifiziert nach (Gurtner et al. 2008)

Die Thrombozyten setzen zudem PDGF (Platelet derived growth factor) und TGF β (Transforming growth factor β) frei (Lynch et al. 1989, Velnar et al. 2009). Granulozyten sind die ersten Abwehrzellen im Wundbereich, gefolgt von den Makrophagen. In der entzündlichen Phase phagozytieren sie Bakterien und zerstörtes Gewebe. Die Makrophagen produzieren die AGF (angiogenesis growth factors) wie zum Beispiel VEGF

(vascular endothelial growth factor) und FGF (fibroblast growth factor) welche für die Bildung neuer Gefäße erforderlich sind (Broughton et al. 2006). Fibroblasten werden durch TGF β und PDGF angelockt (Goldman 2004) und beginnen mit der Produktion von Kollagen (2. Phase der Wundheilung, Proliferations- und Granulationsphase, siehe Abbildung 3) (Mutsaers et al. 1997). Im Verlauf entwickeln sie sich unter dem Einfluss von TGF β zu Myofibroblasten und sorgen für die Kontraktion der Wunde. Myofibroblasten sind spezialisierte Fibroblasten, die sich durch Stressfibrillen, Adhäsionskomplexe und Fibronectinfibrillen von anderen Fibroblasten unterscheiden und durch Kontraktion ein Zusammenziehen der Wunde bewirken (Pierce et al. 1991, Vaughan et al. 2000). Dies ist Teil der normalen Wundheilung, bei vermehrter Aktivität kann es zu Kontrakturen führen (Gabbiani und Majno 1972). Beim Menschen spielt die Wundkontraktion eher eine untergeordnete Rolle im Heilungsverlauf. Die Migration der Epithelzellen beginnt von den Wundrändern aus und die Zellen wachsen zur Mitte der Wunde aufeinander zu. Der genaue Mechanismus der Reepithelialisierung ist derzeit noch nicht geklärt. Es werden der Rolling-Mechanismus (Krawczyk 1971) und der Sliding-Mechanismus diskutiert (Radice 1980). Der Rolling-Mechanismus geht davon aus, dass die migrierenden suprabasalen Zellen über die führenden basalen Zellen „rollen“ und zu den neuen führenden Zellen werden. Der Sliding-Mechanismus beschreibt, dass die Zellen am Wundrand vermehrt proliferieren und sich die geschichteten Keratinozyten dann in einer Art „Block“ auf die Wundmitte zuschieben. Neueste Arbeiten weisen darauf hin, dass die basalen Zellen der Epidermis in die Wunde einwandern und immer die vorderste Zelle nach oben geschoben wird, um eine Deckschicht als Schutz zu bilden (Safferling et al. 2013). Kommt es zum Kontakt, stoppt das Zuwachsen (Kontaktinhibition) (Loewenstein und Penn 1967).

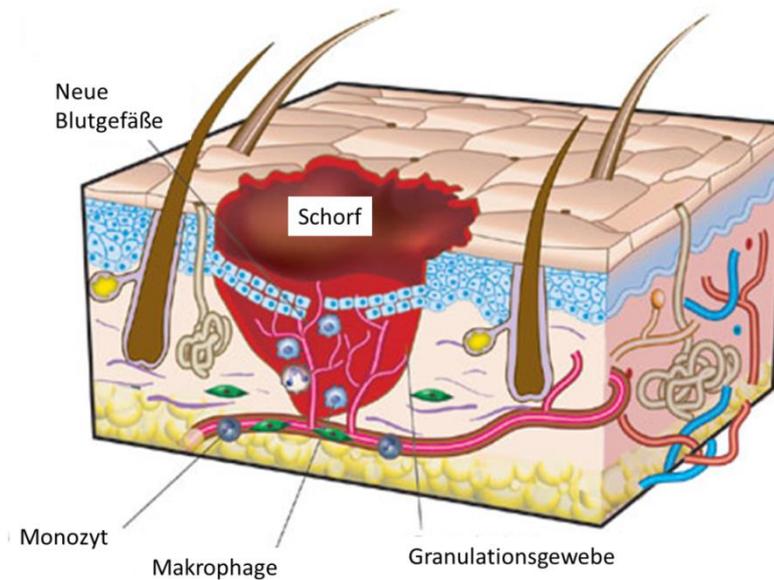


Abbildung 3: 2. Phase der Wundheilung, Proliferations- und Granulationsphase, modifiziert nach (Gurtner et al. 2008)

Es schließt sich eine Remodellierung (3. Phase der Wundheilung, siehe Abbildung 4) des Narbengewebes an. Hier setzen neutrophile Granulozyten und Makrophagen Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) frei, welche beispielsweise Kollagenbündel und Fibronectin abbauen (Velnar et al. 2009). Dieser Umbau zieht sich über einen längeren Zeitraum hin (bis zu einem Jahr) und mündet idealerweise in der anatomischen und funktionellen Wiederherstellung des Ursprungsgewebes.

Davon abgrenzen lassen sich chronische Wunden. Sie weichen in ihrer Regeneration von dieser Abfolge ab und sind oft kombiniert mit Hypoxie, Infektionen, Entzündungen und Nekrosen (Guo und Dipietro 2010).

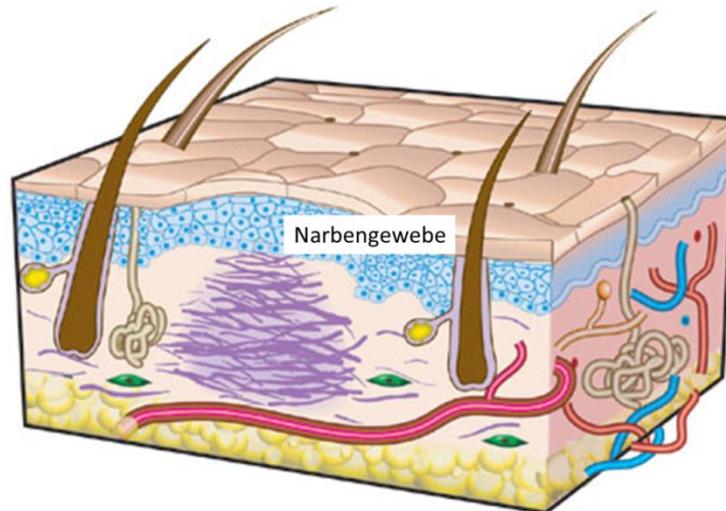


Abbildung 4: 3. Phase der Wundheilung, Remodellierung, modifiziert nach (Gurtner et al. 2008)

Die Wundheilung wird von lokalen Faktoren wie Entzündung, bakterieller Besiedelung, Sauerstoffgehalt und der arteriellen/venösen Versorgung in Form von Ischämie (Tandara und Mustoe 2004) beeinflusst. Ebenso beeinflussen systemische Faktoren wie zum Beispiel Alter (Gosain und DiPietro 2004), Geschlecht (hierbei insbesondere durch die Sexualhormone Androgene und Östrogene) (Gilliver und Ashcroft 2007, Gilliver et al. 2007), Stress (Godbout und Glaser 2006), Katecholamine (Gurtner et al. 2008) und Erkrankungen (z. B. Diabetes oder HIV) (Tandara und Mustoe 2004, Woo et al. 2007) die Wundheilung. Auch Medikamente, wie zum Beispiel Kortikoide (Wagner et al. 2008), NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika) (Jones et al. 1999) oder Chemotherapie können die Wundheilung beeinflussen. Besonders interessant ist dabei die Wirkung von Östrogenen auf die Haut im Allgemeinen und auf die Heilung von Wunden im Speziellen.

1.3 Tight Junctions und Tight-Junction-Proteine

Tight Junctions (Zonulae occludentes) sind selektiv abdichtende Verbindungen zwischen benachbarten Zellen. Sie bilden unter dem Stratum corneum eine zweite physikalische Hautbarriere und bestehen aus verschiedenen Proteinen (siehe Abbildung 5). Man unterscheidet hierbei die Transmembranproteine Claudine (Furuse et al. 1998, Morita et al. 1999, Aijaz et al. 2006), TAMP's (Tight Junction associated Marvel Proteins wie Occludin, Tricellulin und MarvelD3 (Raleigh et al. 2010)) und JAM's (Junctio-

nal Adhesion Molecules (Bazzoni 2003, Ebnet et al. 2004)) von den Plaqueproteinen (z.B. ZO-1 (Zonula Occludens Protein 1) (Stevenson et al. 1986), ZO-2 (Anderson et al. 1995), ZO-3, Cingulin, MUPP1, Symplekin (Keon et al. 1996)).

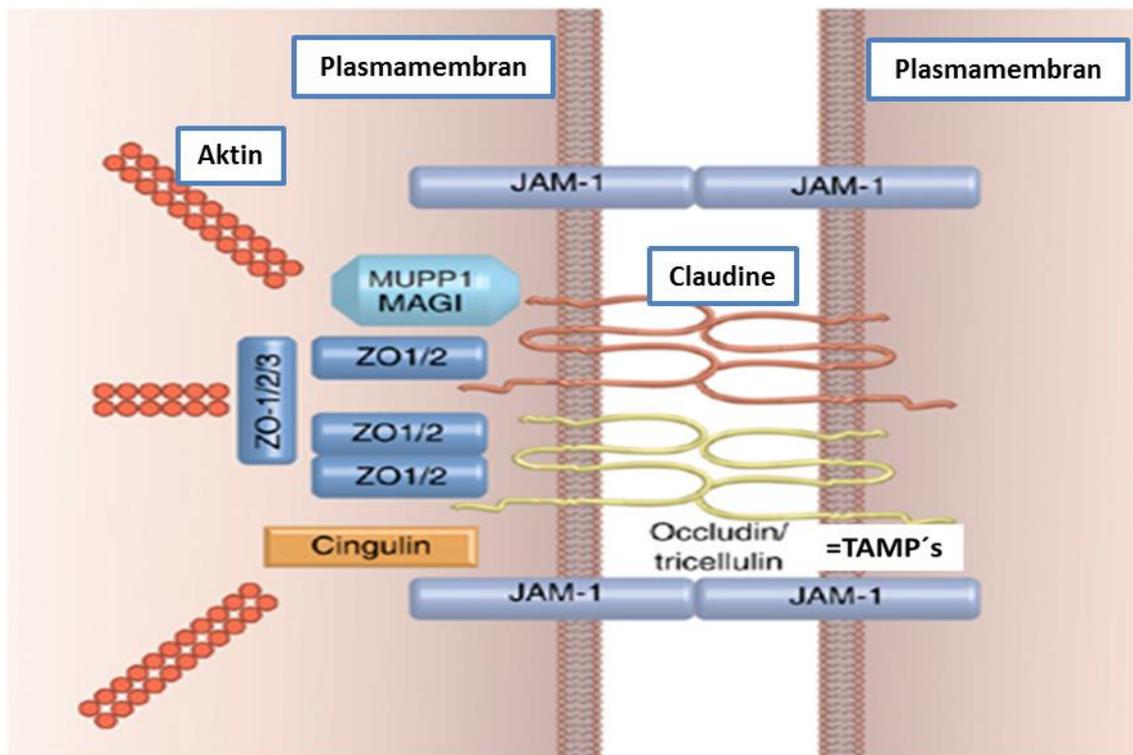


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus von Tight Junctions modifiziert nach (Niessen 2007) Ergänzung aus (Raleigh et al. 2010)

In der Familie der Claudine sind mittlerweile 27 verschiedene Mitglieder bekannt (Aijaz et al. 2006, Liu et al. 2016). Sie sind eine wichtige Strukturkomponente der Tight Junctions und nicht nur wichtig für die Barrierefunktion, sondern auch für die selektive Permeabilität (Furuse et al. 2001, Tsukita et al. 2001). Sie werden gewebsspezifisch exprimiert (Van Itallie und Anderson 2004) und können entweder abdichtend wirken (z.B. Claudin 1) oder Poren und Kanäle formen (z.B. Claudin 2) (Mitic et al. 2000, Amasheh et al. 2002). Sie haben 4 Transmembrandomänen, beide terminale Enden liegen im Zytosol (Morita et al. 1999, Van Itallie und Anderson 2014), so dichten sie den Interzellularspalt ab (Abbildung 5). Zu den TAMP's gehören Occludin, Tricellulin und MarvelD3 (Raleigh et al. 2010). Occludin war das zuerst entdeckte Transmembranprotein der Tight Junctions (Furuse et al. 1993). Tricellulin findet sich überwiegend an Zellkontakten, an denen drei Zellen aufeinandertreffen ((Ikenouchi et al. 2005, Furuse et al. 2014)). Bei den JAM's unterscheidet man zum Beispiel JAM-A, -B, -C, -L, -4, CAR und

ESAM (Bazzoni 2003, Ebnet et al. 2004, Garrido-Urbani et al. 2014). Das C-terminale Ende von Claudinen, JAM's und TAMP's enthält PDZ-Domänen und kann so Plaqueproteine wie ZO-1/2 oder MUPP1 binden. Die Plaqueproteine sind wiederum mit dem Aktinzytoskelett verbunden (Anderson et al. 1995, Keon et al. 1996). Eine weitere Rolle spielen Signalmoleküle (nicht abgebildet) wie Kinasen, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren, die mit dem zytosolischen Anteil der Proteine interagieren und sie so beeinflussen können sowie auch von ihnen beeinflusst werden. Ein Beispiel hierfür ist die SH3-Domäne von ZO-1, die intrazelluläre Signale über den Transkriptionsfaktor ZONAB und den Zell-Zyklus-Regulator CDK4 vermittelt (Balda und Matter 2000, 2009). ZONAB wird durch diese Bindung inaktiviert und der Zellzyklus und somit die Proliferation gehemmt, die Differenzierung ermöglicht. Implantiert man beispielsweise Claudin-1-defiziente Haut, so wird diese dicker, was ebenfalls auf einen Einfluss der Tight-Junction-Proteine in der Differenzierung hinweist (Kirschner und Brandner 2012).

Die Tight-Junction-Proteine sind unterschiedlich in den Schichten der humanen Epidermis lokalisiert (siehe Abbildung 6). Claudin 1 beispielsweise ist in allen lebenden Zellschichten vorhanden, Claudin 4 und ZO-1 findet man im Stratum granulosum und im oberen Stratum spinosum, während Occludin in den unteren Schichten des Stratum corneum und im Stratum granulosum vorkommt. Die typischen TJ-Strukturen findet man nur im Stratum granulosum (Kirschner und Brandner 2012) (siehe Abbildung 6).

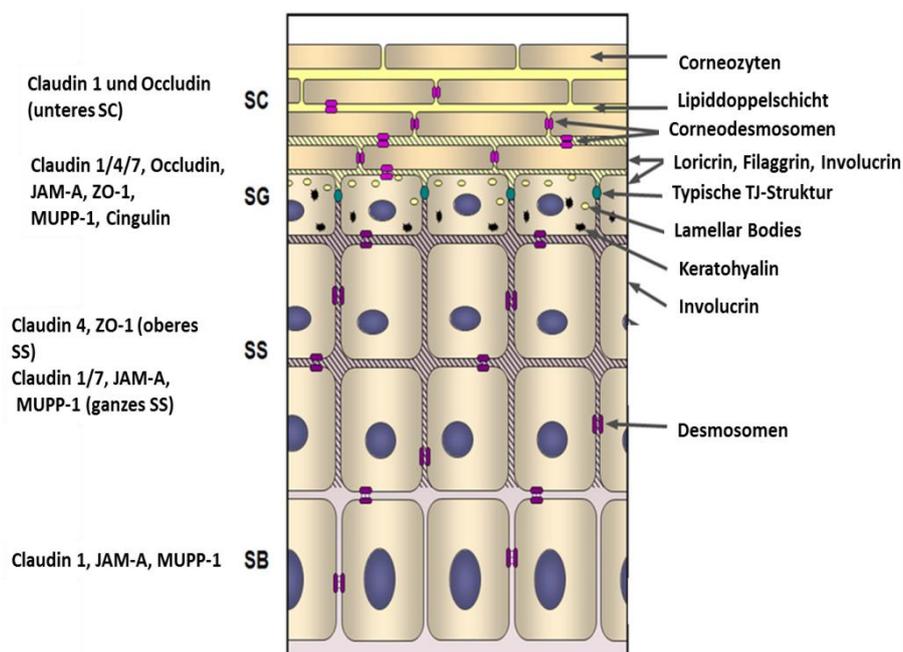


Abbildung 6: Verteilung von Tight-Junction-Proteinen in den Schichten der Epidermis modifiziert nach (Kirschner et al. 2012)

Durch äußere Faktoren wie zum Beispiel UV-Strahlung lässt sich die Lokalisation der Proteine beeinflussen. So zeigt sonnenexponierte und auch gealterte Haut eine breitere Lokalisation von Occludin, ZO-1 und Claudin 4, jedoch weniger Claudin 1 (Yuki et al. 2011, Hung et al. 2012, Rachow et al. 2013).

Man spricht im Zusammenhang mit Tight Junctions oft vom „Pore- and Leak.Pathway“. Die Poren werden dabei durch bestimmte Claudine gebildet (z.B. 2 und 15). Diese machen dann selektiv permeabel für kleine Kationen, sind aber impermeabel für Anionen und Makromoleküle (Amasheh et al. 2002, Liang und Weber 2014). Das Leck hingegen resultiert aus der Internalisierung oder verminderten Expression von beispielsweise Occludin, ZO-1 oder Tricellulin. Hier wird die Barriere dann nicht ladungsselektiv permeabel und ist zum Teil auch für Makromoleküle durchlässig (Krug et al. 2009, Van Itallie et al. 2009, Liang und Weber 2014).

Bei verschiedenen Hauterkrankungen zeigen sich Veränderungen von TJ-Proteinen. So findet man bei Patienten mit Psoriasis eine breitere Expression von Occludin und Claudin 4. Claudin 1 ist bei Psoriasis herunterreguliert (Yoshida et al. 2001, Kirschner et al. 2009). Bei Patienten mit dem NISCH-Syndrom (neonatale ichthyose-sklerosierende-cholangitis) liegt eine Mutation von Claudin 1, die zu einem Verlust des Proteins führt, vor (Hadj-Rabia et al. 2004). Dies könnte zu einer erhöhten Permeabilität zwischen Epithelzellen führen (Hadj-Rabia et al. 2004). Bei Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) lässt sich eine gestörte Hautbarriere feststellen. AD-Patienten haben deutlich weniger Claudin 1 im Vergleich zu Gesunden in der läsionalen Haut ((Gruber et al. 2015), (Batista et al. 2015)). In nicht-läsionaler Haut wurde eine Herabregulation in manchen Kohorten beschrieben (De Benedetto et al. 2011), in anderen nicht (Gruber et al. 2015). Für Claudin 4 findet sich bei AD-Patienten ein breiteres Verteilungsmuster als bei gesunden Kontrollpersonen (Gruber et al. 2015).

In Zusammenhang mit Pathogenen kommt es ebenfalls zu einer Veränderung bei den TJ-Proteinen: So findet man beispielsweise bei der Inokulation mit *Staphylokokkus epidermidis* oder *Staphylokokkus aureus* eine Hochregulation der Tight-Junction-Proteine im Sinne einer reaktiven Kompensation zu frühen Zeitpunkten der Inokulation, zu späteren v.a. mit *S. aureus* eine Herabregulation (Ohnemus et al. 2008, Bäsler et al. 2017).

Die Tight-Junction-Proteine übernehmen vielfältige Funktionen. Sie spielen eine Rolle als Barriere, in der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Polarisierung und in der Signaltransduktion (Aijaz et al. 2006). Man spricht im Zusammenhang mit Tight

Junctions oft von „fence“- und „barrier“-function. Die Zaunfunktion beschreibt die Unterteilung von Zellen in ein apikales und in ein basolaterales Kompartement (Polarisation).

In Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass TJ-Proteine in der Barrierefunktion (Claudin 1, Claudin 4, Occludin, ZO-1), Zell-Zell-Adhäsion (Occludin), Migration (Claudin 1), Proliferation (Claudin 1) und Empfänglichkeit für apoptotische Stimuli (Occludin) eine Rolle spielen (Furuse et al. 2002, De Benedetto et al. 2011, Kirschner et al. 2013, Rachow et al. 2013, Volksdorf 2016, Volksdorf et al. 2017). Besonders eindrucksvoll wurde die Beteiligung von TJ-Proteinen an der Barrierefunktion mit Hilfe von Claudin-1-knock-out Mäusen gezeigt. Hier beobachtet man einen stark erhöhten transepidermalen Wasserverlust und die Tiere sterben einen Tag nach der Geburt (Furuse et al. 1993). Die Tight-Junction-Barriere ist defekt und das Stratum corneum ist kompakter im Sinne einer Hyperproliferation der Keratinozyten, um die verminderte Tight-Junction-Barriere zu kompensieren (Furuse et al. 2002). Das Stratum corneum ist zudem funktionell eingeschränkt, das heißt, es zeigt eine verminderte Wasserbarrierefunktion (Sugawara et al. 2013).

Claudin 1 scheint im lebenden Organismus an der Zusammensetzung und Differenzierung des Stratum corneum beteiligt zu sein (Sugawara et al. 2013). Die Barrierefunktion der Tight Junctions bedeutet im gesunden Zellverband die Regulation der Diffusion von Ionen und Flüssigkeiten und die Abdichtung des parazellulären Spaltes. So bilden sie beispielsweise eine Barriere von innen nach außen in der Haut für mittlere (557Da), intermediäre (1,5 kDa, 5 kDa) und große (32 kDa) Moleküle (Kirschner et al. 2010, Yoshida et al. 2013, Yokouchi et al. 2015). Liegen die Epithelzellen einzeln vor, so finden sich TJ-Proteine vermehrt im Zytosol und im Zellkern, dort aktivieren sie die Proliferation. Im Zellverbund dagegen sind sie überwiegend an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert (Islas et al. 2002) (siehe Abbildung 7).

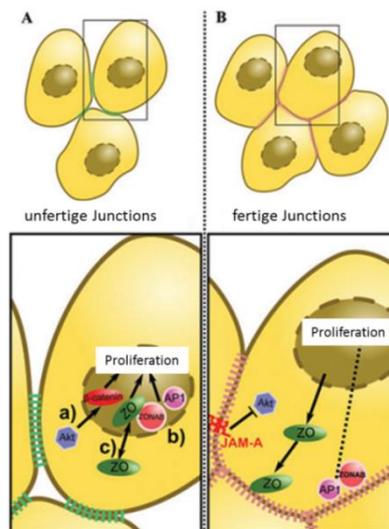


Abbildung 7: Lokalisation bestimmter TJ-Proteine, modifiziert nach (Farkas et al. 2012). A.) In Zellen mit unfertigen (grün) Tight Junctions translozieren Signalmoleküle (a), Transkriptionsfaktoren (b) und TJ-Proteine (c) in den Zellkern und aktivieren dort die Proliferation. In Zellen mit fertigen (rosa) Tight Junctions sind diese Proteine wieder dort lokalisiert.

1.4 Tight Junctions und Wundheilung

Wie bereits beschrieben, sind Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen bei der Wundheilung von essentieller Bedeutung. Hierfür müssen sich die Zell-Zell-Verbindungen (Gap Junctions, Adhärenzverbindungen und Tight Junctions) in verschiedener Weise anpassen. Die Tight Junctions müssen sich im regenerierten Epithel zügig neu formieren, um die epitheliale Barriere rasch wieder zu gewährleisten. Wie zuvor erwähnt, sind in unverletzter Epidermis die Tight Junctions und ihre Proteine in den Schichten unterschiedlich lokalisiert.

1.4.1 Tight Junctions und Wundheilung in verschiedenen Epithelien

Einige der ersten Ergebnisse zu Tight Junctions in der Wundheilung stammen von McCartney und Cantu-Crouch aus dem Jahr 1992. Sie fanden im kornealen Epithel 2 Tage nach Verwundung die erste Expression von Tight-Junction-Proteinen am Wundrand, strukturelle Tight Junctions erst ab dem fünften Tag (McCartney und Cantu-Crouch 1992). Herard et al. untersuchten die Integrität der epithelialen Barriere während der Wundheilung von respiratorischem Epithel. Sie fanden heraus, dass eine effiziente TJ-Barriere 1-2 Tage nach Wundverschluss wieder hergestellt ist (Herard et al. 1996). In Versuchen mit Urothelzellen zeigte sich bei Kreft et al., dass die „leading-edge“-Zellen ZO-1, Claudin 4, Occludin, aber kein Claudin 8 exprimieren. Lee et al. fanden an Zellen eines Adenokarzinoms der Lunge heraus, dass eine Reduktion von ZO-1 die Wundheilung im Scratch vermindert (Lee et al. 2015). Eine beeinträchtigte corneale Wundheilung am Rattenmodell war vergesellschaftet mit verminderter Expression von Occludin (Huang et al. 2016). Unter der Behandlung mit Lysophosphatidsäure wurde die Expression von Occludin und Claudin 1 in Zellen humaner Mundschleimhaut hochreguliert. Dies führte zu verbesserten Migrationseigenschaften und zu verringerter Proliferation ((Thorlakson et al. 2016), (Volksdorf 2016)).

1.4.2 Tight Junctions und Wundheilung in der Haut

Sowohl im humanen ex-vivo Wundmodell (Brandner et al. 2002) als auch in Versuchen an humanen Saugblasen (Beispiel für die Heilung akuter Wunden) (Malminen et al. 2003) wurden die Tight-Junction-Proteine ZO-1, Claudin 1 und Occludin an den Zellmembranen mit Kontakt zu Nachbarzellen schon zu frühen Zeitpunkten während der Wundheilung gefunden, noch bevor sich ein Stratum corneum formiert hatte (Volksdorf 2016). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Formierung von Tight Junctions wichtig für den späteren Differenzierungsprozess sein könnte (Kreft et al. 2006). Fletcher et al. entdeckten, dass die Verwundung einer Epithelschicht einen Stimulus für die Endozytose von Occludin darstellt. Das Tight-Junction-Protein wird nach Verletzung über Clathrin-vermittelte Endozytose am Wundrand in die Zellen aufgenommen (Fletcher et al. 2012). Malminen et al. untersuchten die Verteilung von ZO-1 und Occludin in regenerierender humaner Epidermis (Malminen et al. 2003). Bei ihren Versuchen fanden sie in der hyperproliferativen Zone am Rand der Saugblasen eine Umverteilung von ZO-1 mit einer Verbreiterung. Occludin war in den oberen Zellschichten angefärbt. An der Vorderkante der regenerierenden Epidermis waren ZO-1 und Occludin nur in den obersten Schichten anfärbbar. Volksdorf et al. untersuchten den Einfluss der Tight-Junction-Proteine Occludin und Claudin 1 in Bezug auf die Heilung chronischer Wunden. Hier konnte gezeigt werden, dass es in chronischen Wunden zu einem Verlust bzw. einer Herunterregulation von Occludin und Claudin 1 am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis kommt (Volksdorf et al. 2017).

Die Wundheilung im Scratch-Assay wurde durch die Herabregulation von Occludin nicht beeinflusst. Es zeigte sich jedoch ein Einfluss auf die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen. Diese führten, wenn man die Zellen beim Scratch-Assay unter mechanischen Stress setzte, wie er in der normalen Wundheilung vorkommt, zu einer verminderten Heilung (Volksdorf et al. 2017).

Claudin 1 ist in der normalen Wundheilung in der regenerierenden Epidermis vorhanden, manchmal ist es allerdings in den ersten Zellen an der Wundspitze abwesend (Nunan et al. 2015). Bei chronischen Wunden, die sich ebenfalls durch eine verminderte Proliferation und Migration auszeichnen, zeigte sich häufig insgesamt eine starke Herabregulation von Claudin 1. (Volksdorf et al. 2017). Hier konnten Volksdorf et al. zudem zeigen, dass die durch den Knock-Down verminderte Claudin-1-Expression zu einer signifikant beeinträchtigten Wundheilung im Scratch Assay führte und sowohl Migration als auch die Proliferation der Keratinozyten vermindert waren.

ZO-Proteine (1 und 2) sind in Phasen gesteigerter Proliferation vermehrt im Zellkern zu finden und unterstützen und stabilisieren Zellzyklusproteine (Jaramillo et al. 2004). ZO-1 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor ZONAB und beeinflusst so die Proliferation/Replikation positiv (Balda und Matter 2009). ZO-1 und ZONAB regulieren zusätzlich die Expression vom Erb-B2 (HER2/neu) (Balda und Matter 2000). Neben den ZO-Proteinen gibt es noch weitere Faktoren, die während der Wundheilung, wenn wenig "reife" Tight Junctions bestehen, im Zellkern für Proliferation sorgen (z.B. Akt aktiviert β -Catenin) (Farkas et al. 2012).

1.5 Östrogen, Östrogensynthese und Östrogenrezeptoren

Östrogene stammen aus der Gruppe der Steroidhormone mit 18 Kohlenstoffatomen. Die Freisetzung und Bildung dieser Hormone unterliegt der Steuerung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse. Aus dem Hypothalamus wird zunächst GnRH (Gonadotropin-releasing-Hormon) freigesetzt. Dieses stimuliert die Ausschüttung der Gonadotropine LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikelstimulierendes Hormon) aus der Hypophyse. FSH fördert bei der Frau die ovarielle Östrogensynthese in den Granulosazellen aus Androstendion mit Hilfe der Aromatase. Beim Mann geschieht dies in deutlich geringerer Konzentration auch durch die Leydigzellen im Hoden. Diese besitzen ebenfalls Aromataseaktivität und können Androgene in Östrogene umsetzen. Die Aromatase ist ebenfalls in der Haut, im Knochen, im Hirn und im Fettgewebe zu finden. Auch hier kann Östrogen synthetisiert werden (Simpson 2003) (Nelson und Bulun 2001). LH fördert die Synthese von Androstendion in den Theca-interna-Zellen, der wichtigsten Vorstufe von Östradiol (Bönisch 2001, Hall und Phillips 2005, Löffler 2007). Östrogene werden wie Androgene aus Cholesterin synthetisiert. Hierfür wird entweder vorhandenes Cholesterin aus Lipoproteinen verwendet oder de novo aus Acetyl-CoA synthetisiertes. Da die Hormone lipophil sind, werden sie im Blut an Östrogen-bindenden Proteinen transportiert (Löffler 2007).

Es sind verschiedene Östrogenrezeptoren bekannt. Der zuerst entdeckte Rezeptor war der Östrogenrezeptor α (ER α) (Jensen et al. 1967). Einige Jahre später wurde der Östrogenrezeptor β (ER β) gefunden (Kuiper et al. 1996). Bei den beiden Östrogenrezeptor-Typen handelt es sich um nukleäre Rezeptoren, die sich im nicht aktivierten Zustand im Zytosol der Zellen befinden. Sie haben mit 97% eine hohe Ähnlichkeit in der DNA-bindenden Domäne (C), weniger (59%) in der Ligand-bindenden Domäne (D) (Kuiper et al. 1996) (siehe Abbildung 8).

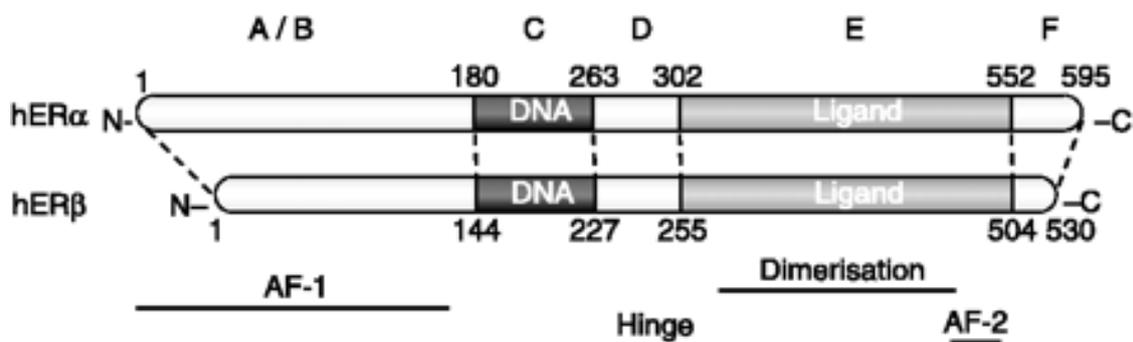


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der humanen Östrogenrezeptoren α und β im Vergleich (Drummond und Fuller 2010), (Abkürzungen siehe Text)

Sie enthalten eine N-terminal gelegene und liganden-unabhängige AF-1 (Activation-Function) Domäne und C-terminal eine liganden-abhängige Activation-Function-2 Domäne. Die AFs unterscheiden sich deutlich zwischen den Isoformen, es gibt nur 16% Übereinstimmung (als Übersichtsarbeit siehe (Jia et al. 2015)). Da sich die AFs, die Bindungsstellen für Coregulatoren, Aktivatoren wie auch Inhibitoren sind, bei den Rezeptorsubtypen so stark unterscheiden, können verschiedene Transkriptionskomplexe mit den Subtypen interagieren. Dies erklärt, warum ER α und ER β sowohl einen ähnlichen, einen antagonistischen (ER β kann bei Dimerisierung inhibitorisch auf ER α wirken (Ogawa et al. 1998)) als auch zum Teil einen alleinigen Einfluss auf Zielgene haben können (Paech et al. 1997).

Neben den klassischen nukleären Östrogenrezeptoren wurde zudem ein membrangebundener Rezeptor (GPER oder GPR30) beschrieben (Filardo und Thomas 2005, Filardo et al. 2007, Olde und Leeb-Lundberg 2009)

Die Effekte, die durch Östrogen vermittelt werden, hängen vom Gewebe und vom jeweils exprimierten Rezeptor ab. So wird beispielsweise bei mesenchymalen Stammzellen durch Östrogen ER α hochreguliert und ER β gesenkt, anders im Fettgewebe des Omentum. Hier steigert Östrogen ER β und senkt ER α (Anwar et al. 2001, Zhou et al. 2001). Beide Rezeptoren haben nahezu die gleiche Affinität zum Östradiol, unterscheiden sich aber in der Affinität zu anderen Liganden (ER α -selektiv ist zum Beispiel PPT (4,4',4''-(4-propyl-(1H)-pyrazol-1,3,5-triyl)trisphenol) und ER β -selektiv zum Beispiel DPN (2,3-bis(4-hydroxy-phenyl)-propionitril)) (Shin et al. 2016).

Es gibt klassische und nicht klassische Zielgewebe von Östrogen. Klassische enthalten mehr ER α als ER β , nicht klassische Zielgewebe haben kaum bzw. kein ER α , aber einen hohen Anteil ER β (Gustafsson 1999). ER β ist im Ovar (Granulosazellen), Kolon, Gehirn, Lunge, Fettgewebe, Nieren, Knochen, Herz, Blase, Hoden und Prostata zu finden; ER α dagegen vor allem im Hoden, Nebenhoden, Ovar, Brustdrüse, Haut, Gehirn, Fettgewebe, Knochen, Herz und Uterus (Drummond und Fuller 2010).

Im Wesentlichen können vier verschiedene Wege im Östrogen-Signaling unterschieden werden: das klassische und direkt genomische, das indirekt genomische, das nicht genomische und das Ligand unabhängige Signaling (Thornton 2013, Vrtacnik et al. 2014). Beim direkt genomischen Signaling bindet Östrogen im Zytosol der Zielzellen an den Östrogenrezeptor. Nach der Bindung des Liganden verändern die Rezeptoren ihre Konformation und dimerisieren. Sie binden dann im Zellkern an spezielle Elemente (ERE= Estrogen-responsive-Element) der DNA, nahe bei den Promotoren der Zielgene, um ihre Effekte zu vermitteln. Das indirekt genomische Signaling verläuft ähnlich,

nur dass hier die Dimere nicht ans ERE, sondern an TF-RE (Transkriptionsfaktor-Responsive Element) binden (Björnstrom und Sjöberg 2005). Beim nicht genomischen Signaling bindet Östrogen an einen Zellmembranrezeptor. Es kann dann intrazellulär Calcium mobilisiert, die Adenylatcyclase, der MAPK-Signalweg, PI3K-Signale und weitere aktiviert werden (Björnstrom und Sjöberg 2005). Das Liganden-unabhängige Signaling lässt sich durch eine Aktivierung von Östrogenrezeptoren durch andere Liganden als Östrogen erklären. Hierzu zählen vor allem die Phosphorylierung durch PKA oder PKC, aber auch extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter oder Zytokine (Nilsson et al. 2001). Die Vermittlung der Östrogensignale ist vielfältig. Es gibt verschiedene Möglichkeiten und Wege die gleichen Zielgene zu beeinflussen. Dieselbe Promotersequenz kann sowohl direkt (über ERE) als auch indirekt (über TF und TF-RE) beeinflusst werden. Zudem werden die Signale durch die verschiedenen Östrogenrezeptoren vermittelt. Hier kann die Bindung an ER α einen anderen Effekt hervorrufen als eine Bindung an ER β . Diese sind in den Geweben zudem noch unterschiedlich lokalisiert.

Östrogen wirkt vaskuloprotektiv und steigert die Angiogenese (Morales et al. 1995). Auch nach Verletzungen sorgt es für ein rascheres Wachstum des Endothels (über ER α) (Brouchet et al. 2001). Ebenso konnte gezeigt werden, dass sich unter der Östrogenbehandlung die Freisetzung von NO (durch Steigerung der NO-Synthetase) erhöht (Weiner et al. 1994) Widersprüchlich waren hierzu die Ergebnisse von Zancan et al., die einen Rückgang der NO-Synthase II unter der Behandlung mit Östrogen fanden (Zancan et al. 1999). Auch beschrieben wurden verschiedene durch Östrogen vermittelte Effekte in der Regulation der Immunantwort. Es beeinflusst zum Beispiel die Entwicklung von T-Zellen, Autoimmunerkrankungen und inhibiert Entzündungen (Straub 2007). Östrogen schützt T-Zellen via ER α gegen eine von TNF α induzierte Zytotoxizität (Takao et al. 2005). Östrogen scheint zudem einen Einfluss auf T-Helferzellen zu haben. Dieser scheint dosisabhängig zu sein. In niedrigen Konzentrationen wird eher eine TH1-Antwort stimuliert und in höheren eher eine TH-2-Antwort (Bebo et al. 2001, Maret et al. 2003, Delpy et al. 2005, Cunningham und Gilkeson 2011). Protektive Effekte gegenüber Diabetes mellitus, Adipositas und Insulinresistenz sind verknüpft mit ER α (Meyer et al. 2011).

Östrogen reguliert zudem die Energiebalance und Körperfettverteilung durch Interaktion mit dem Leptin-Signalweg (Shi et al. 2009).

1.6 Östrogeneinfluss auf die Haut

Dass Östrogene Einfluss auf die Haut haben, zeigte sich vor allem in Studien zur Hormonersatztherapie (Hormon replacement therapy = HRT). Hier wurden postmenopausale Frauen zum einen mit prämenopausalen und zum anderen mit Frauen unter HRT verglichen. Es zeigte sich, dass der Hormonersatz vielerlei Effekte im Bereich der Haut hatte (Grosman et al. 1971). Chen et al. fanden bei Patientinnen mit HRT eine um 10% erhöhte Hautdicke im Vergleich mit Patientinnen, die keine HRT erhalten hatten. Diese war vergleichbar mit der Hautdicke prämenopausaler Frauen (Chen et al. 2001). Brincat et al. fanden schon früh heraus, dass Östrogen die Fibroblasten zur vermehrten Produktion von Kollagen anregte (Brincat et al. 1983). Haapasaari et al. dagegen konnten diesen Effekt nicht nachweisen (Haapasaari et al. 1997). Im Bereich der Epidermis konnte sowohl durch HRT als auch durch östrogenhaltige Creme die Feuchtigkeit gesteigert werden und die Wasserhaltekapazität über Veränderungen in der Lipidzusammensetzung erhöht werden. Östrogen scheint also die Hautbarriere zu stabilisieren und Trockenheit vorzubeugen (Pierard-Franchimont et al. 1995, Dunn et al. 1997). Falten und Hauttrockenheit stehen ebenfalls in Zusammenhang mit einem Rückgang von Glycosaminoglycanen (GAG) in der Haut. Unter Östrogengabe erhöhte sich der Gehalt von GAG (Grosman et al. 1971).

1.7 Östrogene und Wundheilung

Viele der Untersuchungsergebnisse zum Thema Östrogen und Wundheilung stammen ebenfalls aus der Forschung zur HRT. Hierbei fiel zum Beispiel auf, dass Patientinnen mit HRT weniger oft an Ulzerationen der Beine litten als die Kontrollgruppe ohne HRT (Margolis et al. 2002). Ebenso konnte gezeigt werden, dass bei älteren Frauen mit niedrigerem Östrogenlevel die Entzündungsreaktion oft überschießend abläuft und die Heilung verzögert ist. Dies konnte durch topisches Auftragen von Östrogen vermindert werden (Ashcroft et al. 1999). Allerdings scheinen die Effekte dosisabhängig zu sein. Plackett et al. untersuchten daher den Einfluss hoher Östrogenkonzentrationen auf die Heilung von Wunden bei Mäusen und fanden eine verzögerte Heilung (Plackett et al. 2015). Klinisch relevant ist dies zum Ende einer Schwangerschaft, wenn die Östrogenkonzentrationen im Blut der Mutter Level erreichen, die 100-1000x höher sind als während des Eisprungs (10000-40000 ng/Liter im Vergleich zu 60-230 ng/Liter).

Verzögerte Heilung im Alter geht mit niedrigeren TGF β 1-Level, verminderter Kollagensynthese und vermehrter Aktivität von Proteasen (z.B. Elastase) einher (Ashcroft et al. 1997, Ashcroft et al. 1999, Brincat et al. 2005). Die verbesserte Heilung unter Östrogenbehandlung ist dagegen verbunden mit einer gesteigerten TGF β 1-Sekretion dermalen Fibroblasten (Ashcroft et al. 1997). TGF β 1 spielt eine wichtige Rolle bei Proliferation und Differenzierung sowie in der Regulation des Immunsystems. (Vaughan et al. 2000). So fördert es beispielsweise die Formation des Granulationsgewebes (Gilliver et al. 2007). Ein weiterer Faktor ist MIF (macrophage migration inhibitory factor). MIF wird während der Wundheilung in der proliferierenden Epidermis von Immunzellen und Endothelzellen gebildet und ist ein Faktor, der die Wundheilung verzögert. Postmenopausal findet man stark erhöhte MIF-Level. Prämenopausal unterdrückt Östrogen via ER α die Bildung von MIF (Ashcroft et al. 2003, Hardman et al. 2005) und steigert die Angiogenese und die Wundkontraktion (Morales et al. 1995). Östrogen hat zudem anti-inflammatorische Eigenschaften, zum einen über eine Suppression der Leukozyten im Knochenmark (Josefsson et al. 1992), zum anderen über eine Veränderung in der Chemotaxis von Granulozyten (Cuzzocrea et al. 2000). Dieses könnte eine Rolle bei der Heilung von Wunden spielen.

Östrogen wirkt ebenfalls auf Proliferation und Migration dermalen Zellen. Es stimuliert beispielsweise das Wachstum der Keratinozyten (Kanda und Watanabe 2004) und supprimiert ihre Apoptose (Kanda und Watanabe 2003). Dermalen Fibroblasten exprimieren sowohl ER α als auch ER β und zeigten unter der Behandlung mit Östrogen oder einem ER α -Agonisten, nicht aber bei der Behandlung mit einem ER β -Agonisten eine

erhöhte Migration (Stevenson et al. 2008, Stevenson et al. 2009, Thornton 2013). Es gibt Ergebnisse, die zeigen, dass Östrogen die Expression von Zellzyklusprotein Cyklin D2 induziert (über GPER/cAMP/PKA-Signalweg (Kanda und Watanabe 2004). Verdier-Sevrain et al. konnten belegen, dass Östrogen zudem die Expression von Zellzyklusprotein Cyklin D1 induziert (über ER α und den MAPK-Signalweg) (Verdier-Sevrain et al. 2004).

Männer zeigen im Vergleich zu jungen Frauen eine verminderte Wundheilung, postmenopausal verschlechtert sich auch bei Frauen die Heilung. Ashcroft et al. fanden heraus, dass Androgene eher den gegenteiligen Effekt zu Östrogen zeigten und die Heilung von Wunden durch gesteigerte Entzündungsreaktion verzögerten. Im Versuch wurden männliche Mäuse kastriert, was zu einer gesteigerten Wundheilung, reduzierter Entzündung und vermehrtem Haarwachstum führte (Ashcroft und Mills 2002).

1.8 Östrogene und Tight Junctions

In der Literatur finden sich einige Beispiele für die Wirkung von Östrogenen auf TJ-Proteine in verschiedenen Geweben. Auch hier scheint es wichtige Zusammenhänge mit den unterschiedlichen Östrogenrezeptoren zu geben. ER β scheint beispielsweise wichtig für die Organisation und Adhäsion von epithelialen Zellen zu sein. Beim Knock-Out von ER β im Brustdrüsenepithel von Mäusen waren die Level von Adhäsionsmolekülen reduziert (E-Cadherin, Connexin 32, Occludin und Integrin α 2) (Forster et al. 2002). Wada-Hiraike fanden in murinem Kolonepithel beim Knock-Out die Zellproliferation gesteigert, die Apoptose und Adhäsion vermindert sowie die TJ-Formierung und Kolonarchitektur abnormal (Wada-Hiraike et al. 2006).

Behandelte man T84-Zellen (Epithelzellen einer Lungenmetastase eines kolorektalen Karzinoms) mit Östrogen oder DPN (ER β -Agonist), so steigerte dies den TER (Transepithelialen Widerstand) dosisabhängig (Looijer-van Langen et al. 2011).

In der Brustkrebszelllinie MCF-7 induziert Östrogen über den ER α sowohl mRNA als auch die Proteinexpression von Claudin 6. Mehr Claudin 6 ist verbunden mit der Aufrechterhaltung der Barriere und wichtig für die Zelladhäsion. Der Verlust von Claudin 6 dagegen ist assoziiert mit erhöhter Invasivität und Metastasierung von Tumoren (Yafang et al. 2011).

Gorodeski stellte bei humanen Vaginalepithelzellen fest, dass Östrogenbehandlung die Zellgröße senkte, innerhalb der Zellen den Anteil von G-Aktin erhöhte und den Widerstand der Tight Junctions über ein Remodelling von Occludin (vom 65kDa Wildtyp zu einer proteolytischen Spaltvariante mit 50kDa) durch MMP7 (Matrix-Metallo-Proteinase-7) senkte (Gorodeski 2007).

Aberdeen et al. konnten zeigen, dass Östrogen über VEGF eine Auflockerung in den Tight Junctions zwischen Endothelzellen bewirken kann. Dies führte in Versuchen am Endometrium von Pavianen zu mehr Proliferation und Permeabilität sowie erhöhter Angiogenese (Aberdeen et al. 2008). Ye et al. zeigten ebenfalls eine erhöhte Permeabilität vaskulärer Endothelzellen nach Östrogenbehandlung. Sie fanden ER β auf den Endothelzellen, eine erhöhte Proliferation und erniedrigte Level von Occludin, jedoch keine Veränderung im Level von Claudin 1, Claudin 5 und ZO-1 (Ye et al. 2003). Gesenkte Occludinlevel und erhöhte Permeabilität wurden bei Behandlung in höheren Östrogenkonzentrationen beobachtet. Bei niedrigen Konzentrationen fanden sich erhöhte Occludinlevel und verminderte Permeabilität (Ye et al. 2003). Auch Ergebnisse von Cho et al. wiesen einen Effekt bei der Behandlung von HUVEC (humane umbilica-

le vain endothelial cells) nach (Cho et al. 1998). Anders als die Arbeitsgruppe von Ye et al. (Ye et al. 2003) fanden Burek et al. (Burek et al. 2010) zudem einen Einfluss von Östrogen auf Claudin 5. Unter der Behandlung von vaskularem Endothel erhöhten sich sowohl der transendotheliale Widerstand als auch die Claudin 5-Level. Hata et al. konnten dagegen in Endothelzellen aus dem Uterus von Mäusen eine verminderte Claudin 5-Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zeigen (Hata et al. 2014).

Östrogen scheint also in der Lage zu sein, die Expressionslevel von TJ-Proteinen und die Barriereigenschaften von verschiedenen Geweben sowohl zu fördern als auch zu vermindern.

1.9 Ziel der Arbeit

Aktuelle Studien weisen einen Einfluss von Östrogen auf die Heilung von humanen in-vivo Wunden nach (Hardman und Ashcroft 2008, Campbell et al. 2010). In einer vorangegangenen Doktorarbeit wurde dieser Einfluss in einem porcinen ex-vivo Wundmodell bestätigt und die Korrelation zu Gap-Junction-Proteinen untersucht (Krüger 2014). In dieser vorausgegangenen Arbeit wurde die Heilung der ex-vivo Modelle über einen Score beurteilt. Mittlerweile wurde nun die Technik verbessert, und die Wundheilung kann μm -genau vermessen werden, was zu einer verbesserten Objektivierung und statistischen Auswertung führt. Deshalb wurden in dieser Arbeit die aus der vorherigen Doktorarbeit vorliegenden Schnitte unter dem Mikroskop vermessen. Darüber hinaus wurde die Qualität des Wundrands beurteilt, was in der vorherigen Doktorarbeit noch nicht geschehen war. Durch die Ergebnisse soll somit der Einfluss des Östrogens auf die Wundheilung im ex-vivo Modell mit einer objektiveren Methode bestätigt und auf die Wundranderhaltung erstmals beurteilt werden. Hier wird insbesondere auf Unterschiede bei verschiedenen Östrogen-Konzentrationen, dem Geschlecht des Schweines und der Applikationsform (systemisch/ topisch) geachtet.

Darüber hinaus zeigte sich in den letzten Jahren, dass TJ-Proteine eine wichtige Rolle bei der Wundheilung bzw. bei Vorgängen, die für die Wundheilung essentiell sind, spielen. So haben TJ-Proteine neben der bekannten Barrierefunktion auch eine Rolle in der Differenzierung, Zell-Adhäsion, Migration und Proliferation von Keratinozyten (De Benedetto et al. 2011, Rachow et al. 2013, Brandner et al. 2015, Gruber et al. 2015, Volksdorf et al. 2017). Darüber hinaus sind sie in chronischen Wunden herabreguliert bzw. zeigen eine veränderte Lokalisation (Volksdorf et al. 2017). Schließlich konnte an anderen Geweben bereits gezeigt werden, dass Östrogene einen Einfluss auf TJ-Proteine haben (siehe Kapitel 1.8). Deshalb sollte in dieser Arbeit auch untersucht werden, ob die durch Östrogen beschleunigte Wundheilung zu einer veränderten Expression/ Lokalisation von TJ-Proteinen führt, oder ob Veränderungen die beschleunigte Heilung bedingen.

2 Material

2.1 Hautproben für das Wundheilungsmodell

Die Hautbiopsien stammen aus Schweinohren von 6 Monate alten Schweinen. Die männlichen Tiere wurden im Alter von 6 Wochen kastriert. Es handelt sich um Tiere aus der Rasse Crossbred Yorkshire/deutsches Edelschwein. Die bei der Schlachtung gewonnenen Ohren wurden zeitnah danach ins Labor transportiert und weiterverarbeitet. Für die Beurteilung des Wundheilungsfortschrittes und der Wundranderrhaltung wurden die Wundmodelle von insgesamt 21 Schweinen (5 weiblichen und 16 männlichen) verwendet. Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden insgesamt Modelle von 16 Schweinen (4 weiblichen und 12 männlichen) ausgewählt. Hierbei wurden Modelle ausgeschlossen, bei denen zu wenige Konzentrationen auswertbar waren (z.B. nur PBS und 1nM). Generell ausgeschlossen wurden bei allen Auswertungen Modelle, die infiziert oder anderweitig beschädigt waren.

2.2 Geräte

Kryostat	Leica CM 3050
Mikroskope	Olympus CH-2 Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiophot II (mit Digitaler Kamera Hamamatsu C4742-95 und Software Openlab 5.0.2 (Fa. Improvision) Leica DM-SL Lichtmikroskop in 10x Vergrößerung, Leica Mikroskope & Systeme GmbH Wetzlar
Tischzentrifuge	z.B. Biofuge 13 von Heraeus Sepatech
Vortexer	Vortex-Genie 2 Scientific Industries
Waage	z.B. Sartorius BI 610
Pap Pen	z.B. von Coulter Immunotech
pH – Meter	766 Calimatic von Knick

Tabelle 1: Benutzte Geräte

2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

2.3.1 Chemikalien

Aceton 100%, Chem. Solute, Th. Geyer
Aqua dest.
DAKO (Protein Block Serum-Free; Code X0909, Dako, Agilent Technologies)
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), Roche, Cat. No. 10 236 276 001 Desinfektionsmittel (Fläche: z.B anti infect N liquid von Schülke; Hände: z.B. -
Sterilium classic von Bode Chemie GmbH
Einbettmedium, Fluoromont – GTM von Southern Biotech, Bestellnr.: 0100-01;
- Eukit (Gefriereinbettmedium); Fa. O. Kindler GmbH & Co. KG
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig Fa.: ROTH Art.Nr.:X883.2
Essigsäure 100%; Nr. 27225; Fa. Riedel-de Haën
Ethanol versch. Konz. (99%; 96%, 80%, 70%) Fa. Walter-CMP GmbH & Co KG
Flüssigstickstoff (liquid N₂)
Isopentan, Sigma Aldrich, M3263-1L Isotyp-Kontrollseren, Negative Control
Rabbit Immunoglobulin Fraction No.
- X 0903 und Mouse IgG1 No. X 0931 von Dako Cytomation
Kaliumchlorid KCl, z.B. von Merck
Kaliumdihydrogenphosphat KH₂PO₄, z.B. von Merck
Leitungswasser, Hamburger Wasserwerke
Methylenblaulösung, z.B von Merck
Na₂HPO₄ × 2H₂O (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat), z.B. von Merck
Natriumchlorid NaCl, z.B. von Sigma Aldrich
NGS (normal goat serum) Block-Serum, dianova (Nr. 005-000-121; Lot 119839)
Östrogen, Sigma E2758-1G Lot: 060M0149V
PBS zur Antikörper – Verdünnung z.B. von Biochrom AG
Petroleumbenzin, z.B, von Sigma Aldrich, Bestellnr.: 32247
Triton X-100, z.B. von Sigma Aldrich
Xylol; Nr. 8118; Fa. J.T. Baker

Tabelle 2: Benutzte Chemikalien

2.3.2 Verbrauchsmaterial

Deckgläser z.B. „Superior Marienfeld Laboratory Glassware“
Einfriergefäße, Nalgene Cryoware Scientific Vials, Thermo Fisher
Einmalklingen, z.B. „surgical blade“ von Feather safety Razor Co. LTD
Färbeküvetten, Carl Roth GmbH
Farbwiege mit Halterung, Carl Roth GmbH
feuchte Kammer, Krea Tech diagnostic
Flaschen verschiedener Volumina, z.B. von Duran
fuselfreie Präzisionswischtücher, z.B. Kimtech „Science“ 7552, Kimberly-Clark
Gefrier-Schutzhandschuhe
Kornzange, Carl Roth GmbH
Küvetten, Carl Roth GmbH
Messzylinder verschiedener Volumina
Objektträger, Superfrost ultra plus, Gerhard Menzel GmbH
Objektträgerhalter, Carl Roth GmbH
Pinsel, Carl Roth GmbH
Pinzetten, Dumont über Carl Roth GmbH
Pipetten, z.B. von Eppendorf
Pipettenspitzen, z.B. von Eppendorf
Reaktionsgefäße (1,5; 2; 15 ml), z.B. von Eppendorf bzw. Falcon
Schutzbrille
Spatel, Löffel, Carl Roth GmbH

Tabelle 3: Benutzte Verbrauchsmaterialien

2.4 Immunhistochemie

Primärantikörper	Anti- gen	Gat- tung	Verdün- dün- nung	Blockierung/ Oberflächenspannungs- veränderung
Maus anti-Occludin (Invitrogen No 33-1500)	Oc- cludin	ms	1:800	2% NGS + 0,1% Triton
Maus anti-ZO-1, (Invi- trogen No 33-9100)	ZO-1	ms	1:1600	DAKO
ZO-2/TJP2 Antibody, Polyclonal (Thermo Scientific No QF215514)	ZO-2	kan	1:150	2% NGS + 0,1% Triton
Kaninchen anti-Claudin 4 (Invitrogen No 36-4800)	Clau- din 4	kan	1:400	2% NGS + 0,1% Triton
Kaninchen anti-Claudin 1 (Invitrogen No 51-9000)	Clau- din 1	kan	1:1250	2% NGS + 0,1% Triton

Tabelle 4: Primärantikörper

Negativkontrolle	Gattung	Verdünnung	Blockierung/ Oberflächenspannungs- veränderung
Negativkontrolle Rabbit Immunoglobulin Fraction	kan	1:100000 (Claudin 1) 1:12000 (ZO- 2)	2% NGS + 0,1% Triton
Negativkontrolle Mouse IgG1	ms	1:160 (Occlu- din) 1:320 (ZO-1) 1:200 (Claudin 4)	2% NGS + 0,1% Triton (Occ und Cl 4) DAKO (ZO-1)

Tabelle 5: Negativkontrolle

Sekundärantikörper	Antigen	Gattung	Verdünnung
Alexa Fluor 488 F(ab)2 goat anti-mouse (molecular Probes A11017)	ms	zi	1:600
Alexa Fluor 488 F(ab)2 goat anti-rabbit (molecular Probes A11070)	kan	zi	1:600

Tabelle 6: Sekundärantikörper

3 Methoden

3.1 Das porcine ex-vivo Wundheilungsmodell

Das patentierte porcine ex-vivo Wundheilungsmodell (Patent-Nr. DE 10317400) wurde mit Hautbiopsien aus Schweineohren hergestellt. Diese mussten dafür zunächst unter fließendem Wasser gereinigt und von Haaren befreit werden. Anschließend wurde die Haut mit Mullbinde und Sterilium für 10 Minuten desinfiziert. Alle weiteren Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen, um eine Kontamination der Modelle zu vermeiden. Es wurden 6 mm Stanzen entlang der Plicae des Ohres entnommen und in eine mit Kulturmedium befüllte Petrischale gesetzt.

Die einzelnen Stanzen sind danach von Fettgewebe und Haaren befreit worden. In die Mitte der 6 mm Stanze wurde eine 3 mm Stanze angesetzt und in diesem Bereich Epidermis und ein Teil der Dermis entfernt (Abbildung 9).

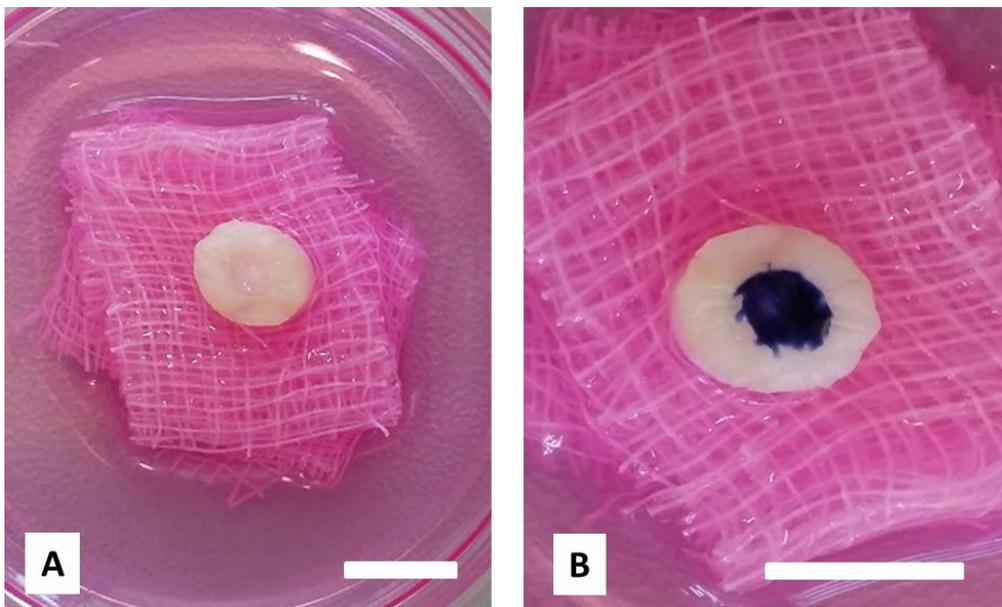


Abbildung 9: 6 mm Stanzen auf Kulturmedium in Petrischale, A: ungefärbt; B: 3mm Wunde mit Trypanblau angefärbt zur besseren Abgrenzung, Maßstab je 6 mm

Das so erstellte Wundmodell konnte dann auf ein Stück Mull in eine 12-Well-Platte gesetzt werden. Das gewährleistete, dass die Dermis mit Medium umspült, die Epidermis aber trocken blieb.

Auf die Wunde selbst wurden 5 μ l der verschiedenen Östrogenkonzentrationen (verwendet wurden 1 nM (direkt), 2nM (Medium), 100 nM (je direkt und über das Medium) und 1 μ M (je direkt und über das Medium) (in PBS) oder PBS als Kontrolle gegeben, anschließend die Modelle im Inkubator bei 37°C, 85% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ bebrütet. Die Wundmodelle wurden alle nach 48h abgestoppt. Alle Ergebnisse beziehen sich auf diesen Zeitpunkt. Zum Abstoppen sind die Modelle in in flüssigem Stickstoff vorgekühltem Isopentan schockgefroren und anschließend bei - 80°C im Gefrierschrank gelagert worden.

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Wundheilungsmodelle stellte Dr. Carmen Klingelhöller (geb. Krüger) im Rahmen ihrer Doktorarbeit her.

3.2 Histologische Methoden

3.2.1 Erstellung von Kryoschnitten

Die kryokonservierten Wundmodelle mussten für die weitere Auswertung geschnitten und auf Objektträgern fixiert werden. Dafür wurde das zu schneidende Modell zuerst mit einer Kammertemperatur von - 21°C und einer Objekttemperatur von - 24°C „aufgeblockt“. Hierfür wurde zunächst Cryomatrix auf die Objektplatte aufgebracht und gefroren. Darauf setzte man das Modell und richtete es aus. Die Probe wurde dann mit dem Gefriereinbettmedium bedeckt. Als alles gefroren war, konnte die Objektplatte positioniert und der Block in Form getrimmt werden. Die aufgeblockte Probe wurde dann in 6µm dicke Schnitte geschnitten. Zu beachten war, Schnitte aus dem zentralen Bereich der Wunde zu entnehmen. Die einzelnen Schnitte konnten mit einem beschichteten Objektträger aufgenommen werden. Nach der Aufnahme aller benötigten Schnitte entfernte man das Objekt von der Objektplatte durch kurzes Erwärmen auf dem Thermoblock.

Die gewonnenen Schnitte auf den Objektträgern wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend fixiert. Die Fixierung unterschied sich, je nachdem wie die Schnitte weiter verarbeitet werden sollen. Für spätere Immunhistochemie wurden sie 10 Minuten bei – 20°C in 100% Aceton fixiert. Für eine anschließende HE-Färbung war keine Fixierung erforderlich und die Färbung konnte direkt angeschlossen werden.

3.2.2 HE-Färbung

Mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung können Gewebeschnitte aufgrund ihrer Eigenschaften angefärbt werden. Dabei färbt Hämatoxylin die Zellkerne und enthaltene DNA blau und Eosin die basischen Zellteile wie zum Beispiel Plasmaproteine rot.

Die zu färbenden Kryoschnitte wurden vor dem Färben zunächst bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend direkt gefärbt. Dafür legte man sie zunächst für 10 Minuten in die Hämalau-Lösung. Anschließend wurde mehrfach unter Leitungswasser kurz getaucht und gespült. Es folgte ein 10-minütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser, um die Schnitte zu „bläuen“. Um eventuelle Salze und Ionen zu entfernen, wurden die Schnitte im Folgenden mehrfach in Aqua dest. getaucht. Darauf folgte die Färbung mit Eosin (45 sec.), anschließend die Spülung. Um den Schnitten Flüssigkeit

zu entziehen, durchliefen sie eine aufsteigende Ethanol-Reihe (70%, 80%, 96%, 99%), um anschließend 2 x 10 Minuten in Xylol eingelegt zu werden. Für das Einbetten gab man Eukit auf den gefärbten Schnitt und deckelte ihn mit einem Deckglas ein. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen bildeten. Anschließend härtete er bei Raumtemperatur aus. Die hier in dieser Doktorarbeit verwendeten HE-Schnitte wurden bereits für die Doktorarbeit von Dr. Carmen Klingelhöller, geb. Krüger hergestellt.

3.2.3 Immunhistochemische Färbung (von Kryo-Schnitten)

Für die Erstellung der Immunfärbungen wurden die verschieden behandelten Wundmodelle von 12 Individuen verwendet (n=12; w=4 und m=8). Ausgeschlossen wurden hierbei, wie auch schon bei der Vermessung der Wundheilung, Modelle, die infiziert oder anderweitig beschädigt waren. Zudem wurde darauf geachtet, dass Modelle gefärbt wurden, die an allen Messorten auswertbar waren. Hierbei wurden, da sich in den vorherigen Versuchen bei der Auswertung der Wundheilung im Wesentlichen keine signifikanten Unterschiede für die Art der Applikation ergeben hatten, vor allem direkt behandelte Modelle verwendet. Um aber alle Konzentrationen einzuschließen, wurden zusätzlich solche, die mit 2 nM über das Medium behandelt worden waren, angefärbt.

Bei einer immunhistochemischen Färbung geht es darum, die Lokalisation bestimmter Proteine mit der Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen. Hierbei verwendet man zunächst einen Primärantikörper, der das Antigen erkennt und bindet. Im zweiten Schritt einen mit Fluoreszenz markierten Sekundärantikörper, der den Primärantikörper erkennt und bindet. Durch die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff werden die Komplexe unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar und messbar gemacht.

Bevor die eigentliche Färbung beginnen konnte, wurden die Schnitte zunächst mit dem Pap Pen umrandet, um so eine wasserabweisende Barriere auf dem OT (Objektträger) zu schaffen und damit die Fläche einzugrenzen, auf der sich die Antikörperlösung verteilen konnte. Die Schnitte wurden dann in eine feuchte Kammer eingelegt. Dann folgte je nach Antikörper das Auftragen einer Blockierungslösung für 10 min. Die Schnitte, in denen Occludin, Claudin 1 und Claudin 4 nachgewiesen wurden, wurden jeweils mit NGS und Triton behandelt, die, in denen ZO-1 untersucht wurde, mit „Protein Block Serum Free“ von DAKO. Durch diese Behandlung wurden die unspezifischen Bindungsstellen belegt und die Oberflächenspannung zur leichteren Bindung für die Antikörper verändert. Es folgte das Auftragen des Primärantikörpers und Inkubation für 30

Minuten. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen und hierbei ungebundene Antikörper entfernt, um dann den Sekundärantikörper aufzutragen und wiederum 30 Minuten zu inkubieren. Auch danach wurde dreimal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden dann für 1 Minute ins DAPI-Färbebad gelegt, um die Kerne gegenzufärben. Auch hiernach wurde wieder dreimal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die so gefärbten Schnitte konnten dann mit je einem Tropfen Flouromount luftblasenfrei eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet werden.

3.3 Längenvermessung des Wundheilungsfortschrittes

Zur Vermessung des Wundrandes wurde dieser unter dem Mikroskop eingestellt und μm -genau von der letzten Reteleiste bis zum Ende der Wundzunge abgefahren (siehe Abbildung 10). Es wurden pro Schnitt beide Wundränder vermessen und der jeweilige Mittelwert gebildet, zudem die Werte von A- und B-Probe erfasst. Ausgeschlossen wurden infizierte Schnitte, autolytische Schnitte sowie Wundzungen, die einen Haarfollikel enthielten (Hautareale mit Haarfollikeln fördern die Wundheilung) (Brown und McDowell 1942, Liu et al. 2015).

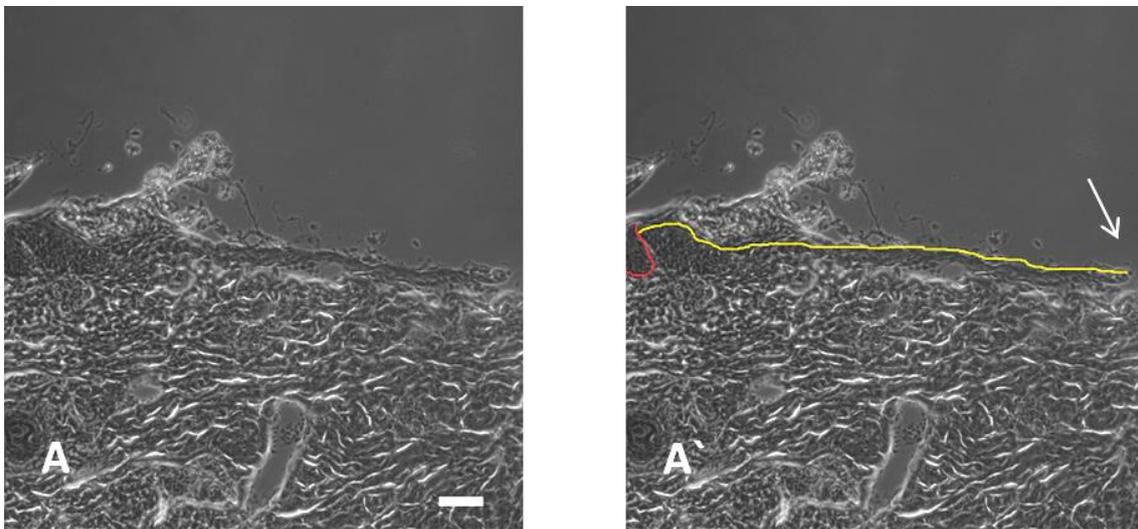


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung einer Wundzunge (A); auf A` in Gelb eingezeichnet die exemplarische Längenmessung unter dem Mikroskop, rot markiert die 1. Reteleiste und der Pfeil zeigt die Wundspitze an; 10er Vergrößerung, Maßstab $50\mu\text{m}$

3.4 Beurteilung der Wundranderhaltung mittels Score

Bei der optischen Beurteilung der Wundranderhaltung wurde ein Score verwendet. Ein Scorewert von 2 bedeutet dabei eine gute Erhaltung des Wundrandes und ein Wert von 0 eine besonders schlechte. Es wurden die Werte 0, 0,5, 1, 1,5, 1,75 und 2 verwendet (siehe Abbildung 11). Es wurden jeweils beide Wundränder eines Modells beurteilt und daraus der Mittelwert gebildet. Ausgeschlossen wurden auch hier infizierte Schnitte, Wundzungen, die einen Haarfollikel enthielten, sowie autolytische Schnitte.

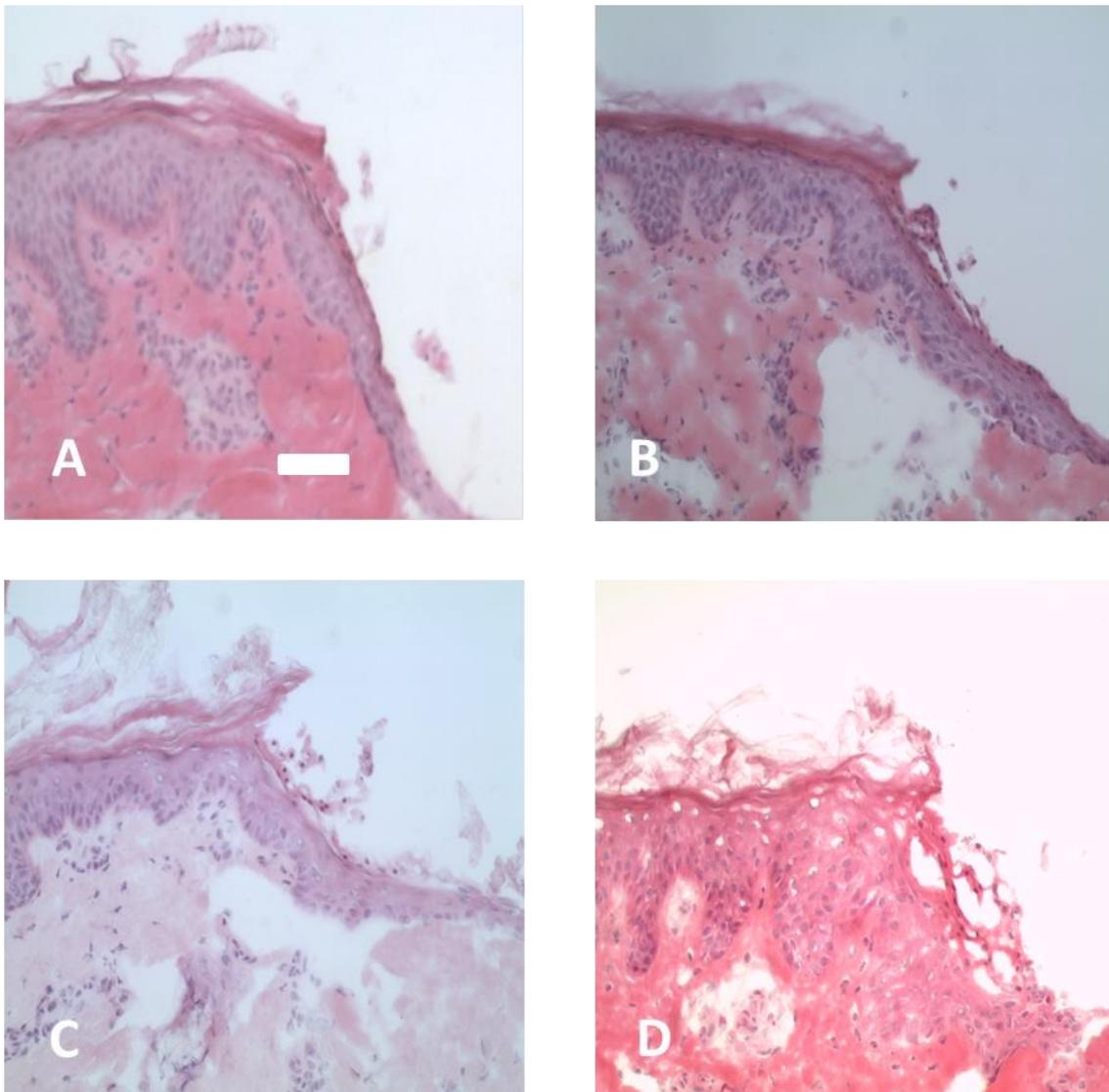


Abbildung 11: Beispiele für Wundranderhaltung in HE-Bildern; A zeigt gut erhaltenen Wundrand (Score 1,75), B etwas schlechter erhaltenen Wundrand, (Score 1,5); C noch etwas schlechter (Score 1,0) und D schlecht erhalten (Score 0,75); Maßstab jeweils 50µm

3.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

3.5.1 Intensität

Bei der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde zunächst beurteilt, wie intensiv die Färbung des Proteins an den jeweiligen Messpunkten (unbeteiligte Epidermis (UN), Wundrand (WR), Wundzunge (WZ) und Spitze der Wundzunge (SP)) war. Der Messort UN wurde dabei als Mitte zwischen den beiden Wundrändern definiert. Der Wundrand selbst beinhaltete je 50 µm in Richtung Wundzunge und in Richtung unbeteiligter Epidermis. Der Messort Wundzunge wurde definiert als die Mitte zwischen Wundrand und Spitze der Wundzunge. Zur Spitze der Wundzunge zählten jeweils die letzten 50 µm der Wundzunge.

Hier wurde ebenfalls ein Score angewendet mit möglichen ganzzahligen Werten von 0, 1, 2, und 3 (siehe Abbildung 12). Ein Score von 3 bedeutete eine intensive, von 2 eine mäßig intensive, ein Score von 1 eine schwache und bei 0 eine negative Färbung. Hierbei wurden alle Wundmodelle eines Schweines in einem gemeinsamen Färbegang mit einem Antikörper gefärbt und hintereinander angesehen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten und individuell stärkere/schwächere Färbungen zu berücksichtigen.

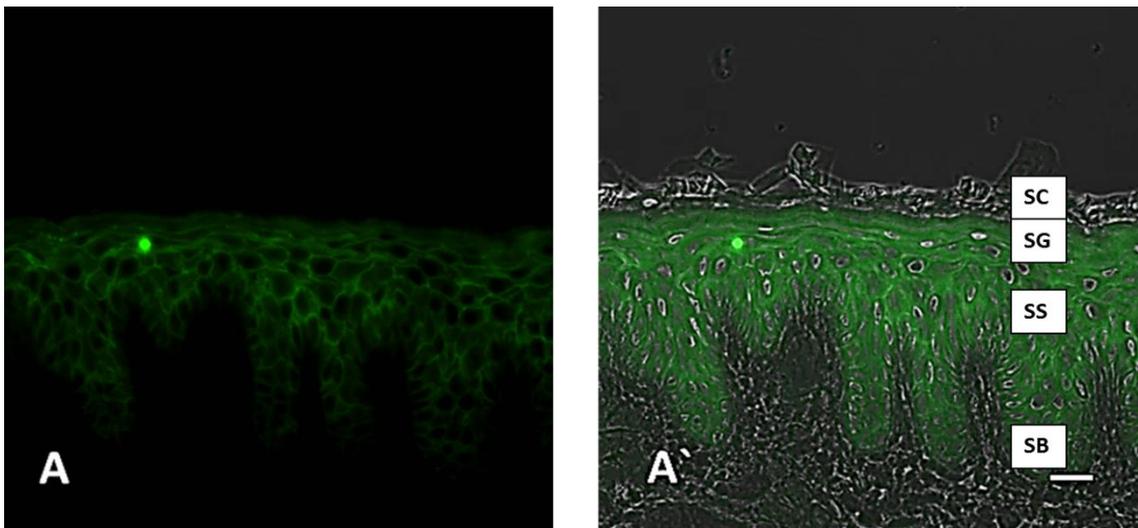


Abbildung 12: Beispielbild zur Auswertung der Intensität, Schicht und Verteilung der Immunfärbung hier für Claudin 1 (grün) in der unbeteiligten Epidermis (A, A'), A zeigt die Immunfluoreszenz, A' die Überlagerung mit dem Phasenkontrast, zusätzlich eingezeichnet die Schichten der Haut: SC = Stratum corneum, SG = Stratum granulosum, SS = Stratum spinosum und SB = Stratum basale; Größenstandard 50 µm; Intensität hier ein Score von 2, Schicht von 4 (siehe 3.5.2) und Verteilung von 2 (siehe 3.5.3). (Intensität ist generell nicht absolut zu bewerten, sondern jeweils im Vergleich mit den anderen Konzentrationen eines Schweines, da es hier individuelle Unterschiede gibt.)

3.5.2 Lokalisation in den Schichten

Eine weitere Beurteilung erfolgte für die Lokalisation des Proteins in den einzelnen Schichten.

0	Das Protein war nicht angefärbt.
1	Das Protein war im Stratum granulosum angefärbt.
2	Das Protein war im Stratum granulosum und oberen Stratum spinosum angefärbt.
3	Das Protein war im Stratum granulosum und gesamten Stratum spinosum angefärbt.
4	Das Protein war in allen lebenden Zellschichten angefärbt (inkl. Stratum basale.)

Tabelle 7: Score für die Schichtverteilung

Hierbei konnte in den Bereichen UN und WR zwischen den vier Schichten unterschieden und daher Werte zwischen 1 und 4 vergeben werden (0 bei negativer Färbung). In den Bereichen WZ und SP waren die einzelnen Schichten noch nicht zu differenzieren, daher wurde der Score hier angepasst. Ein Score von 2 bedeutete dort, dass das Protein in allen regenerierten Schichten angefärbt war, ein Score von 1, dass es nur in den oberen Schichten angefärbt war.

3.5.3 Verteilung (ZZ/IZ)

Zur Beurteilung der Verteilung der einzelnen Proteine innerhalb einer Zelle wurde ebenfalls ein Score verwendet. Hierbei wurde im Einzelnen beurteilt, ob das Protein mehr an den Zell-Zell-Grenzen (ZZ) oder intrazellulär (IZ) angefärbt war. Es waren ganzzahlige Werte zwischen 1-3 möglich (0 bei negativer Färbung).

0	Das Protein war nicht angefärbt.
1	Das Protein war an den Zell-Zell-Grenzen und intrazellulär etwa gleich angefärbt.
2	Das Protein war etwas mehr an den Zell-Zell-Grenzen angefärbt als intrazellulär.
3	Das Protein war deutlich mehr an den Zell-Zell-Grenzen angefärbt als intrazellulär.

Tabelle 8: Score für die Verteilung (ZZ/IZ)

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Susanne Lezius aus dem Institut für Biometrie und Epidemiologie. Zur Berechnung wurde das Programm SPSS in der Version 21/22 benutzt. Für die Auswertung der Daten von Wundheilung, Wundranderhaltung sowie von Immunfluoreszenzfärbung (Intensität, Verteilung, Schicht) wurde jeweils ein eigenes linear-mixed-model erstellt. Zunächst wurde jeweils die Wechselwirkungen der Östrogenkonzentration mit dem Geschlecht überprüft. Dann wurde überprüft, inwieweit die Länge der Wundzunge abhängig war von der Art der Applikation, der Konzentration und dem Geschlecht.

Im zweiten Modell wurde überprüft, inwieweit die Wundranderhaltung abhängig war von der Art der Applikation, der Konzentration und dem Geschlecht. Ergänzend wurde ein weiteres Modell zur Überprüfung der Abhängigkeit der Wundranderhaltung von der Länge der Wundzunge berechnet.

Für die Immunfluoreszenzen wurde jeweils berechnet, inwieweit die Länge der Wundzunge abhängig war von der Schichtverteilung, Intensität und Verteilung der Proteine innerhalb der Zellen. Hier wurden zunächst die Daten aller Messorte gemeinsam betrachtet und dann jeweils nach den einzelnen Orten gefiltert (UN, WR, WZ, SP). Darüber hinaus wurde berechnet, inwieweit Intensität, Schichtverteilung und Verteilung der Proteine innerhalb der Zellen abhängig waren von den jeweiligen Messorten, der Östrogenkonzentration und dem Geschlecht.

Zur graphischen Darstellung und Veranschaulichung wurden aufgrund der Daten Diagramme mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 erstellt und zum Teil mit Microsoft PowerPoint 2010 weiter bearbeitet.

4 Ergebnisse

4.1 Wundheilungsfortschritt

Eine der zentralen Fragen dieser Arbeit war, ob die Wundheilung im ex-vivo Modell durch die Behandlung mit Östrogen beeinflusst wird. Dabei wurden insgesamt 21 Wundmodelle weiblicher (n=5) und kastrierter männlicher (n=16) Schweine ausgewertet, die mit verschiedenen Konzentrationen Östrogen entweder direkt oder indirekt über das Medium behandelt worden waren (s. Doktorarbeit Dr. Carmen Klingelhöller, geb. Krüger). Betrachtete man nur die Art der Applikation, also die direkte Gabe und die Östrogengabe über das Medium, so fand sich kein signifikanter Unterschied in der Wundheilung ($p=0,399$; Abbildung 13). Deshalb wurde für die folgenden Auswertungen des Wundheilungsfortschrittes dieser Parameter nicht mehr gesondert berücksichtigt.

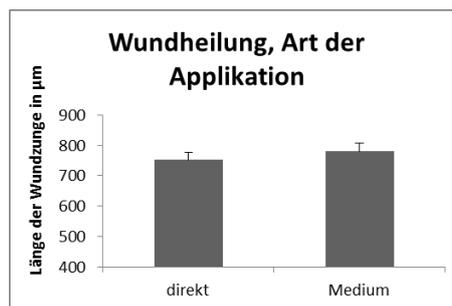


Abbildung 13: Wundheilung in den verschiedenen Applikationen mit Standardfehler; direkte Applikation MW 752 µm ± 23 µm (n=21); Applikation über das Medium MW 780 µm ± 27 µm (n=21); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

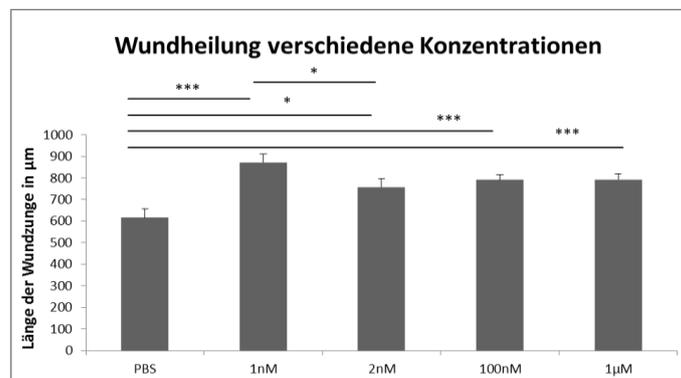


Abbildung 14: Wundheilung im Gesamtkollektiv in den verschiedenen Konzentrationen (PBS n=18; 1 nM n=20; 2 nM n=18; 100 nM n=20; 1 µM n=20). Mittelwerte mit Standardfehler in µm; (***) $p < 0,001$ von PBS verschieden, * $p < 0,05$ von PBS verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Verglich man den Heilungsfortschritt der unterschiedlichen Konzentrationen, so fand sich die geringste Heilung in der PBS-Kontrolle ((MW 617 $\mu\text{m} \pm 39 \mu\text{m}$) (Abbildung 14).

Der Unterschied zu den mit Östrogen behandelten Modellen des Gesamtkollektives (männliche und weibliche Schweine, beide Arten der Applikation) war in jeder Konzentration signifikant (1 nM ($p < 0,001$); 2 nM ($p = 0,016$); 100 nM ($p < 0,001$); 1 μM ($p < 0,001$), siehe Abbildung 14). Die Konzentration von 1 nM heilte im Gesamtkollektiv besser als alle anderen Konzentrationen (MW 873 $\mu\text{m} \pm 38 \mu\text{m}$). Dieser Unterschied war signifikant im Vergleich zu PBS ($p < 0,001$) und 2 nM ($p = 0,043$), knapp nicht signifikant im Vergleich zu 100 nM ($p = 0,052$) und 1 μM ($p = 0,067$). Anschließend wurden die Konzentrationen, in denen es sowohl direkte Applikation als auch Applikation über das Medium gab, d.h. 100 nM und 1 μM , differenziert betrachtet. Getrennt betrachtet fiel auf, dass Modelle, die in diesen Konzentrationen über das Medium behandelt wurden, eine leicht bessere Wundheilung aufwiesen (100 nM: 818 $\mu\text{m} \pm 37 \mu\text{m}$ über das Medium zu 767 $\mu\text{m} \pm 30 \mu\text{m}$ direkt; 1 μM : 814 $\mu\text{m} \pm 39 \mu\text{m}$ über das Medium zu 771 $\mu\text{m} \pm 37 \mu\text{m}$ direkt). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Generell führten beide Applikationsarten zu einer signifikant beschleunigten Wundheilung im Vergleich zu PBS.

Verglich man die Geschlechter über alle Konzentrationen, so heilten die Modelle kastrierter Männchen (Mittelwert 816 $\mu\text{m} \pm 18 \mu\text{m}$) signifikant besser als die weiblichen (Mittelwert 716 $\mu\text{m} \pm 32 \mu\text{m}$) ($p = 0,011$) (siehe Abbildung 15).

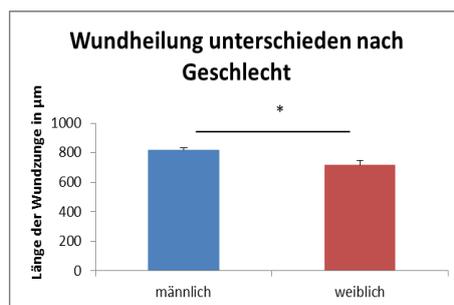


Abbildung 15: Wundheilung unterschieden nach Geschlecht mit Standardfehler in μm (blau=männlich, $n=16$; rot=weiblich, $n=5$); * = $p < 0,05$; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Die mit PBS behandelte Kontrolle unterschied sich zwischen den Geschlechtern aber nicht signifikant (Mittelwert männlich 657 $\mu\text{m} \pm 42 \mu\text{m}$ und weiblich 604 $\mu\text{m} \pm 74 \mu\text{m}$; ($p = 0,525$)). Konsequenterweise zeigte dann aber ein Vergleich der Geschlechter aller mit Östrogen behandelten Modelle (d.h. ohne PBS) eine signifikant bessere Heilung

bei kastrierten Männchen (Mittelwert männlich $850 \mu\text{m} \pm 18 \mu\text{m}$ und weiblich $759 \mu\text{m} \pm 35 \mu\text{m}$; ($p=0,028$)).

Vergleich man die einzelnen Konzentrationen zwischen den Geschlechtern, so zeigten sich in den Konzentrationen 1 nM ($p=0,208$), 2 nM ($p=0,995$) und 1 μM ($p=0,139$) keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 16). Signifikante Unterschiede gab es jedoch bei der Konzentration 100 nM ($p=0,004$). Hier heilten die Modelle männlicher Schweine besser als die weiblichen.

Insgesamt betrachtet zeigte sich jede Konzentration bei den männlichen Modellen signifikant verschieden zur Kontrolle mit PBS (1 nM ($p<0,001$), 2 nM ($p=0,026$), 100 nM ($p<0,001$) und 1 μM ($p<0,001$)). Bei den weiblichen Modellen war kein signifikanter Unterschied festzustellen (1 nM ($p=0,064$), 2 nM ($p=0,430$), 100 nM ($p=0,586$) und 1 μM ($p=0,430$)). Es zeigte sich jedoch auch hier der Trend, dass die behandelten Modelle besser heilten als die Kontrolle mit PBS. Darüber hinaus muss die geringe Zahl der Modelle von weiblichen Schweinen berücksichtigt werden.

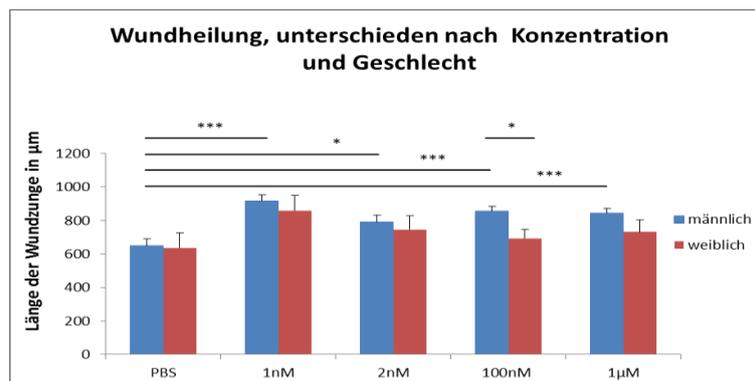


Abbildung 16: Wundheilung unterschieden nach Konzentrationen und Geschlecht mit Standardfehler in μm (blau=männlich, PBS n=14; 1 nM n=16; 2 nM n=13; 100 nM n=15; 1 μM n=16; rot=weiblich, PBS n=4; 1 nM n=4; 2 nM n=5; 100 nM n=5; 1 μM n=4); * = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model**

4.2 Wundranderhaltung

Bei der Beurteilung des Wundrandes stellte sich die Frage, inwieweit die Wundranderhaltung abhängig von der Art der Applikation, der Konzentration und dem Geschlecht ist. Bei der Art der Applikation sah generell betrachtet die direkte Applikation am Wundrand (MW 1,44, \pm 0,04) schlechter aus als bei Gabe über das Medium (MW 1,57, \pm 0,04), dieser Unterschied war signifikant ($p=0,019$) (siehe Abbildung 17).

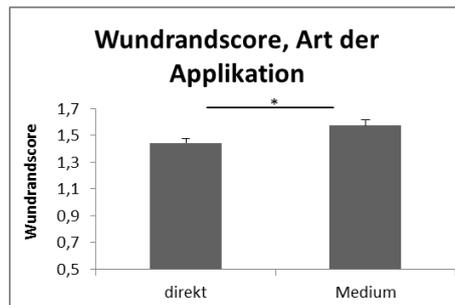


Abbildung 17: Wundrandscore unterteilt nach Art der Applikation mit Standardfehler, direkte Applikation (n=21) MW 1,44, \pm 0,04, Medium (n=21) MW 1,57, \pm 0,04; * = $p < 0,05$, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man den Einfluss der Östrogenkonzentrationen innerhalb einer Applikationsart auf die Wundranderhaltung, so konnte bei direkter Applikation beobachtet werden, dass alle 3 Konzentrationen eine Tendenz zur schlechteren Wundranderhaltung hatten, die für 100 nM am ausgeprägtesten und signifikant war (Abbildung 18). Bei der indirekten Applikation beobachtete man bei keiner Konzentration einen Einfluss auf die Wundranderhaltung.

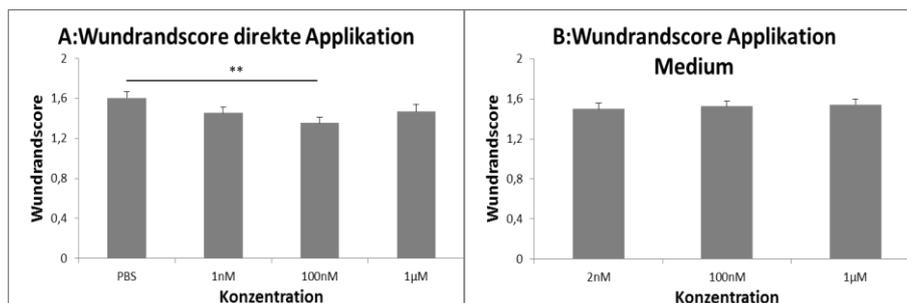


Abbildung 18: Wundrandscore unterschieden nach Konzentration und Art der Applikation mit Standardfehler: direkte Applikation (PBS MW 1,61 \pm 0,06 (n=18); 1 nM MW 1,46 \pm 0,06 (n=20); 100 nM MW 1,36 \pm 0,06 (n=20); 1 μ M MW 1,47 \pm 0,07 (n=20)), B: Applikation über das Medium (2 nM MW 1,50 \pm 0,05 (n=18); 100 nM MW 1,52 \pm 0,05 (n=20); 1 μ M MW 1,54 \pm 0,07 (n=19)); ** = $p < 0,01$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Zwischen den Geschlechtern (siehe Abbildung 19) gab es insgesamt gesehen keine signifikanten Unterschiede ($p=0,669$; MW $m=1,50, \pm 0,03$; $w=1,52, \pm 0,05$) in der Wundranderhaltung.

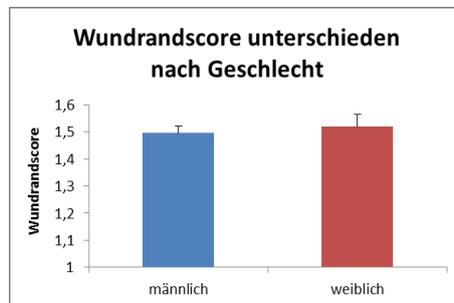


Abbildung 19: Wundrandscore unterschieden nach Geschlecht mit Standardfehler); männlich MW $1,50 \pm 0,03$ ($n=16$), weiblich MW $1,52 \pm 0,05$ ($n=5$), keine signifikanten Unterschiede; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model.

Vergleich man die Wundranderhaltung bei den direkt applizierten Modellen männlicher Spender mit den direkt applizierten bei weiblichen Spendern bei verschiedenen Östrogenkonzentrationen, sah man bei den direkt applizierten weiblichen eine deutlich schlechtere Erhaltung bei $1 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 20). Hier unterschieden sich die Geschlechter signifikant ($p=0,019$). Bei niedrigeren Konzentrationen war die Erhaltung ähnlich oder sogar tendenziell besser bei den Modellen weiblicher Spender.

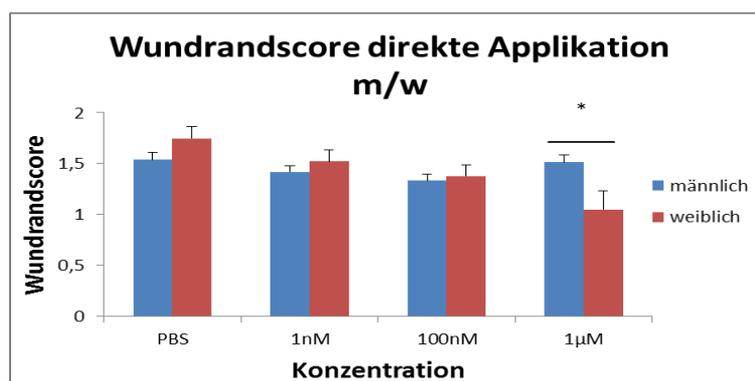


Abbildung 20: Wundrandscore in direkter Applikation unterschieden nach Geschlecht und Konzentration mit Standardfehler; blau = männlich (PBS $n=14$; 1 nM $n=16$; 100 nM $n=15$; 1 μM $n=16$) und rot = weiblich (PBS $n=4$; 1 nM $n=4$; 100 nM $n=5$; 1 μM $n=3$); * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Bei der Gabe über das Medium zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Wund-
randerhaltung zwischen den Modellen weiblicher und männlicher Schweine bei den
verschiedenen Östrogenkonzentrationen (siehe Abbildung 21).

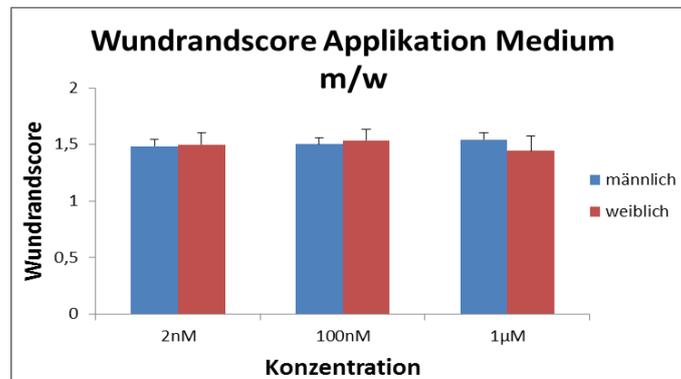


Abbildung 21: Wundrandscore indirekte Applikation über das Medium unterschieden nach Geschlecht und Konzentration mit Standardfehler) blau = männlich (2 nM n=13; 100 nM n=15; 1 µM n=16) und rot = weiblich (2 nM n=5; 100 nM n=5; 1 µM n=3); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Bei der Frage nach dem Zusammenhang der Erhaltung des Wundrandes und des Wundheilungsfortschritts ergab sich kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,362$).

4.3 Immunhistochemische Färbung

4.3.1 Claudin 1

Das Tight-Junction-Protein Claudin 1 konnte in allen lebenden Zellschichten der unbeteiligten und unbehandelten Epidermis lokalisiert werden (siehe Abbildung 22), vergleichbar zu vorherigen Ergebnissen bei Mensch und Schwein (Brandner et al. 2002, Ohnemus et al. 2008). Bei den Färbungen wurden jeweils die Intensität der Färbung, die Verteilung in den jeweiligen Hautschichten und die Lokalisation von Claudin 1 innerhalb der Zelle beurteilt (siehe Methoden Kapitel 3.5). Im statistischen Modell ließ sich dann berechnen, inwieweit die Länge der Wundzunge von der Intensität, der Schichtverteilung und der Lokalisation von Claudin 1 an den Messorten (unbeteiligte Epidermis, Wundrand, Wundzunge/regenerierende Epidermis, Wundspitze) abhing.

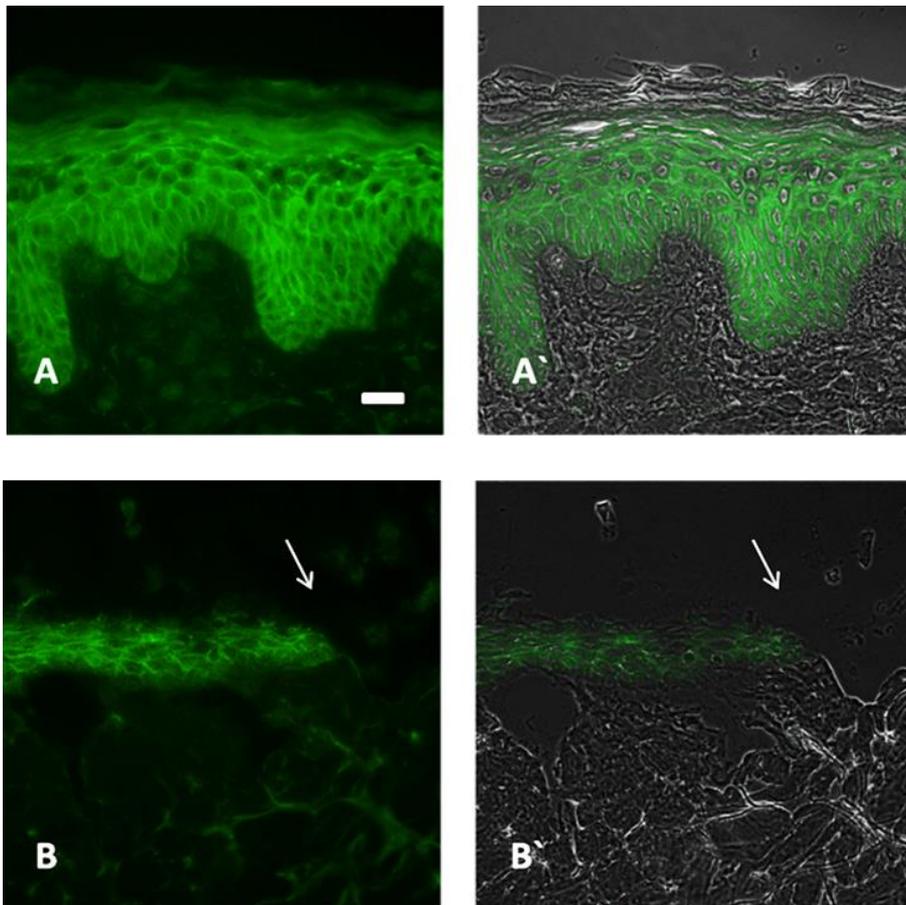


Abbildung 22: Beispiele für Intensität, Schicht und Verteilung von Claudin 1 (grün) in der unbeteiligten Epidermis (A, A') und an der Wundzunge (B, B', der Pfeil markiert die Spitze); A/B Immunfluoreszenz, A'/B' Überlagerung von Fluoreszenz und Phasenkontrast; A: Die unbeteiligte Epidermis erhielt den Score 3 (von max. 3) für die Intensität, 4 (von max. 4) für die Schichtverteilung und 2 (von max. 3) für die Verteilung innerhalb der Zelle; B: die Spitze der Wundzunge erhielt den Score 2 (von max. 3) für die Intensität, 2 (von max. 4) für die Schichtverteilung und einen Score von 2 (von max. 3) für die Verteilung innerhalb der Zelle; Größenstandard 50 µm

4.3.1.1 Intensität von Claudin 1

Abhängigkeit der Claudin-1-Intensität vom Messort

Alle Wundmodelle wurden 48 Stunden nach Verwundung abgestoppt. Danach wurden die entsprechenden Proteine immunhistochemisch angefärbt (siehe Methoden). Bei der Betrachtung der immunhistochemischen Färbungen von Claudin 1 ließ sich bei der mit PBS (A) behandelten Kontrolle feststellen, dass die unbeteiligte Epidermis (UN) intensiver gefärbt war als alle anderen Messorte (siehe Abbildung 23). Auch der Wundrand (WR) war intensiver gefärbt als Wundzunge (WZ) und Spitze (SP), aber weniger hell als die unbeteiligte Epidermis. Je weiter man zur Spitze der Wundzunge kam, desto weniger intensiv war im Mittel die Fluoreszenz-Färbung.

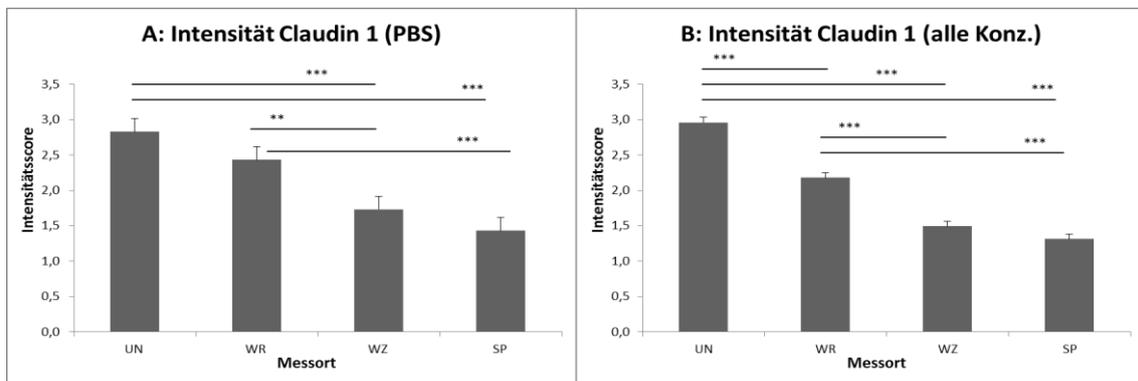


Abbildung 23: **A:** Intensität von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten der mit PBS behandelten Kontrolle, beurteilt nach Score; MW UN (unbeteiligte Epidermis) $2,83 \pm 0,19$, WR (Wundrand) $2,43 \pm 0,19$, WZ (Wundzunge) $1,73 \pm 0,19$ und SP (Spitze der regenerierenden Epidermis) $1,42 \pm 0,19$ (n=12); **B:** Intensität von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in allen Konzentrationen, beurteilt nach Score; MW UN (unbeteiligte Epidermis) $2,96 \pm 0,07$, WR (Wundrand) $2,18 \pm 0,07$, WZ (Wundzunge) $1,49 \pm 0,07$ und SP (Spitze der regenerierenden Epidermis) $1,31 \pm 0,07$ (n=12); *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man die mit Östrogen behandelten immunhistochemischen Färbungen von Claudin 1 so ließ sich feststellen, dass es im Vergleich zur Kontrolle mit PBS auch einen signifikanten Unterschied zwischen der unbehandelten Epidermis und dem Wundrand gab. Die Färbung war am Wundrand weniger intensiv. Die Intensitätsunterschiede zwischen dem Wundrand und der Wundzunge waren in der Kontrolle mit PBS bereits sehr signifikant, in den mit Östrogen behandelten Modellen nun hoch signifikant.

Abhängigkeit von Claudin-1-Intensität von der Östrogenkonzentration

Im Gesamtmodell, d.h. über alle Messorte hinweg, gab es für Claudin 1 in den verschiedenen Östrogenkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 24).

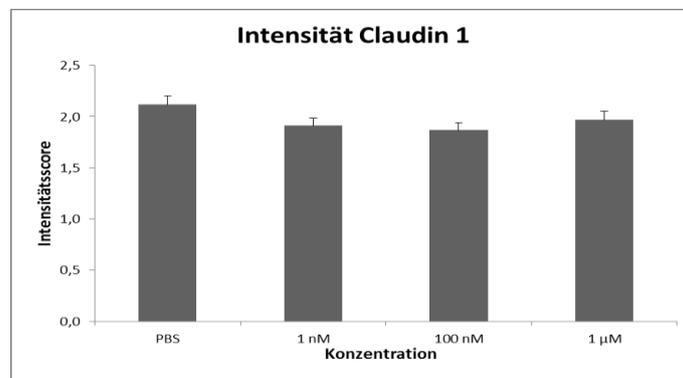


Abbildung 24: Intensität von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen an allen Messorten gemeinsam, beurteilt nach Score; MW PBS $2,12 \pm 0,08$ (n=11), 1 nM $1,91 \pm 0,07$ (n=11), 100 nM $1,87 \pm 0,07$ (n=11) und 1 µM $1,97 \pm 0,09$ (n=7); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man die Messorte einzeln, war am Messort Wundzunge ein signifikanter Unterschied zwischen PBS und 1nM zu finden ($p=0,032$). Die mit 1nM behandelten Modelle waren in der Wundzunge im Mittel weniger intensiv angefärbt als die Kontrolle mit PBS. Alle anderen Vergleiche waren nicht signifikant.

Abhängigkeit der Claudin-1-Intensität vom Geschlecht

Das Geschlecht beeinflusste die Intensität von Claudin 1 an keinem der Messorte und in keiner Konzentration signifikant unterschiedlich. Exemplarisch sind hier die Daten zusammenfassend über alle Messorte gezeigt (siehe Abbildung 25).

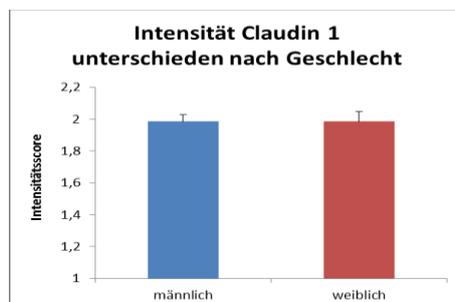


Abbildung 25: Intensität von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine beurteilt nach Score; MW männlich $1,99 \pm 0,04$ (n=8), weiblich $1,99 \pm 0,06$ (n=4); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.1.2 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Intensität der Claudin-1-Färbung

Im statistischen Modell konnte dann berechnet werden, inwieweit die Länge der Wundzunge abhängig war von der Intensität von Claudin 1 an den jeweiligen Messorten. Zur detaillierten Beurteilung wurden die Messorte einzeln betrachtet. An allen vier Messorten einzeln zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Länge der Wundzunge in Bezug auf die Intensität der Claudin-1-Färbung (UN ($p=0,608$), WR ($p=0,274$), WZ ($p=0,609$), SP ($p=0,323$)) (siehe Abbildung 26).

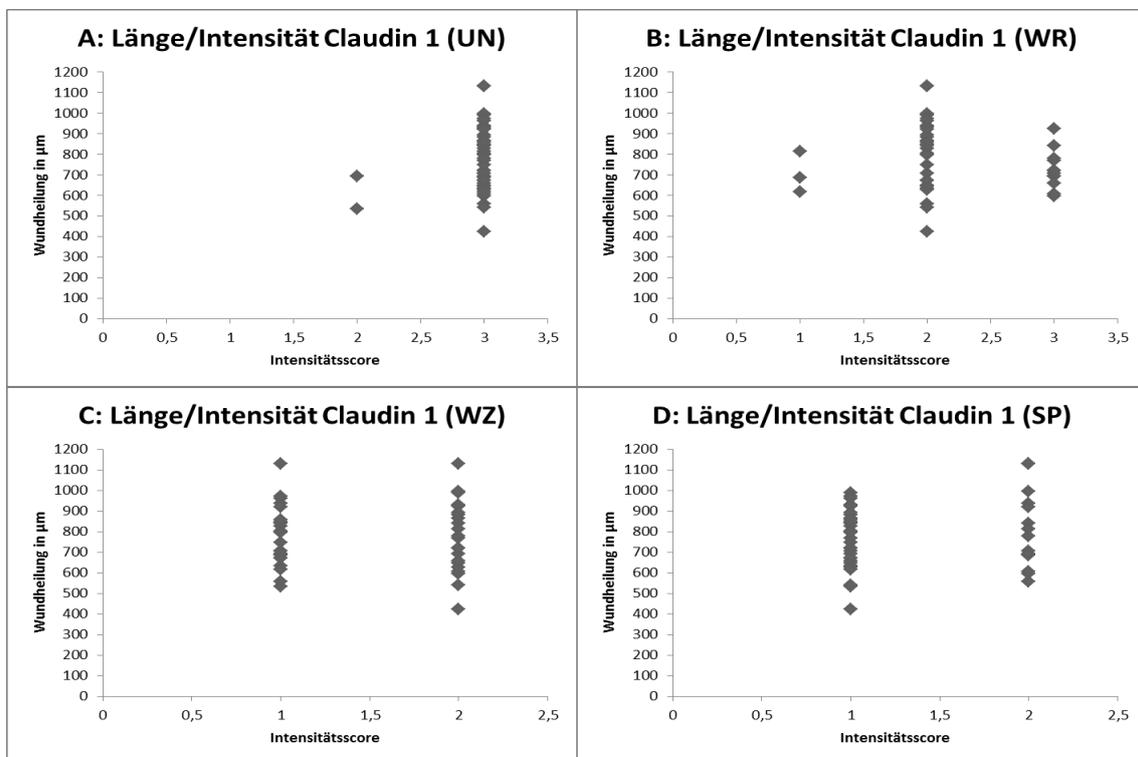


Abbildung 26: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Intensität der Claudin 1-Färbung an den jeweiligen Messorten (n=12); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.1.3 Schichtverteilung von Claudin 1

Abhängigkeit der Claudin-1-Schichtverteilung vom Messort

Auch bei der Betrachtung der Schichtverteilung fielen Unterschiede zwischen den Messorten auf. In der mit PBS behandelten Kontrolle zeigte sich Claudin 1 am Messort UN und WR fast immer in allen Schichten angefärbt. Zwischen Wundzunge und deren Spitze zeigten sich hoch signifikante Unterschiede. In der Wundzunge war Claudin 1 überwiegend in allen regenerierten Schichten angefärbt, während es in deren Spitze manchmal nur in den oberen Schichten angefärbt war (siehe Abbildung 27 (A und B)). Ein Vergleich zwischen den Messorten UN/WR einerseits und WZ/SP andererseits war nicht sinnvoll, da man 4 Schichten an UN/WR nicht mit 2 Schichten in WZ/SP vergleichen kann.

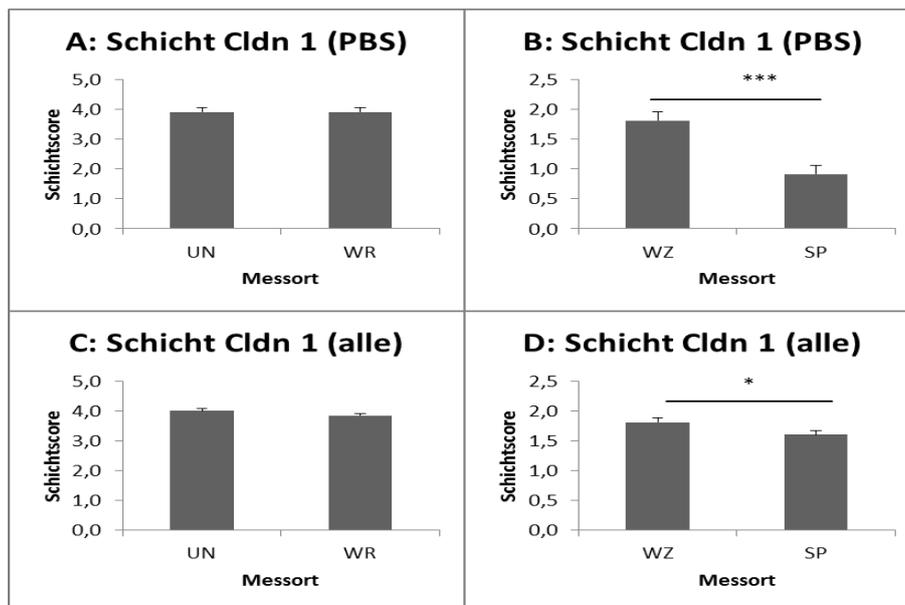


Abbildung 27: A+B: Schichtverteilung von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei der Kontrolle mit PBS, beurteilt nach Score; MW UN $3,92 \pm 0,15$ (n=12), WR $3,92 \pm 0,15$ (n=12), WZ $1,82 \pm 0,15$ (n=12) und SP $0,92 \pm 0,15$ (n=12); C+D: Schichtverteilung von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei den mit Östrogen behandelten Modellen, beurteilt nach Score; MW UN $4,00 \pm 0,07$ (n=12), WR $3,86 \pm 0,07$ (n=12), WZ $1,81 \pm 0,07$ (n=12) und SP $1,60 \pm 0,08$ (n=12); *** = $p < 0,001$ * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Bei den mit Östrogen behandelten Modellen war Claudin 1 am Messort UN immer in allen Schichten angefärbt. Am Wundrand war die Färbung nicht immer in allen Schichten vorhanden. In der Wundzunge und deren Spitze zeigte sich, dass Claudin 1 an der Spitze manchmal nur in den oberen Schichten angefärbt war, während es an der Wundzunge überwiegend in allen regenerierten Schichten angefärbt war (siehe Abbildung 27 (C und D)). Auch dieses war ein signifikantes Ergebnis, bei der Kontrolle mit PBS jedoch hoch signifikant. In etwa einem Drittel der Färbungen war dies an der Spitze der Wundzunge negativ für Claudin 1. An den Messorten UN, WR und WZ gab es keine Modelle, bei denen die Färbung negativ war.

Abhängigkeit der Claudin-1-Schichtverteilung von der Östrogenkonzentration

Die verschiedenen Östrogenkonzentrationen zeigten hier im Gesamtmodell über alle Messorte hinweg keine signifikanten Unterschiede ($p=0,759$) (siehe Abbildung 28).

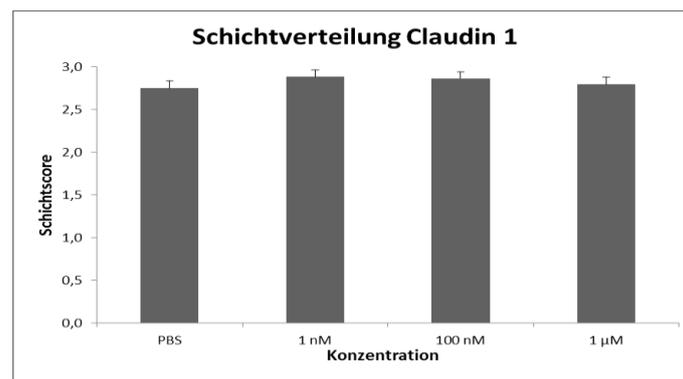


Abbildung 28: Schichtverteilung von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (an allen Messorten gemeinsam), beurteilt nach Score; MW PBS 2,75 ± 0,09 (n=11), 1 nM 2,88 ± 0,08 (n=12), 100 nM 2,86 ± 0,08 (n=11) und 1 µM 2,79 ± 0,10 (n=7); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man die Messorte einzeln, so zeigte sich an der Spitze der Wundzunge ein signifikanter Unterschied zwischen PBS und 1nM ($p=0,045$) sowie 100nM ($p=0,012$) und knapp nicht bei 1 μ M ($p=0,054$). Claudin 1 war in der mit PBS behandelten Kontrolle an der Wundspitze im Mittel weniger breit über die Schichten verteilt als in den mit Östrogen behandelten Schnitten (siehe Abbildung 29). An der SP war Claudin 1 zudem in 36% der mit PBS behandelten Kontrolle und bei 9% der mit 1 nM behandelten Modelle nicht anzufärben. In den höheren Konzentrationen gab es keine negativen Färbungen.

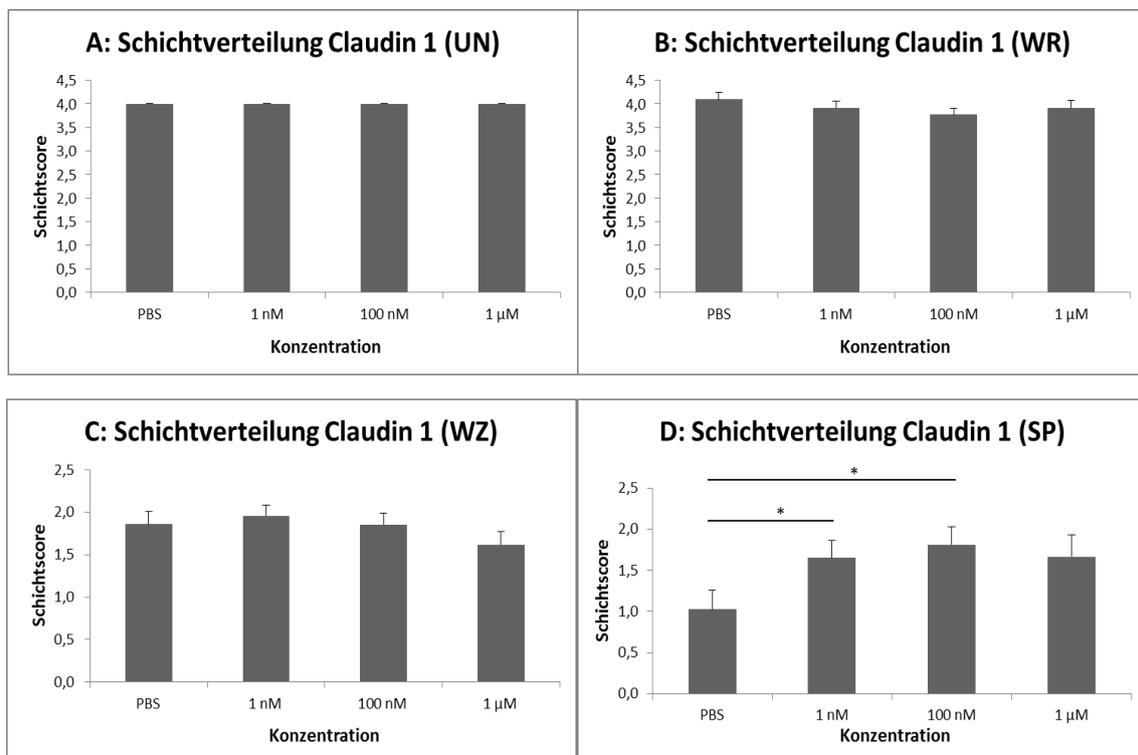


Abbildung 29: Schichtverteilung von Claudin 1 an einzelnen Messorten in der Immunfluoreszenz und den verschiedenen Konzentrationen, beurteilt nach Score; A (UN): MW PBS $4,00 \pm 0,00$ ($n=11$), 1 nM $4,00 \pm 0,00$ ($n=11$), 100 nM $4,00 \pm 0,00$ ($n=11$) und 1 μ M $4,00 \pm 0,00$ ($n=7$); B (WR): MW PBS $4,00 \pm 0,16$ ($n=11$), 1 nM $3,92 \pm 0,14$ ($n=11$), 100 nM $3,78 \pm 0,13$ ($n=11$) und 1 μ M $3,92 \pm 0,16$ ($n=7$); C (WZ): MW PBS $1,86 \pm 0,15$ ($n=11$), 1 nM $1,96 \pm 0,13$ ($n=11$), 100 nM $1,86 \pm 0,13$ ($n=10$) und 1 μ M $1,62 \pm 0,15$ ($n=7$); D (SP): MW PBS $1,03 \pm 0,24$ ($n=11$), 1 nM $1,65 \pm 0,21$ ($n=11$), 100 nM $1,81 \pm 0,21$ ($n=10$) und 1 μ M $1,67 \pm 0,27$ ($n=6$); * = $p < 0,05$ signifikant verschiedene statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Am Wundrand zeigte die mit PBS behandelte Kontrolle eine durchgehende Abfärbung in allen Schichten. Die mit Östrogen behandelten Modelle wiesen prozentuale Unterschiede auf. Bei 1 nM waren 91%, bei 100 nM 82% und bei 1 µM 86% in allen Schichten angefärbt und damit weniger breit ausgeprägt (siehe Abbildung 30).

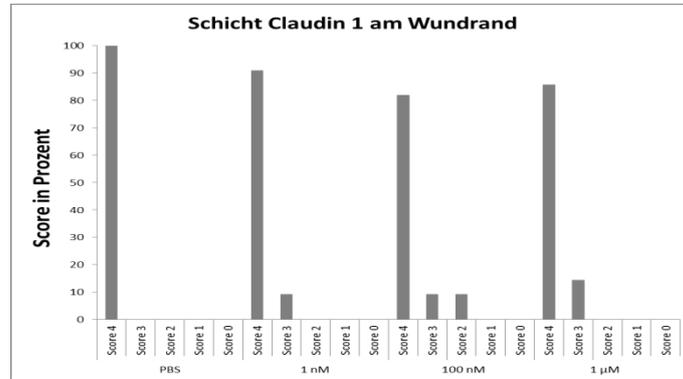


Abbildung 30: Schichtverteilung von Claudin 1 am Wundrand in Prozent; PBS Score 4 100% (n=11), 1 nM Score 4 91%, Score 3 9% (n=12), 100 nM Score 4 82%, Score 3 9%, Score 2 9% (n=11) und 1 µM Score 4 86%, Score 3 14% (n=7)

Abhängigkeit der Claudin-1-Schichtverteilung vom Geschlecht

Das Geschlecht beeinflusste die Schichtverteilung von Claudin 1 an keinem der Messorte und in keiner Konzentration signifikant unterschiedlich. Exemplarisch sind hier die Daten zusammenfassend über alle Messorte gezeigt (siehe Abbildung 31).

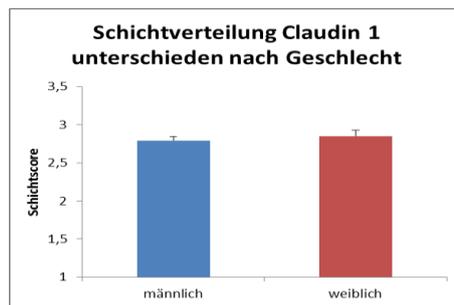


Abbildung 31: Schichtverteilung von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (über alle Messorte zusammen) beurteilt nach Score; MW männlich (n=8) 2,79 ± 0,05, weiblich 2,85 ± 0,08 (n=4); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.1.4 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Schichtverteilung von Claudin 1

An allen vier Messorten (siehe Abbildung 32) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Länge der regenerierenden Epidermis bezogen auf die Schichtverteilung von Claudin 1 (UN (redundant, da immer in allen Schichten), WR ($p=0,738$), WZ ($p=0,212$), SP ($p=0,496$)).

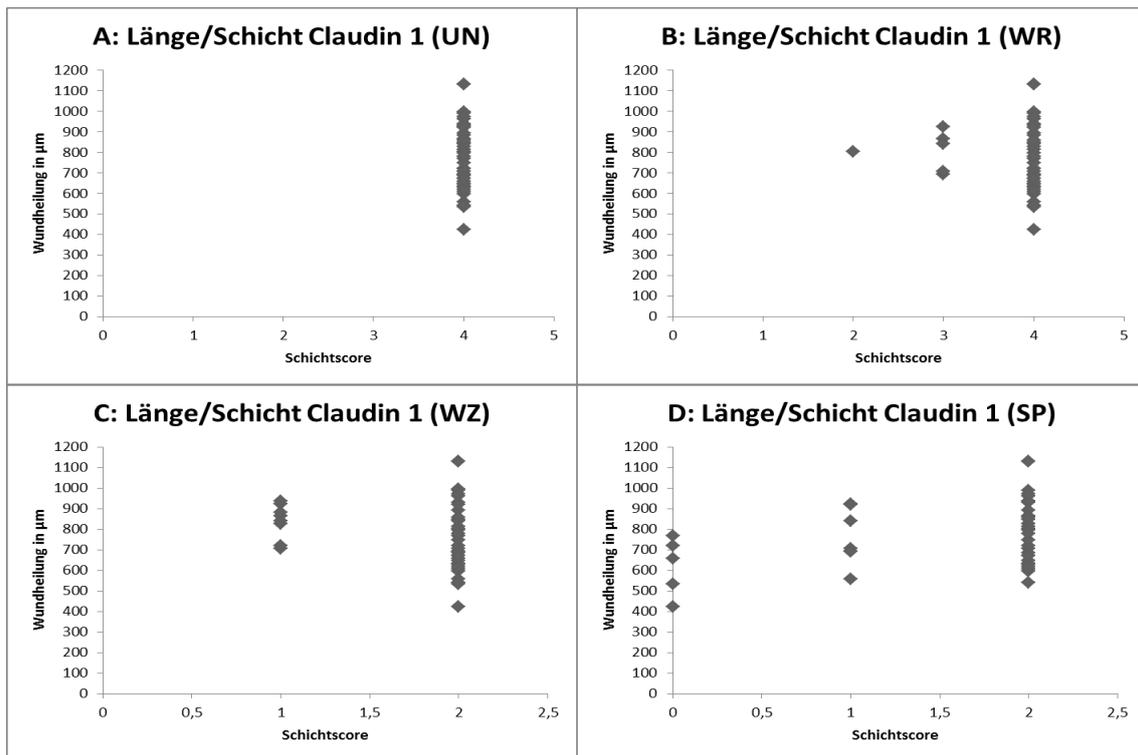


Abbildung 32: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Schichtverteilung der Claudin 1-Färbung an den jeweiligen Messorten (n=12); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.1.5 Verteilung von Claudin 1 innerhalb der Zelle (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär)

Abhängigkeit der zellulären Verteilung von Claudin 1 vom Messort

Betrachtete man die Verteilung von Claudin 1 innerhalb der Zelle bei der Kontrolle mit PBS (siehe Abbildung 33, A) so unterschied sich diese deutlich innerhalb der Messorte. Das Protein war an der unbeteiligten Epidermis stark auf die Zell-Zell-Grenzen bezogen. Vom Wundrand über die Wundzunge bis zu deren Spitze fand es sich zunehmend zytoplasmatisch lokalisiert.

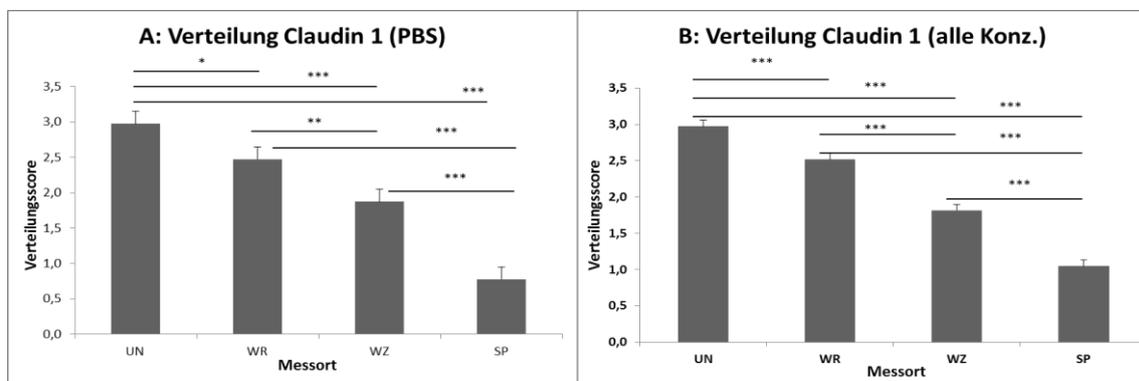


Abbildung 33: **A:** Verteilung von Claudin 1 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei Behandlung mit PBS, beurteilt nach Score; MW UN $2,97 \pm 0,17$ (n=12), WR $2,47 \pm 0,17$ (n=12), WZ $1,87 \pm 0,17$ (n=12) und SP $0,77 \pm 0,17$ (n=12); **B:** Verteilung von Claudin 1 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei den mit Östrogen behandelten Modellen, beurteilt nach Score; MW UN $2,97 \pm 0,09$ (n=12), WR $2,52 \pm 0,09$ (n=12), WZ $1,82 \pm 0,09$ (n=12) und SP $1,05 \pm 0,09$ (n=12); *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$ und * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man die zelluläre Verteilung von Claudin 1 in allen Konzentrationen so bestätigte sich das Ergebnis der Verteilung bei der Kontrolle mit PBS. Die Unterschiede zwischen UN und WR sowie zwischen WR und WZ waren hier statt sehr signifikant nun hoch signifikant ($p < 0,001$, siehe Abbildung 33, B).

Abhängigkeit der zellulären Verteilung von Claudin 1 von der Östrogenkonzentration

Die verschiedenen Östrogenkonzentrationen beeinflussten die Verteilung von Claudin 1 an keinem der Messorte. Exemplarisch sind hier die Daten zusammenfassend für alle Messorte gezeigt (siehe Abbildung 34).

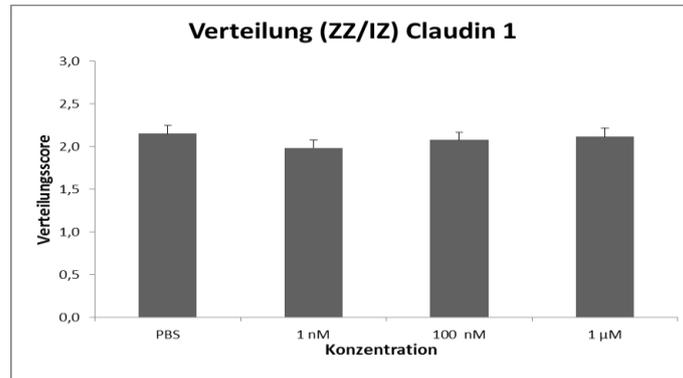


Abbildung 34: Verteilung (ZZ/IZ) von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (über alle Messorte zusammen), beurteilt nach Score; MW PBS 2,15 ± 0,10 (n=11), 1 nM 1,98 ± 0,09 (n=12), 100 nM 2,08 ± 0,09 (n=11) und 1 µM 2,11 ± 0,11 (n=7); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der zellulären Verteilung von Claudin 1 vom Geschlecht

Auch das Geschlecht beeinflusste die zelluläre Verteilung von Claudin 1 an keinem der Messorte und in keiner Konzentration signifikant unterschiedlich. Beispielhaft sind hier die Daten zusammenfassend für alle Messorte gezeigt (vgl. Abbildung 35).

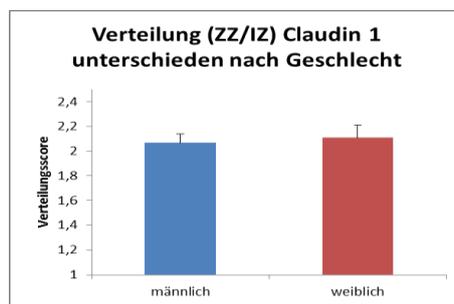


Abbildung 35: Verteilung (ZZ/IZ) von Claudin 1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (über alle Messorte gemeinsam), beurteilt nach Score; MW männlich 2,07 ± 0,07 (n=8), weiblich 2,11 ± 0,10 (n=4); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.1.6 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Verteilung von Claudin 1 innerhalb der Zelle (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär)

An allen vier Messorten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Länge der Wundzunge in Bezug auf die Verteilung (IZ/ZZ) der Claudin-1-Färbung (siehe Abbildung 36) (UN ($p=0,400$), WR ($p=0,246$), WZ ($p=0,353$), SP ($p=0,661$)).

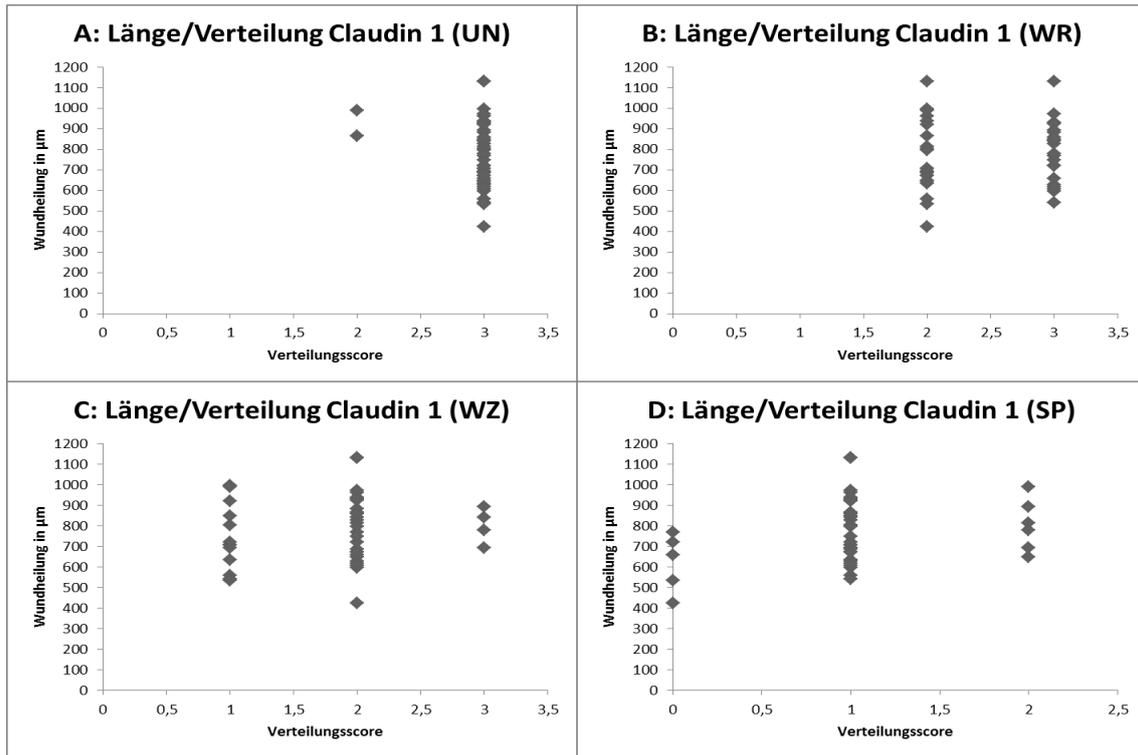


Abbildung 36: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Verteilung der Claudin 1-Färbung innerhalb der Zellen an den jeweiligen Messorten ($n=12$); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.1.7 Korrelation von Wundranderhaltung mit der Intensität, Schichtverteilung und Verteilung (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär) von Claudin 1 an den jeweiligen Messorten

Bei der Betrachtung, inwieweit die Wundranderhaltung abhängig ist von der Intensität von Claudin 1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied an den jeweiligen Messorten (UN $p=0,720$; WR $p=0,441$; WZ $p=0,561$; SP $p=0,294$).

Die Wundranderhaltung war ebenfalls nicht abhängig von der Schichtverteilung von Claudin 1 an den jeweiligen Messorten (UN (redundant, da immer in allen Schichten); WR ($p=0,852$); WZ ($p=0,072$); SP ($p=0,876$)) und ebenso gab es keinen signifikanten Unterschied der Wundranderhaltung in Bezug auf die Verteilung (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär) von Claudin 1 (UN ($p=0,276$); WR ($p=0,676$); WZ ($p=0,094$); SP ($p=0,679$)).

4.3.2 Claudin 4

Claudin 4 wurde in unbeteiligter Haut in den oberen lebenden Zellschichten lokalisiert (siehe Abbildung 37), ähnlich gesunder humaner Haut (Morita et al. 2004, Pummi et al. 2004, Brandner et al. 2006). Darüber hinaus wurde es auch in basalen Zellen nachgewiesen. Die basale Färbung ist in humaner Haut nicht vorhanden und wurde daher hier nicht mit ausgewertet. Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils die Intensität der Färbung, die Verteilung in den jeweiligen Hautschichten und die Lokalisation von Claudin 4 innerhalb der Zelle beurteilt (siehe Methoden Kapitel 3.5).

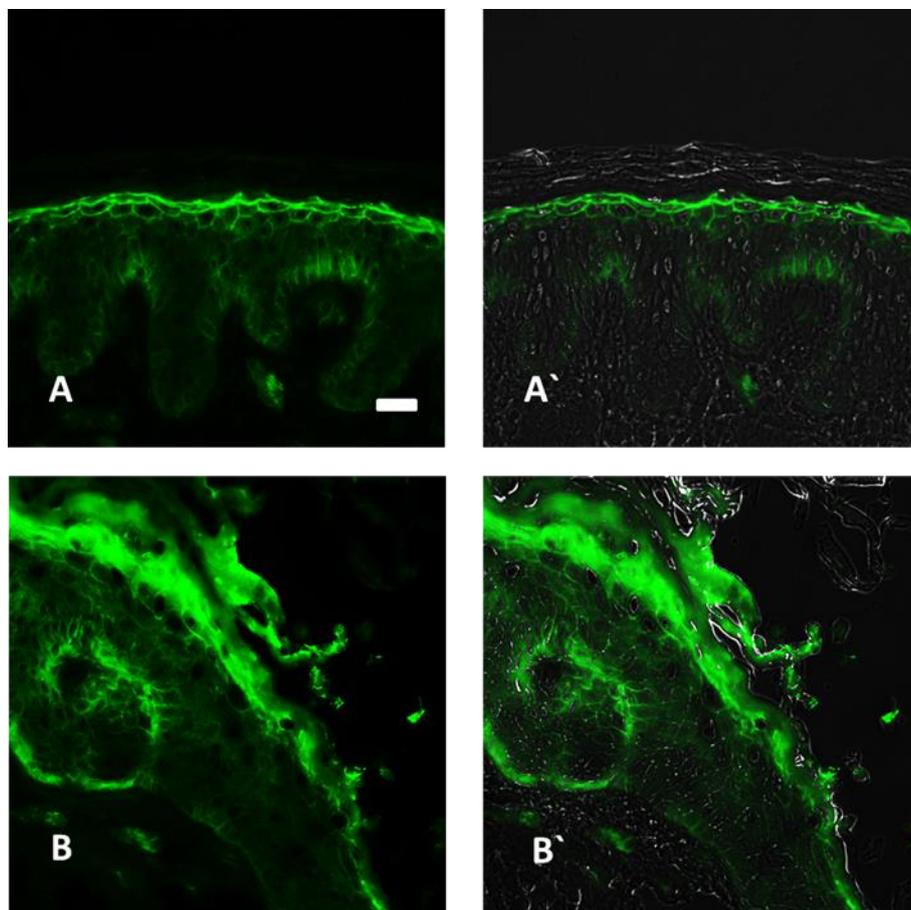


Abbildung 37: Beispiele für die Intensität, Schicht und Verteilung von Claudin 4 (grün) in der unbeteiligten Epidermis (A, A') und am Wundrand (B, B'); A/B Immunfluoreszenz, A'/B' Überlagerung von Fluoreszenz und Phasenkontrast; A: die unbeteiligte Epidermis erhielt den Score 2 (von maximal 3) für die Intensität, 2 (von maximal 4) für die Schichtverteilung und 3 (von maximal 3) für die Verteilung innerhalb der Zelle; B: der Wundrand erhielt den Score 3 (von maximal 3) für die Intensität, 2 (von maximal 4) für die Schichtverteilung und einen Score von 2 (von maximal 3) für die Verteilung innerhalb der Zelle; Größenstandard 50 µm

4.3.2.1 Intensität von Claudin 4

Abhängigkeit der Claudin-4-Intensität vom Messort

Alle Modelle wurden 48 Stunden nach Verwundung abgestoppt und die entsprechenden Proteine immunhistochemisch angefärbt (s. Methoden). Bei der Betrachtung der Intensität von Claudin 4 zeigten sich in der Kontrolle mit PBS Unterschiede zwischen den einzelnen Messorten (s. Abbildung 38, A). Die Intensität war in der unbeteiligten Epidermis am größten und nahm in Richtung Spitze der Wundzunge stetig ab. Signifikante Unterschiede zeigten sich in der Kontrolle nicht.

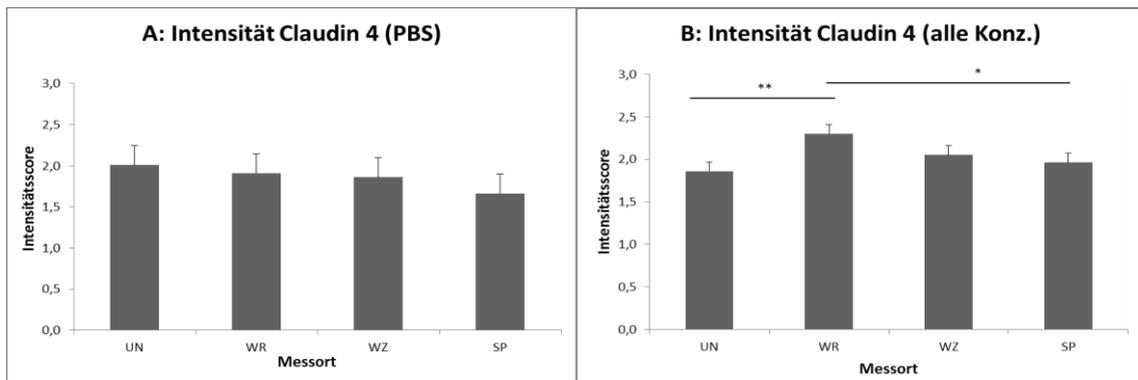


Abbildung 38: **A:** Intensität von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten, Kontrolle mit PBS, beurteilt nach Score; MW UN $2,01 \pm 0,24$ ($n=12$), WR $1,91 \pm 0,24$ ($n=12$), WZ $1,86 \pm 0,24$ ($n=12$) und SP $1,66 \pm 0,24$ ($n=12$); **B:** Intensität von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten, alle Konzentrationen, beurteilt nach Score; MW UN $1,86 \pm 0,11$ ($n=12$), WR $2,30 \pm 0,11$ ($n=12$), WZ $2,05 \pm 0,11$ ($n=12$) und SP $1,96 \pm 0,11$ ($n=12$); ** = $p < 0,01$ signifikant verschieden, ** $p < 0,01$, * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtet man die behandelten Modelle so fiel auf, dass die Intensität von Claudin 4 am WR am größten ($2,30 \pm 0,11$) war. Dieser Messort unterschied sich signifikant von der Spitze der Wundzunge und sehr signifikant von der unbeteiligten Epidermis (siehe Abbildung 38, B).

Abhängigkeit der Claudin-4-Intensität von der Östrogenkonzentration

In den jeweiligen Östrogenkonzentrationen (Abbildung 39) zeigten sich im Gesamtmodell, für alle Messorte gemeinsam, keine signifikanten Unterschiede in der Intensität von Claudin 4 ($p=0,548$).

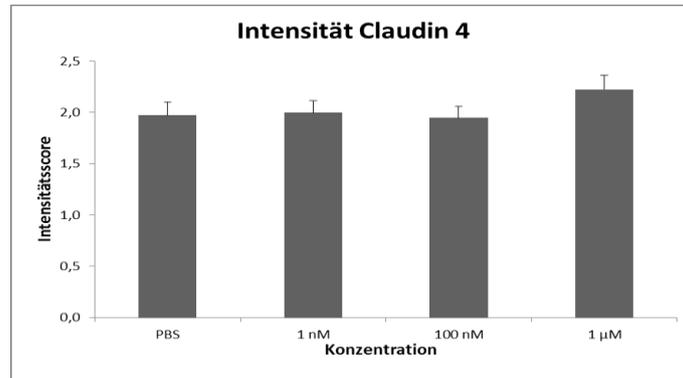


Abbildung 39: Intensität von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen, beurteilt nach Score; MW PBS $1,97 \pm 0,13$ ($n=11$), 1 nM $2,00 \pm 0,12$ ($n=11$), 100 nM $1,95 \pm 0,11$ ($n=11$) und 1 µM $2,23 \pm 0,14$ ($n=7$); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man die Messorte einzeln, so zeigte sich, dass am Wundrand die höchste Östrogenkonzentration die größte Intensität in der Claudin-4-Färbung aufwies. Der Unterschied war zu jeder anderen Konzentration (1nM $p=0,007$; 100nM $p=0,035$) und zur Kontrolle mit PBS ($p=0,014$) signifikant (siehe Abbildung 40).

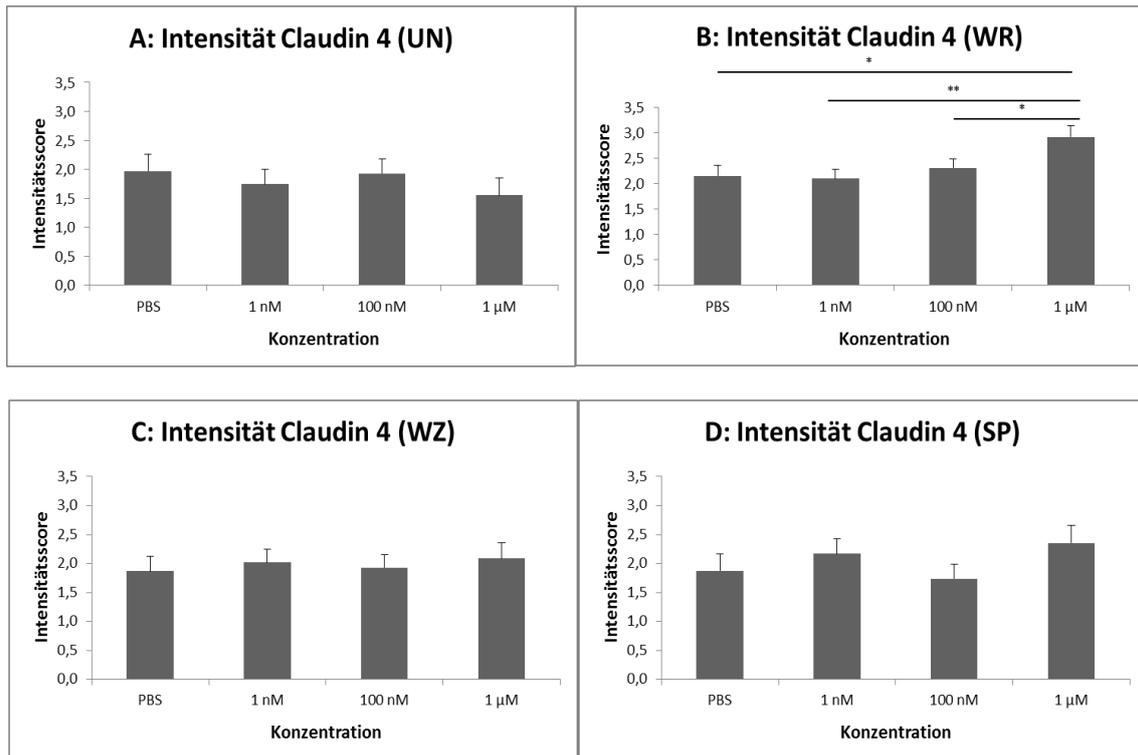


Abbildung 40: Intensität von Claudin 4 an den vier Messorten in der Immunfluoreszenz und den verschiedenen Konzentrationen, beurteilt nach Score; A (UN): MW PBS $1,97 \pm 0,28$ (n=11), 1 nM $1,75 \pm 0,25$ (n=11), 100 nM $1,93 \pm 0,25$ (n=11) und 1 μM $1,55 \pm 0,30$ (n=7); B (WR): MW PBS $2,15 \pm 0,21$ (n=11), 1 nM $2,10 \pm 0,19$ (n=11), 100 nM $2,31 \pm 0,18$ (n=11) und 1 μM $2,92 \pm 0,22$ (n=7); C (WZ): MW PBS $1,87 \pm 0,26$ (n=11), 1 nM $2,02 \pm 0,23$ (n=11), 100 nM $1,93 \pm 0,22$ (n=11) und 1 μM $2,09 \pm 0,27$ (n=7); D (SP): MW PBS $1,88 \pm 0,29$ (n=11), 1 nM $2,17 \pm 0,26$ (n=11), 100 nM $1,74 \pm 0,25$ (n=11) und 1 μM $2,35 \pm 0,30$ (n=6); ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$ signifikant verschieden, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der Claudin-4-Intensität vom Geschlecht

Das Geschlecht beeinflusste die Intensität von Claudin 4 an keinem der Messorte und in keiner Konzentration signifikant unterschiedlich ($p=0,725$). Exemplarisch sind hier die Daten zusammenfassend über alle Messorte gezeigt (siehe Abbildung 41).

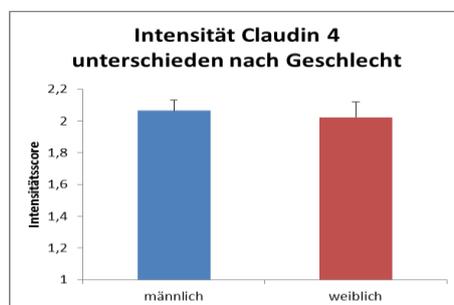


Abbildung 41: Intensität von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (an allen Messorten gemeinsam), beurteilt nach Score; MW männlich $2,07 \pm 0,07$ (n=8), weiblich $2,02 \pm 0,10$ (n=4); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.2.2 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Intensität von Claudin 4

Im statistischen Modell wurde berechnet, inwieweit die Länge der Wundzunge abhängig ist von der Intensität, von Claudin 4. An allen vier Messorten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Länge der Wundzunge bezogen auf die Intensität der Claudin-4-Färbung (siehe Abbildung 42) (UN ($p=0,779$), WR ($p=0,414$), WZ ($p=0,530$), SP ($p=0,325$)).

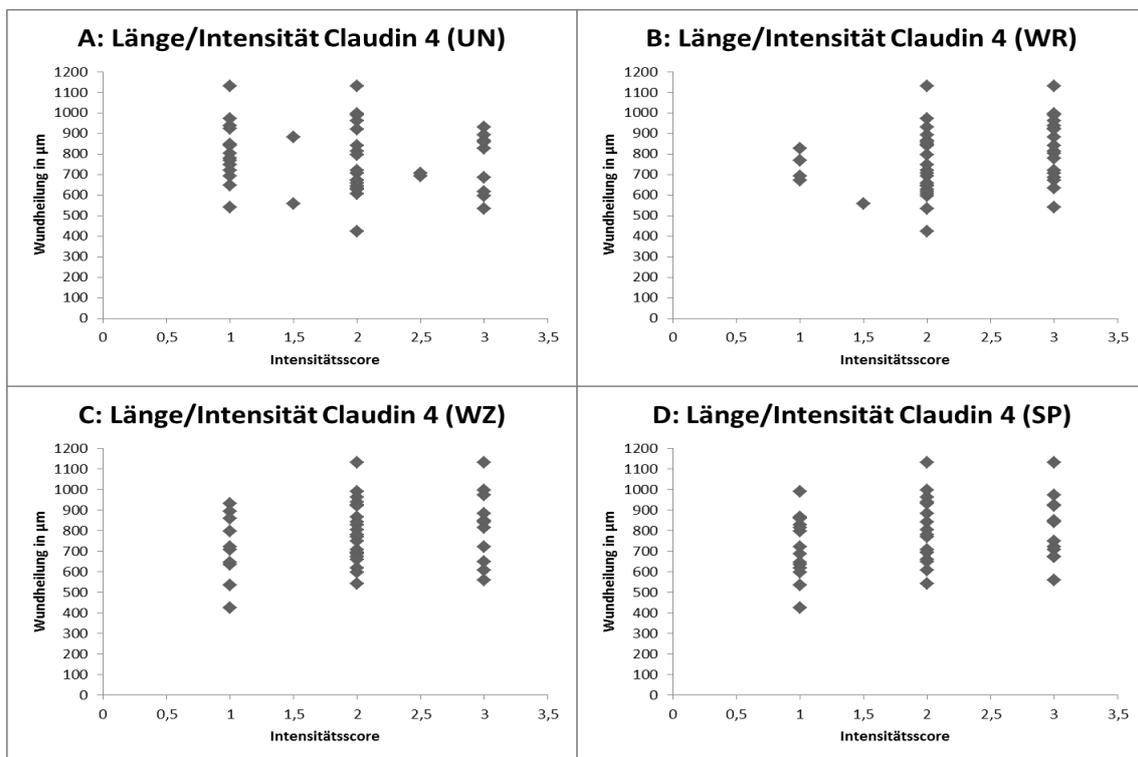


Abbildung 42: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Intensität der Claudin 4-Färbung an den jeweiligen Messorten ($n=12$); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.2.3 Schichtverteilung von Claudin 4

Abhängigkeit der Schichtverteilung von Claudin 4 vom Messort

Betrachtete man die Schichtverteilung von Claudin 4 in der Kontrolle mit PBS, so zeigten sich geringfügige Unterschiede zwischen den Messorten (siehe Abbildung 43, A und B). Am WR war Claudin 4 am breitesten über die Schichten verteilt. Der Unterschied zur unbeteiligten Epidermis war jedoch nicht signifikant. Die Messorte WZ und SP zeigten keinen Unterschied. Ein Vergleich zwischen den Messorten UN/WR und WZ/SP war nicht sinnvoll, da man 4 Schichten an UN/WR nicht mit 2 Schichten in WZ/SP vergleichen kann.

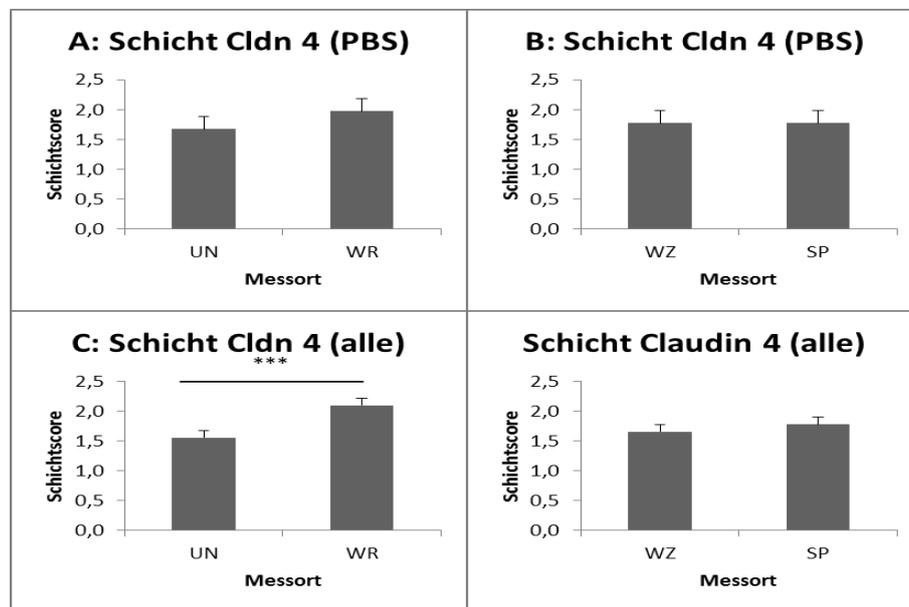


Abbildung 43: **A + B:** Schichtverteilung von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten, beurteilt nach Score; MW UN $1,68 \pm 0,22$ (n=12), WR $1,98 \pm 0,22$ (n=12), WZ $1,78 \pm 0,22$ (n=12) und SP $1,78 \pm 0,22$ (n=12); **C + D:** Schichtverteilung von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten, beurteilt nach Score; MW UN $1,56 \pm 0,12$ (n=12), WR $2,10 \pm 0,12$ (n=12), WZ $1,66 \pm 0,12$ (n=12) und SP $1,78 \pm 0,13$ (n=12); *** = $p < 0,001$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man die Schichtverteilung von Claudin 4 in allen Konzentrationen, so stellte man fest, dass der Unterschied zwischen der unbehandelten Epidermis und dem Wundrand nun einen hoch signifikanten Unterschied aufwies. Claudin 4 war am Wundrand deutlich breiter über die Schichten verteilt als am Messort UN (siehe Abbildung 43, C und D). Wundzunge und Spitze unterschieden sich leicht, hier zeigte sich jedoch kein signifikantes Ergebnis.

Abhängigkeit der Schichtverteilung von Claudin 4 von der Östrogenkonzentration

Die verschiedenen Östrogen-Konzentrationen beeinflussten die Schichtverteilung von Claudin 4 an keinem der Messorte signifikant ($p=0,644$). Beispielhaft sind hier die Daten zusammenfassend für alle Messorte gezeigt (siehe Abbildung 44).

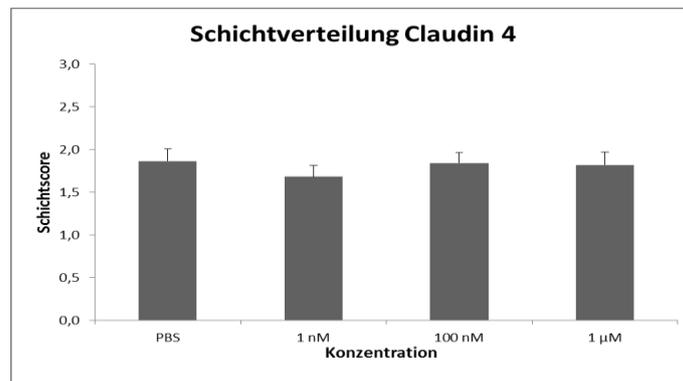


Abbildung 44: Schichtverteilung von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (über alle Messorte gemeinsam), beurteilt nach Score; MW PBS 1,87 ± 0,14 (n=11), 1 nM 1,68 ± 0,13 (n=11), 100 nM 1,84 ± 0,12 (n=11) und 1 µM 1,82 ± 0,15 (n=7); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Wie in Abbildung 43 (A+C) gezeigt war die Schichtverteilung von Claudin 4 am Wundrand signifikant verbreitert gegenüber allen anderen Messorten. Differenziert in den einzelnen Konzentrationen betrachtet, zeigte sich, dass bei der Kontrolle mit PBS hier 9% der Modelle eine Färbung des Stratum granulosum und gesamten Stratum spinosum (Score 3) oder aller Schichten (Score 4) aufwiesen. Bei Modellen die mit 1 nM Östrogen behandelt wurden, waren es 18%, bei 100 nM 55% und bei 1 µM 34%.

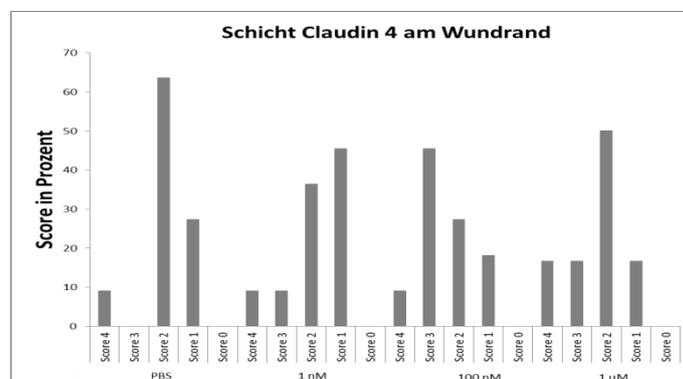


Abbildung 45: Schichtverteilung von Claudin 4 am Wundrand in Prozent; PBS Score 4 9%, Score 2 64%, Score 1 27% (n=11), 1 nM Score 4 9%, Score 3 9%, Score 2 36% und Score 1 46% (n=11), 100 nM Score 4 9%, Score 3 46%, Score 2 27% und Score 1 18% (n=11) und 1 µM Score 4 17%, Score 3 17%, Score 2 49% und Score 1 17% (n=7)

Abhängigkeit der Schichtverteilung von Claudin 4 vom Geschlecht

Zudem fanden sich über alle Messorte gemeinsam keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern (siehe Abbildung 46; ($p=0,525$)).

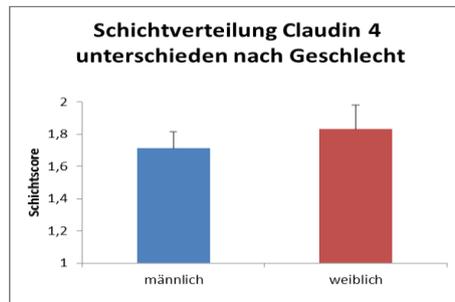


Abbildung 46: Schichtverteilung von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (über alle Messorte gemeinsam), beurteilt nach Score; MW männlich (n=8) $1,71 \pm 0,10$, weiblich $1,83 \pm 0,15$ (n=4); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Einzel betrachtet unterschied sich die Schichtverteilung von Claudin 4 zwischen den Modellen männlicher und weiblicher Schweine am Messort Wundzunge signifikant ($p=0,038$). Hier war das Protein bei den weiblichen Schweinen breiter über die Schichten verteilt (MW 1,892) als bei den männlichen (MW 1,493) (siehe Abbildung 47).

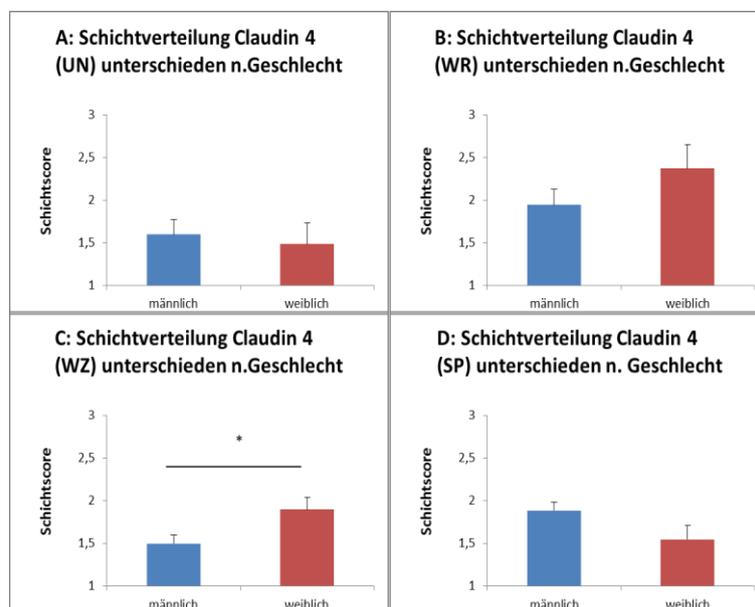


Abbildung 47: Schichtverteilung von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher (n=8) und weiblicher Schweine (n=4), beurteilt nach Score (alle Konzentrationen gemeinsam) (n=12); A (UN): MW männlich $1,60 \pm 0,18$, weiblich $1,48 \pm 0,25$; B (WR): MW männlich $1,94 \pm 0,18$, weiblich $2,37 \pm 0,28$; C (WZ): MW männlich $1,49 \pm 0,09$, weiblich $1,89 \pm 0,14$; D (SP): MW männlich $1,88 \pm 0,10$, weiblich $1,54 \pm 0,16$; * = $p < 0,05$ signifikant verschieden, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der Claudin-4-Schichtverteilung von Konzentration und Geschlecht an den vier Messorten

Insgesamt zeigten sich im statistischen Test keine Wechselwirkungen von Konzentration und Geschlecht in Bezug auf die Schichtverteilung von Claudin 4. Die Scorewerte für die Schichtverteilung von Claudin 4 an der Wundzunge waren einzeln in den jeweiligen Konzentrationen betrachtet nicht signifikant verschieden von der Kontrolle mit PBS. Die Modelle weiblicher Schweine wiesen jedoch über alle Konzentrationen höhere Score-Werte in der Schichtverteilung auf, so dass sich die Signifikanz über alle Konzentrationen erklären lässt.

4.3.2.4 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Schichtverteilung von Claudin 4

An allen vier Messorten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Länge der Wundzunge bezüglich der Schichtverteilung der Claudin-4-Färbung am Messort (siehe Abbildung 48) (UN ($p=0,200$), WR ($p=0,066$), WZ ($p=0,942$), SP ($p=0,903$)).

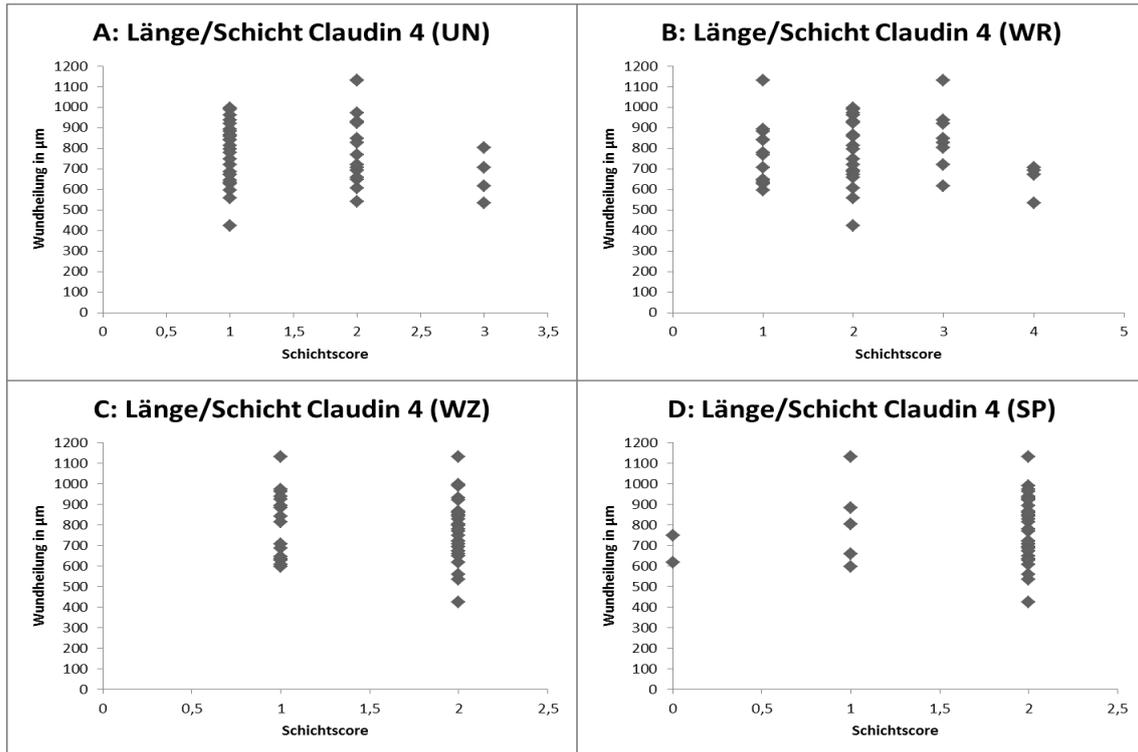


Abbildung 48: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Schichtverteilung der Claudin 4-Färbung an den jeweiligen Messorten (n=12); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.2.5 Verteilung von Claudin 4 innerhalb der Zelle (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär)

Abhängigkeit der zellulären Claudin-4-Verteilung vom Messort

Die zelluläre Verteilung von Claudin 4 bei der Kontrolle mit PBS unterschied sich an den vier Messorten. Die Verteilung war an UN auf die Zell-Zell-Grenzen bezogen, je weiter man zur SP kam, desto mehr fand sich Claudin 4 intrazellulär (siehe Abbildung 49, A). Alle Messorte waren voneinander signifikant verschieden. Betrachtet man die Verteilung von Claudin 4 in allen Konzentrationen so änderte sich lediglich der Unterschied von WR und WZ sowie von WZ und SP von sehr signifikant in der Kontrolle auf hoch signifikant ($p < 0,001$, siehe Abbildung 49, B).

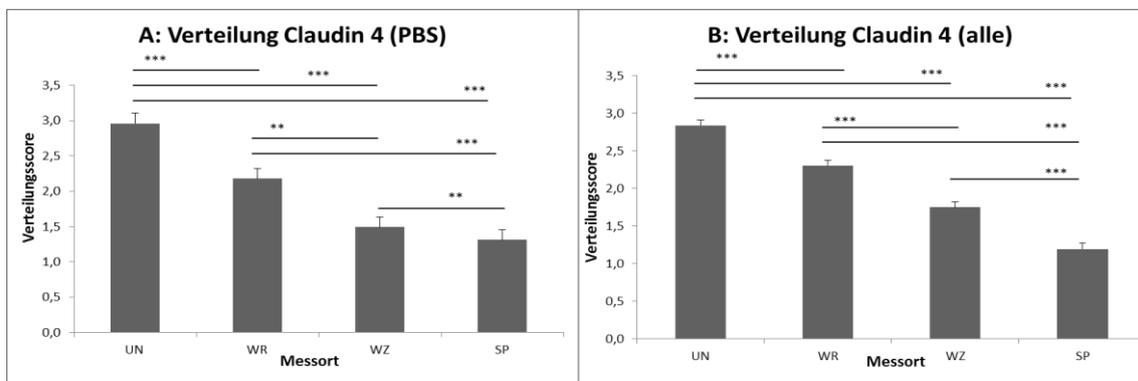


Abbildung 49: **A:** Verteilung von Claudin 4 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in der Kontrolle mit PBS, beurteilt nach Score; MW UN $3,10 \pm 0,14$ ($n=12$), WR $2,20 \pm 0,14$ ($n=12$), WZ $1,80 \pm 0,14$ ($n=12$) und SP $1,40 \pm 0,14$ ($n=12$); **B:** Verteilung von Claudin 4 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in allen Konzentrationen, beurteilt nach Score; MW UN $2,84 \pm 0,07$ ($n=12$), WR $2,30 \pm 0,08$ ($n=12$), WZ $1,75 \pm 0,08$ ($n=12$) und SP $1,20 \pm 0,08$ ($n=12$); *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der zellulären Claudin-4-Verteilung von der Östrogenkonzentration

Zudem fielen Unterschiede in der Verteilung (alle Messorte) in den verschiedenen Konzentrationen auf ($p=0,017$). Bei PBS ($2,18, \pm 0,09$) und in der höchsten Konzentration von $1 \mu\text{M}$ ($2,16, \pm 0,10$) lokalisierte sich Claudin 4 deutlicher an den Zell-Zell-Grenzen als in den übrigen Konzentrationen (Abbildung 50). Der Unterschied von PBS zu 100 nM ($1,94, \pm 0,09$) war signifikant. Bei 100 nM fand sich Claudin 4 verstärkt intrazellulär.

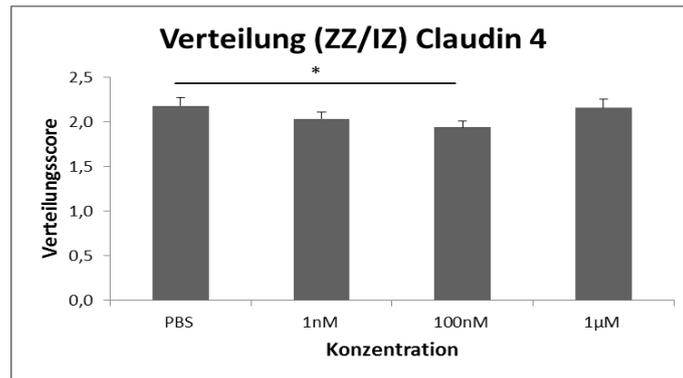


Abbildung 50: Verteilung von Claudin 4 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen (über alle Messorte gemeinsam), beurteilt nach Score; MW PBS $2,18 \pm 0,09$ ($n=11$), 1 nM $2,03 \pm 0,08$ ($n=11$), 100 nM $1,94 \pm 0,09$ ($n=11$), $1 \mu\text{M}$ $2,16 \pm 0,08$ ($n=7$); * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man hierzu die einzelnen Messorte, so fiel auf, dass die Signifikanz zwischen PBS und 100nM aus Unterschieden an der Spitze der Wundzunge resultierte (vergl. Abbildung 51). Hier war die Claudin 4 Verteilung in der Konzentration 100nM mehr auf den Intrazellularraum bezogen als in der mit PBS behandelten Kontrolle ($p=0,012$). Für die anderen Konzentrationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, aber ebenfalls die Tendenz der vermehrt intrazellulären Lokalisation. An den anderen Messorten beobachtete man keine signifikanten Unterschiede.

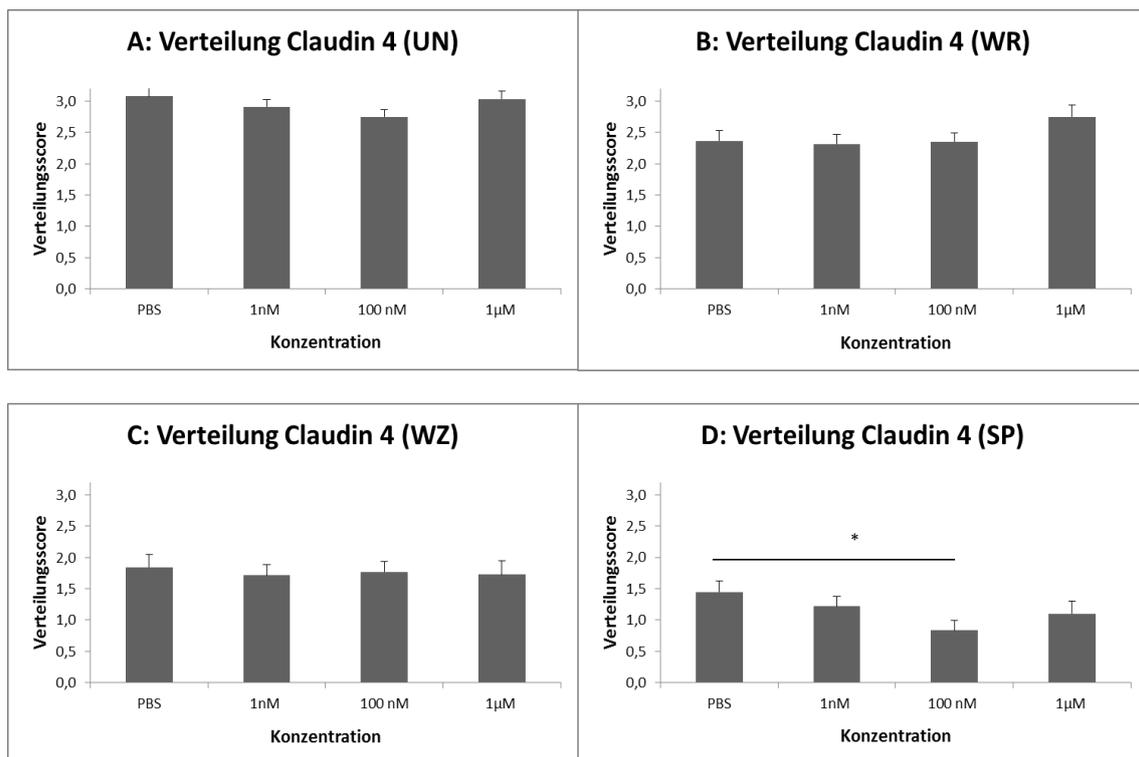


Abbildung 51: Verteilung von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen, beurteilt nach Score an den verschiedenen Messorten; A: unbeteiligte Epidermis, MW PBS $3,08 \pm 0,13$ ($n=11$), 1 nM $2,90 \pm 0,11$ ($n=11$), 100 nM $2,75 \pm 0,11$ ($n=11$), 1 μ M $3,03 \pm 0,13$ ($n=7$); B: Wundrand, MW PBS $2,36 \pm 0,16$ ($n=11$), 1 nM $2,32 \pm 0,14$ ($n=11$), 100 nM $2,35 \pm 0,14$ ($n=11$), 1 μ M $2,75 \pm 0,19$ ($n=6$); C: Wundzunge, MW PBS $1,84 \pm 0,20$ ($n=11$), 1 nM $1,71 \pm 0,17$ ($n=11$), 100 nM $1,77 \pm 0,16$ ($n=11$), 1 μ M $1,72 \pm 0,22$ ($n=6$); D: Spitze der Wundzunge, MW PBS $1,45 \pm 0,18$ ($n=11$), 1 nM $1,22 \pm 0,16$ ($n=11$), 100 nM $0,83 \pm 0,16$ ($n=10$), 1 μ M $1,10 \pm 0,20$; ($n=6$); * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der zellulären Claudin 4 Verteilung vom Geschlecht

Zwischen den Geschlechtern zeigten sich für alle Messorte gemeinsam (siehe Abbildung 52) keine signifikanten Unterschiede ($p=0,087$). Bei den Modellen weiblicher Spender war Claudin 4 im Mittel jedoch tendenziell stärker an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert als bei den männlichen.

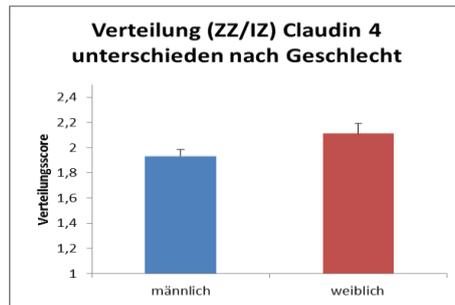


Abbildung 52: Verteilung (ZZ/IZ) von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (über alle Messorte gemeinsam), beurteilt nach Score; MW männlich $1,93 \pm 0,05$ (n=8), weiblich $2,11 \pm 0,08$ (n=4); statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man die Messorte einzeln, so fanden sich am Wundrand signifikante Unterschiede in der Verteilung von Claudin 4 zwischen den Modellen männlicher und weiblicher Schweine ($p=0,043$) (siehe Abbildung 53). Hier war das Protein im Mittel bei den Modellen weiblicher Schweinen stärker an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert (weibliche: MW $2,57 \pm 0,14$; männliche: MW $2,17 \pm 0,09$). Dies zeigte sich als Trend auch an den Messorten UN und WZ, am Messort SP kehrte sich dies um.

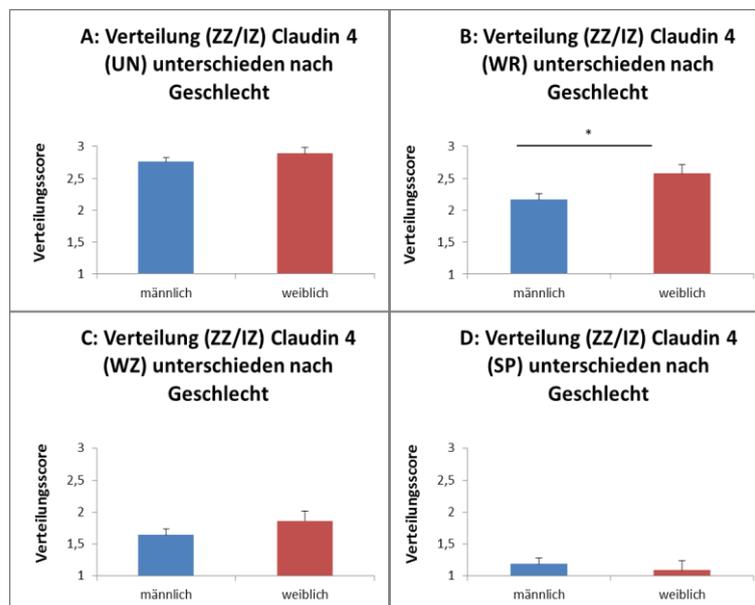


Abbildung 53: Verteilung (ZZ/IZ) von Claudin 4 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher (n=8) und weiblicher (n=4) Schweine, beurteilt nach Score (alle Konzentrationen gemeinsam); A (UN): MW männlich $2,76 \pm 0,06$, weiblich $2,89 \pm 0,10$; B (WR): MW männlich $2,17 \pm 0,09$, weiblich $2,57 \pm 0,14$; C (WZ): MW männlich $1,64 \pm 0,10$, weiblich $1,87 \pm 0,15$; D (SP): MW männlich $1,19 \pm 0,10$, weiblich $1,09 \pm 0,15$; * = $p < 0,05$ signifikant verschieden, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der Claudin-4-Verteilung von Konzentration und Geschlecht an den vier Messorten

Insgesamt zeigten sich im statistischen Test keine Wechselwirkungen von Konzentration und Geschlecht in Bezug auf die Verteilung von Claudin 4. Die Scorewerte für die Verteilung von Claudin 4 am Wundrand waren einzeln in den jeweiligen Konzentrationen betrachtet nicht signifikant verschieden von der Kontrolle mit PBS, die Modelle weiblicher Schweine wiesen jedoch über alle Konzentrationen höhere Score-Werte in der Verteilung auf, so dass sich die Signifikanz über alle Konzentrationen erklären lässt.

4.3.2.6 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Verteilung von Claudin 4 innerhalb der Zelle (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär)

An den einzelnen Messorten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Länge der Wundzunge bzgl. der Verteilung (IZ/ZZ) der Claudin-4-Färbung an den Messorten UN ($p=0,361$), WZ ($p=0,563$) und SP ($p=0,134$). Am Messort WR ($p=0,048$) zeigte sich ein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 54). Wunden mit einem höheren Verteilungsscore für Claudin 4 (mehr Protein an den Zell-Zell-Grenzen) hatten im Mittel eine längere Wundzunge als Wunden mit einem niedrigeren Score (mehr Protein intrazellulär).

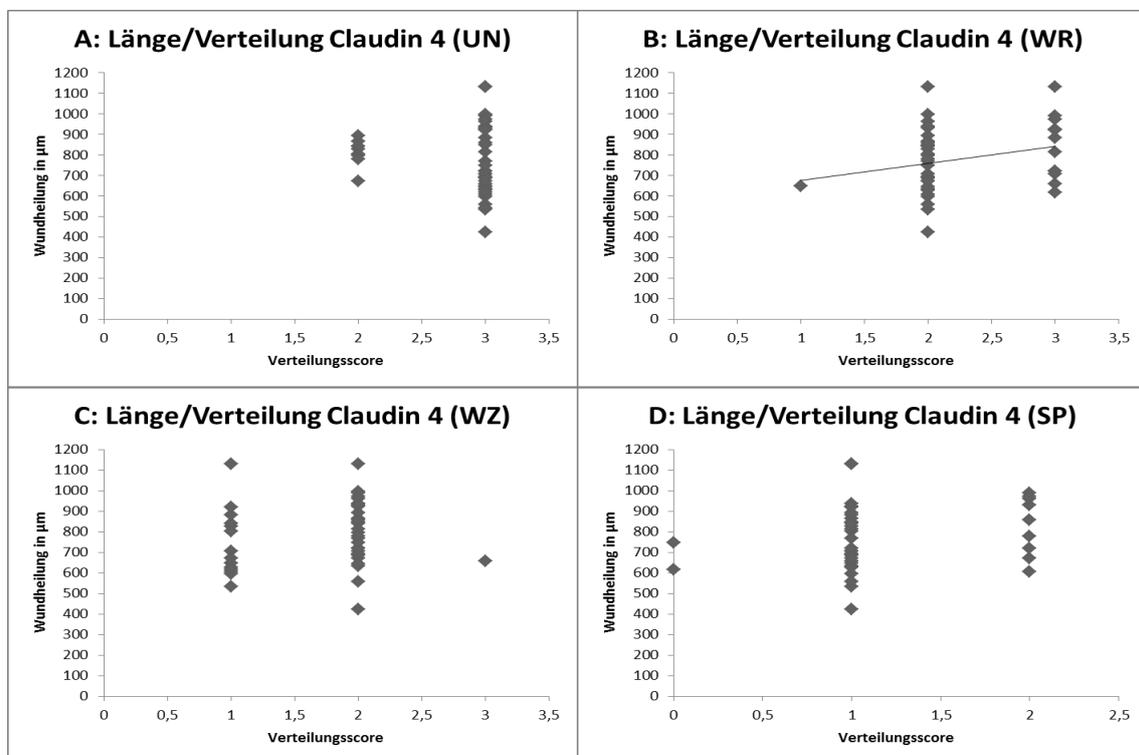


Abbildung 54: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Verteilung der Claudin 4-Färbung innerhalb der Zellen an den jeweiligen Messorten (n=12), Trendlinie eingefügt, * = $p < 0,05$; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Um herauszufinden, ob die Verteilung die längere Wundzunge bedingte oder ob aus der fortgeschrittenen Heilung die Verteilung zurück an die Zell-Zell-Grenzen resultierte, wurde das linear-gemischte Modell umgestellt und berechnet, inwieweit die Verteilung des Proteins von der Länge der Wundzunge abhing. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang für die Messorte Wundrand ($p=0,017$) und Spitze der Wundzunge ($p=0,048$).

4.3.2.7 Korrelation von Wundranderhaltung mit der Intensität, Schichtverteilung und Verteilung (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär) von Claudin 4 an den jeweiligen Messorten

Die Wundranderhaltung war nicht abhängig von den verschiedenen Claudin-4 Parametern (Intensität von Claudin 4 an den jeweiligen Messorten (UN ($p=0,489$); WR ($p=0,679$); WZ ($p=0,260$); SP ($p=0,478$)); Schichtverteilung von Claudin 4 an den jeweiligen Messorten (UN ($p=0,727$); WR ($p=0,165$); WZ ($p=0,234$); SP ($p=0,549$)) und Verteilung (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär) (UN ($p=0,662$); WR ($p=0,196$); WZ ($p=0,959$); SP ($p=0,206$)).

4.3.3 ZO-1

ZO-1 ist ein TJ-Protein, welches an den Zellgrenzen in den oberen Schichten der Epidermis nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 55) (Pummi et al. 2001, Brandner et al. 2002). Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils die Intensität der Färbung, die Verteilung in den jeweiligen Hautschichten und die Lokalisation von ZO-1 innerhalb der Zelle beurteilt (siehe Methoden Kapitel 3.5).

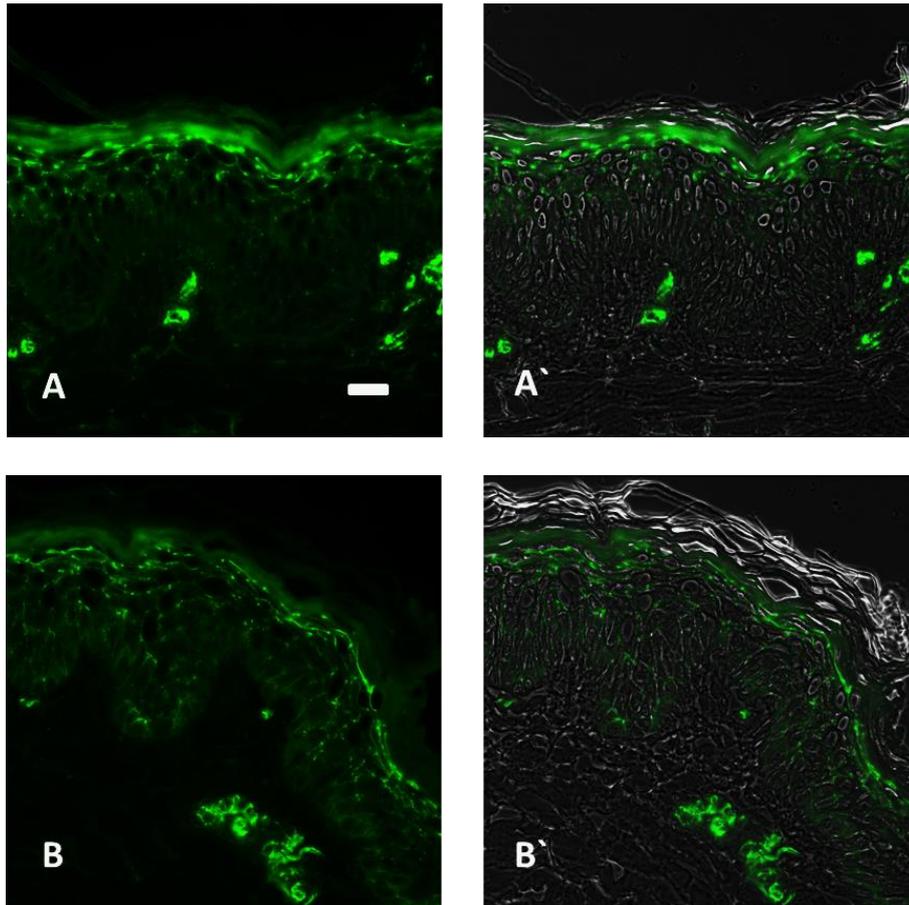


Abbildung 55: Beispiele für die Intensität, Schicht und Verteilung von ZO-1 (grün) in der unbeteiligten Epidermis (A, A') und am Wundrand (B, B'); A/B Immunfluoreszenz, A'/ B' Überlagerung von Fluoreszenz und Phasenkontrast; A: die unbeteiligte Epidermis erhielt den Score 3 (von maximal 3) für die Intensität, 2 (von maximal 4) für die Schichtverteilung und 3 (von maximal 4) für die Verteilung innerhalb der Zelle; B: der Wundrand erhielt den Score 2 (von maximal 3) für die Intensität, 4 (von maximal 4) für die Schichtverteilung und einen Score von 2 (von maximal 3) für die Verteilung innerhalb der Zelle; Größenstandard 50 µm

4.3.3.1 Intensität von ZO-1

Abhängigkeit der ZO-1-Intensität vom Messort

Betrachtete man die Intensität der ZO-1-Färbung bei der Kontrolle unterschieden sich die einzelnen Messorte. Die höchste Intensität hatte der WR ($2,79 \pm 0,12$), gefolgt von der unbeteiligten Epidermis ($2,61 \pm 0,12$), WZ und SP waren deutlich weniger intensiv gefärbt ($1,97 \pm 0,12$ und $1,15 \pm 0,12$) (siehe Abbildung 56, A).

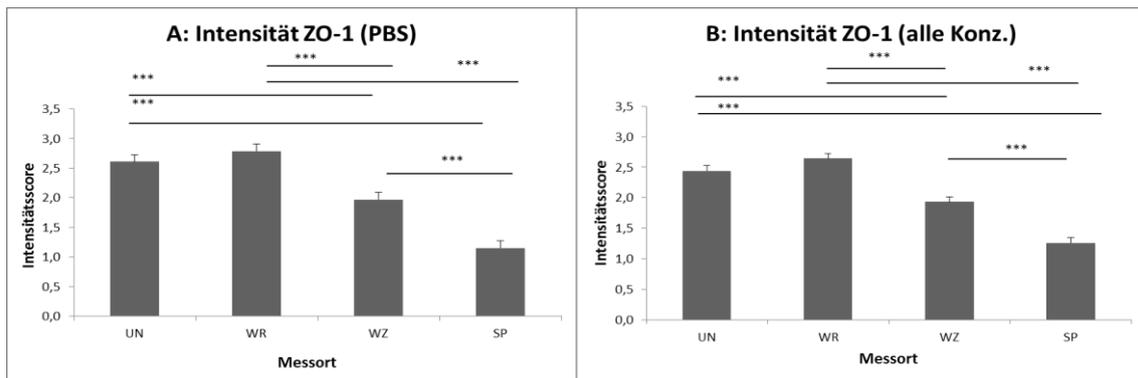


Abbildung 56: **A:** Intensität von ZO-1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in der Kontrolle mit PBS, beurteilt nach Score; MW UN $2,61 \pm 0,12$ (n=12), WR $2,79 \pm 0,12$ (n=12), WZ $1,97 \pm 0,12$ (n=12) und SP $1,15 \pm 0,12$ (n=12); **B:** Intensität von ZO-1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in allen Konzentrationen, beurteilt nach Score; MW UN $2,44 \pm 0,09$ (n=12), WR $2,64 \pm 0,09$ (n=12), WZ $1,93 \pm 0,09$ (n=12) und SP $1,26 \pm 0,09$ (n=12); *** = p < 0,001 signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

In den Modellen aller Konzentrationen zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Die höchste Intensität hatte der WR ($2,64 \pm 0,09$), gefolgt von der unbeteiligten Epidermis ($2,44 \pm 0,09$), WZ und SP waren deutlich weniger intensiv gefärbt ($1,93 \pm 0,09$ und $1,26 \pm 0,09$) (siehe Abbildung 56, B). Unterschiede bei den Signifikanzen zeigten sich nicht.

Abhängigkeit der ZO-1-Intensität von der Östrogenkonzentration

Die verschiedenen Konzentrationen beeinflussten die Intensität von ZO-1 an keinem der Messorte ($p=0,393$). Exemplarisch sind hier die Daten zusammenfassend für alle Messorte gezeigt (Abbildung 57).

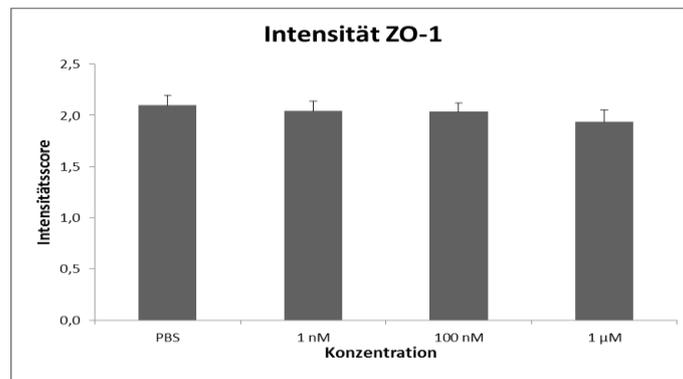


Abbildung 57: Intensität von ZO-1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (über alle Messorte gemeinsam), beurteilt nach Score; MW PBS $2,10 \pm 0,10$ ($n=12$), 1 nM $2,04 \pm 0,10$ ($n=12$), 100 nM $2,03 \pm 0,08$ ($n=12$) und 1 µM $1,94 \pm 0,12$ ($n=7$); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der ZO-1-Intensität vom Geschlecht

Auch das Geschlecht beeinflusste die Intensität von ZO-1 an keinem der Messorte ($p=0,306$). Beispielhaft sind hier die Daten zusammenfassend für alle Messorte gezeigt (siehe Abbildung 58).

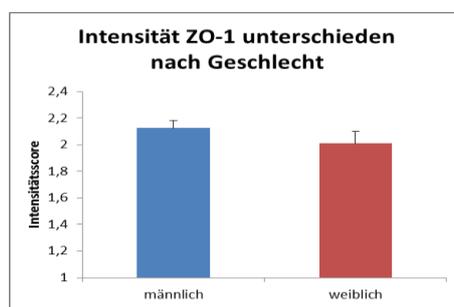


Abbildung 58: Intensität von ZO-1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (an allen Messorten gemeinsam), beurteilt nach Score; MW männlich $2,03 \pm 0,06$ ($n=8$), weiblich $2,01 \pm 0,10$ ($n=4$); statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.3.2 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Intensität von ZO-1

Im statistischen Modell wurde berechnet, inwieweit die Länge der Wundzunge abhängig ist von der Intensität von ZO-1. An keinem der vier Messorte zeigten sich signifikante Unterschiede in der Länge der Wundzunge bezogen auf die Intensität der ZO-1-Färbung (siehe Abbildung 59) (UN ($p=0,646$), WR ($p=0,284$), WZ ($p=0,983$), SP ($p=0,234$)).

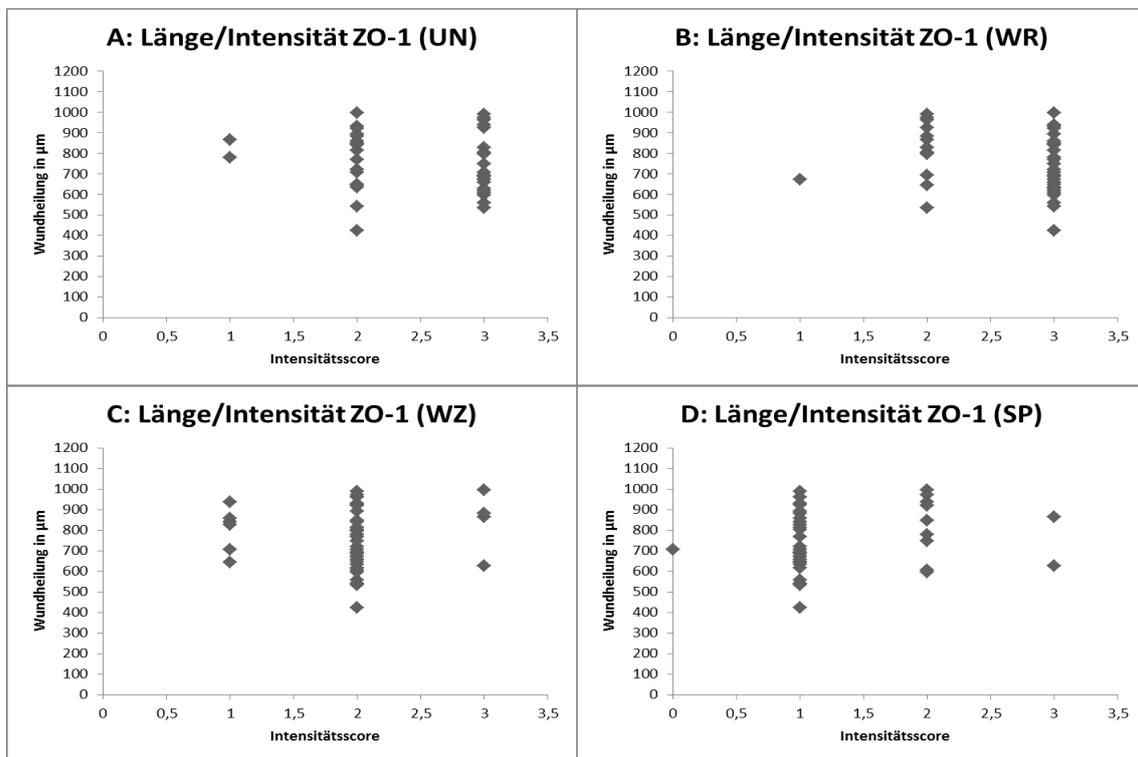


Abbildung 59: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Intensität der ZO-1-Färbung an den jeweiligen Messorten (n=12); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.3.3 Schichtverteilung von ZO-1

Abhängigkeit der ZO-1-Schichtverteilung vom Messort

Die Schichtverteilung von ZO-1 in der Kontrolle mit PBS war an den Messorten UN und WR am breitesten. WZ und SP unterschieden sich insofern untereinander, dass die Schichtverteilung an der SP schmaler war als in der Wundzunge. Dieser Unterschied war nicht signifikant (siehe Abbildung 60, A und B). Ein Vergleich zwischen den Messorten UN/WR und WZ/SP war nicht sinnvoll, da man 4 Schichten an UN/WR nicht mit 2 Schichten in WZ/SP vergleichen kann.

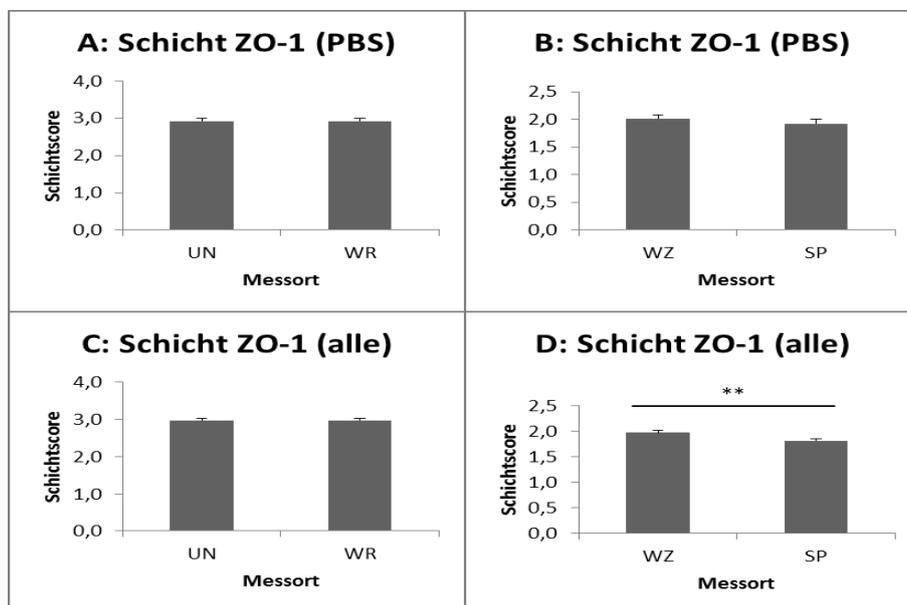


Abbildung 60: A + B: Schichtverteilung von ZO-1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in der Kontrolle mit PBS, beurteilt nach Score; MW UN $2,92 \pm 0,08$ (n=12), WR $2,92 \pm 0,08$ (n=12), WZ $2,01 \pm 0,08$ (n=12) und SP $1,92 \pm 0,08$ (n=12); **C + D:** Schichtverteilung von ZO-1 in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in allen Konzentrationen, beurteilt nach Score; MW UN $2,97 \pm 0,04$ (n=12), WR $2,97 \pm 0,04$ (n=12), WZ $1,97 \pm 0,04$ (n=12) und SP $1,81 \pm 0,04$ (n=12); ** = $p < 0,01$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Auch bei allen Konzentrationen war die Schichtverteilung von ZO-1 an den Messorten UN und WR am breitesten. WZ und SP unterschieden sich insofern untereinander, dass die Schichtverteilung an der SP ($1,81, \pm 0,04$) schmaler war als in der Wundzunge ($1,97, \pm 0,04$). Im Gegensatz zur Kontrolle mit PBS war dieser Unterschied signifikant ($p=0,003$), siehe Abbildung 60, C und D).

Abhängigkeit der ZO-1-Schichtverteilung von der Östrogenkonzentration

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Schichtverteilung für ZO-1 über alle Messorte gemeinsam (siehe Abbildung 61) in den verschiedenen Östrogenkonzentrationen ($p=0,226$).

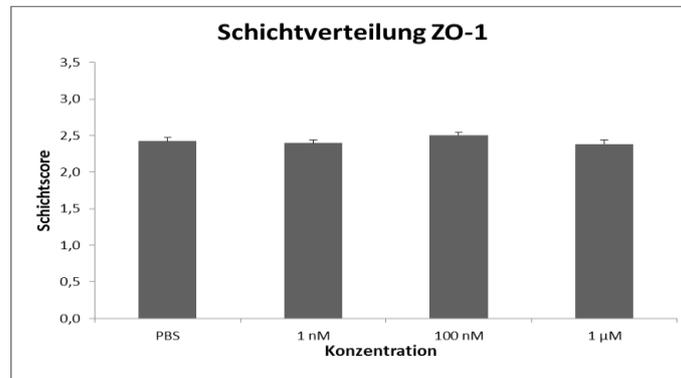


Abbildung 61: Schichtverteilung von ZO-1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (über alle Messorte gemeinsam), beurteilt nach Score; MW PBS $2,42 \pm 0,05$ ($n=12$), 1 nM $2,40 \pm 0,04$ ($n=12$), 100 nM $2,51 \pm 0,04$ ($n=12$) und 1 µM $2,38 \pm 0,05$ ($n=7$); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man die Messorte einzeln und nach Konzentrationen getrennt (Abbildung 62), so zeigten sich an jedem Messort signifikante Unterschiede zwischen den mit Östrogen behandelten Modellen und der Kontrolle mit PBS. Im Bereich der unbeteiligten Epidermis gab es insgesamt keine Signifikanz ($p=0,133$), jedoch einzelne signifikante Unterschiede der Kontrolle mit PBS zu 1 nM ($p=0,031$) und 100 nM ($p=0,024$). Zur höchsten Konzentration mit 1 µM war der Unterschied mit einem p-Wert von $p=0,055$ knapp nicht signifikant. Die Messergebnisse am Wundrand waren identisch. Auch an der Wundzunge war das Gesamtergebnis zunächst nicht signifikant. Aber auch hier zeigten sich einzelne Signifikanzen zwischen den Konzentrationen. In der Wundzunge unterschied sich die höchste Konzentration 1 µM von allen niedrigeren und der Kontrolle mit PBS (PBS ($p=0,024$), 1 nM ($p=0,049$) und 100 nM ($p=0,037$)). Bei 1 µM war die Schichtverteilung im Mittel weniger breit als in den anderen Konzentrationen. In der Spitze der Wundzunge unterschieden sich die Konzentrationen 1 nM und 100nM signifikant voneinander ($p=0,030$). Bei 1 nM war die Schichtverteilung hier weniger breit.

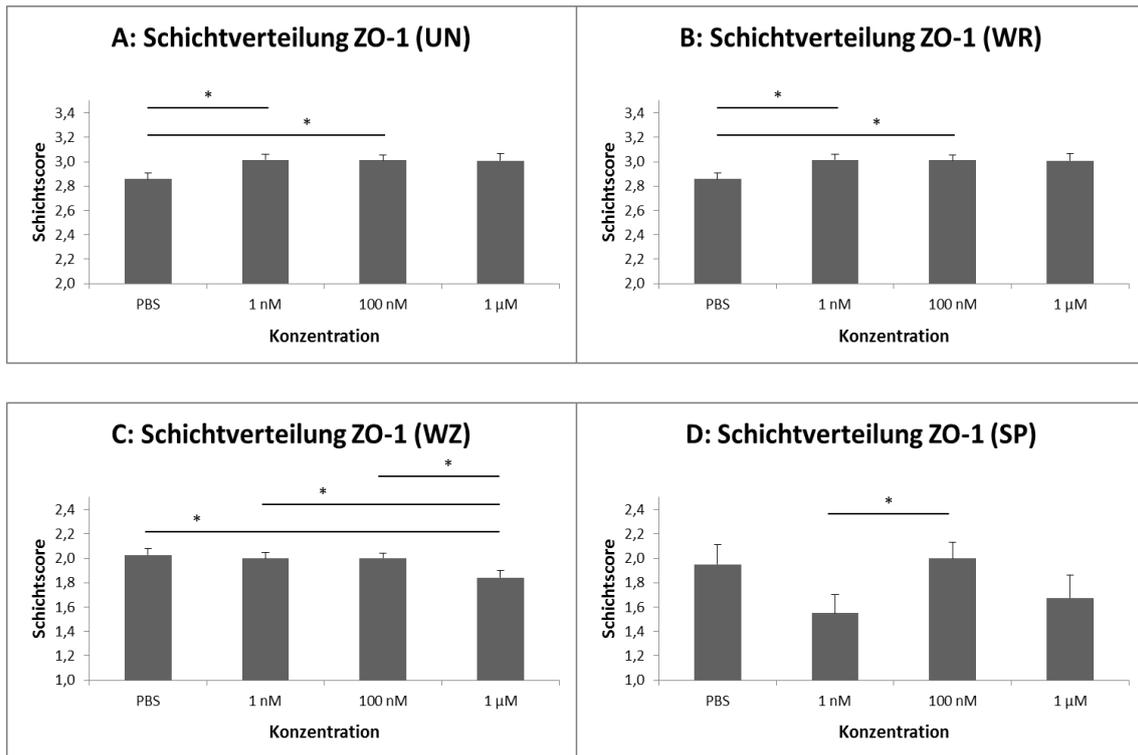


Abbildung 62: Schichtverteilung von ZO-1 in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen an den jeweiligen Messorten, beurteilt nach Score; A (UN): MW PBS $2,86 \pm 0,05$ (n=12), 1 nM $3,02 \pm 0,05$ (n=12), 100 nM $3,01 \pm 0,04$ (n=12) und 1 μM $3,00 \pm 0,06$ (n=7); B (WR): MW PBS $2,86 \pm 0,05$ (n=12), 1 nM $3,02 \pm 0,05$ (n=12), 100 nM $3,01 \pm 0,04$ (n=12) und 1 μM $3,00 \pm 0,06$ (n=7); C (WZ): MW PBS $2,03 \pm 0,05$ (n=12), 1 nM $2,00 \pm 0,05$ (n=12), 100 nM $2,00 \pm 0,04$ (n=12) und 1 μM $1,84 \pm 0,06$ (n=7); D (SP): MW PBS $1,95 \pm 0,16$ (n=12), 1 nM $1,55 \pm 0,15$ (n=12), 100 nM $2,00 \pm 0,13$ (n=12) und 1 μM $1,67 \pm 0,19$ (n=7); * = $p < 0,05$, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der ZO-1-Schichtverteilung vom Geschlecht

Das Geschlecht beeinflusste die Schichtverteilung von ZO-1 an keinem der Messorte ($p=0,762$). Exemplarisch sind hier die Daten zusammenfassend für alle Messorte gezeigt (Abbildung 63).

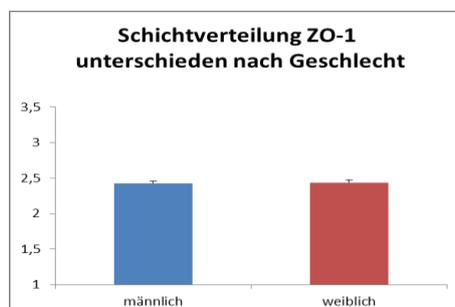


Abbildung 63: Schichtverteilung von ZO-1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (an allen Messorten gemeinsam), beurteilt nach Score; MW männlich $2,43 \pm 0,02$ (n=8), weiblich $2,44 \pm 0,04$ (n=4); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.3.4 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Schichtverteilung des ZO-1

Wurden die Messorte einzeln betrachtet, zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Länge der Wundzunge in Bezug auf die Schichtverteilung der ZO-1-Färbung für die Messorte unbeteiligte Epidermis und Wundrand (siehe Abbildung 64) (UN ($p=0,025$), WR ($p=0,025$), WZ ($p=0,498$), SP ($p=0,790$)). Im Vergleich heilten die Wunden mit einem Schicht-Score von 2 (weniger breite Verteilung über die Schichten) an UN/WR besser als jene mit einem Score von 3 und Lokalisation in allen lebenden Zellschichten.

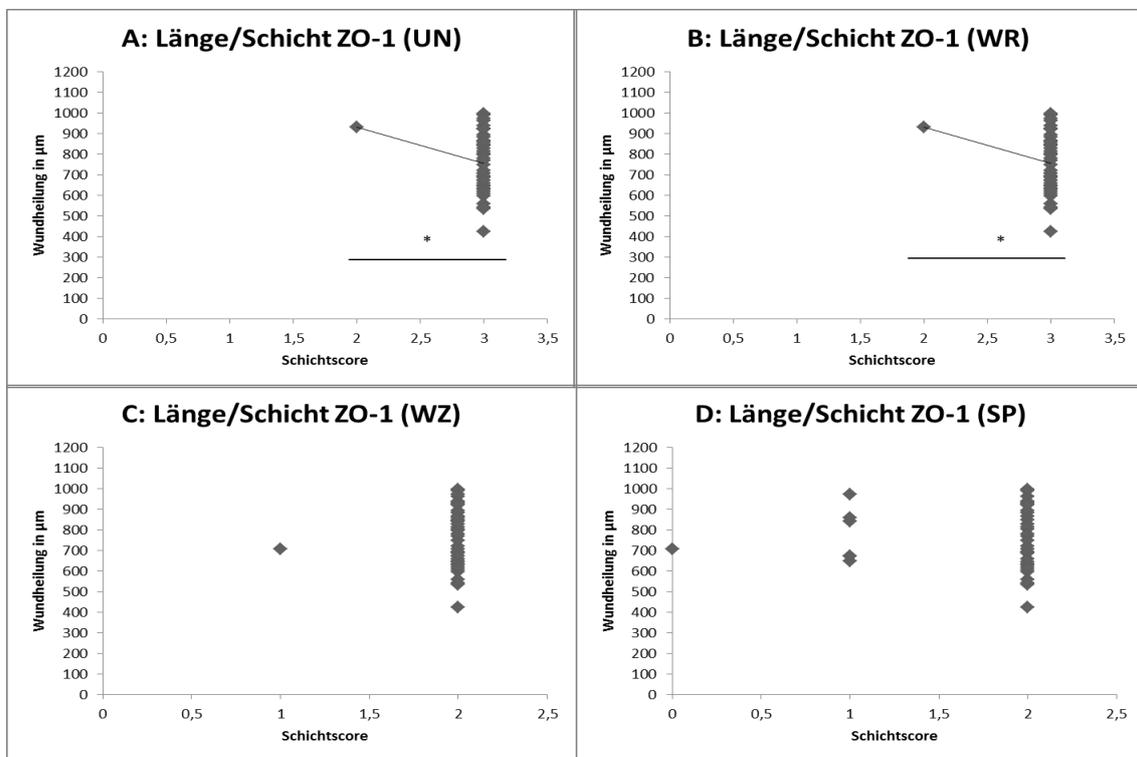


Abbildung 64: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Schichtverteilung der ZO-1-Färbung an den jeweiligen Messorten (n=12), Trendlinie eingefügt, * = $p < 0,05$; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Auch hier stellte sich auch hier die Frage, ob die Schichtverteilung geringer war weil die Wunde geschlossener war, oder ob die geringere Schichtverteilung einen zügigeren Schluss bewirkte. Das linear-gemischte Modell wurde daher umgestellt und berechnet, inwieweit die Schichtverteilung von ZO-1 von der Länge der Wundzunge abhängt. Da es auch hier Signifikanzen gab ($p=0,026$) ließ sich folgende Korrelation treffen: je kürzer die Wundzunge desto breiter die Schichtverteilung von ZO-1 an den beiden Messorten.

4.3.3.5 Verteilung von ZO-1 innerhalb der Zelle (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär)

Abhängigkeit der zellulären ZO-1-Verteilung vom Messort

Betrachtete man die ZO-1-Verteilung in der Kontrolle mit PBS so fielen Unterschiede zwischen den einzelnen Messorten auf. Während das Protein im Bereich der unbeteiligten Epidermis ($2,99 \pm 0,12$) überwiegend an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert war, fand es sich, je näher man an die Spitze der Wundzunge ($1,62 \pm 0,12$) kam, mehr intrazellulär (siehe Abbildung 65, A).

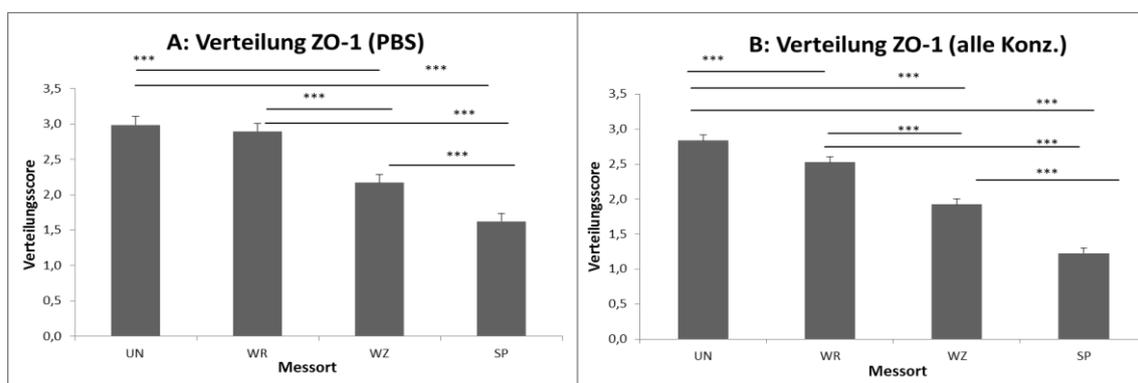


Abbildung 65: **A:** Verteilung von ZO-1 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei der Kontrolle mit PBS, beurteilt nach Score; MW UN $2,99 \pm 0,12$ (n=12), WR $2,90 \pm 0,12$ (n=12), WZ $2,17 \pm 0,12$ (n=12) und SP $1,62 \pm 0,12$ (n=12); **B:** Verteilung von ZO-1 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten und in allen Konzentrationen, beurteilt nach Score; MW UN $2,84 \pm 0,08$ (n=12), WR $2,52 \pm 0,08$ (n=12), WZ $1,92 \pm 0,08$ (n=12) und SP $1,22 \pm 0,08$ (n=12); *** = $p < 0,001$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man die Verteilung von ZO-1 in allen Konzentrationen so zeigte sich zunächst ein ähnliches Bild wie bei der Kontrolle mit PBS. Während das Protein im Bereich der unbeteiligten Epidermis ($2,84 \pm 0,08$) überwiegend an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert war, fand es sich, je näher man an die Spitze der Wundzunge ($1,22 \pm 0,08$) kam, mehr intrazellulär (siehe Abbildung 65, B). Während die Werte für den Messort UN im Vergleich sehr ähnlich waren (PBS $2,99 \pm 0,12$ und Konzentrationen $2,84 \pm 0,08$) waren an allen anderen Messorten die Werte für die Konzentrationen deutlich niedriger und das Protein somit stärker im Intrazellularraum lokalisiert (WR: PBS $2,90 \pm 0,12$, Konz. $2,52 \pm 0,08$; WZ: PBS WZ $2,17 \pm 0,12$, Konz. $1,92 \pm 0,08$; SP: PBS SP $1,62 \pm 0,12$, Konz. $1,22 \pm 0,08$). Bei den Konzentrationen war zudem der Unterschied zwischen den Messorten UN und WR hoch signifikant, diesen Unterschied gab es in der Kontrolle mit PBS nicht.

Abhängigkeit der zellulären ZO-1-Verteilung von der Östrogenkonzentration

Zudem gab es Unterschiede zwischen der Kontrolle (PBS) und den mit Östrogen behandelten Modellen ($p < 0,001$), siehe Abbildung 66). PBS ($2,39 \pm 0,09$) wies insgesamt eine stärkere Lokalisation an den ZZ-Grenzen auf. Bei den mit Östrogen behandelten Modellen war das Protein mehr im Intrazellularraum lokalisiert. Den niedrigsten Score-Wert hatte die niedrigste Östrogenkonzentration von 1 nM ($1,92 \pm 0,08$).

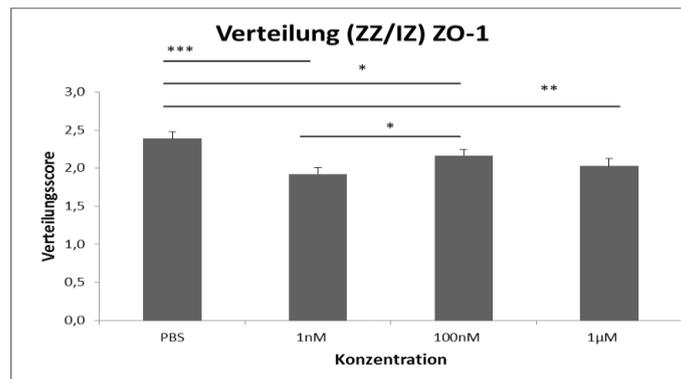


Abbildung 66: Verteilung von ZO-1 innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen, beurteilt nach Score; MW PBS $2,39 \pm 0,09$ ($n=12$), 1 nM $1,92 \pm 0,08$ ($n=12$), 100 nM $2,17 \pm 0,08$ ($n=12$), 1 µM $2,03 \pm 0,10$ ($n=7$); *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man hierzu die einzelnen Messorte, so fiel auf, dass die Signifikanzen aus Unterschieden an allen Messorten außer der unbeteiligten Epidermis resultierten (vergl. Abbildung 67). Hier ließ sich feststellen, dass die Konzentration 1 nM an den Messorten WR ($p=0,019$) und WZ ($p=0,003$) den geringsten Score für die ZO-1 Verteilung aufwies. Aber auch die anderen Östrogenkonzentrationen wiesen niedrigere Werte auf als die mit PBS behandelte Kontrolle.

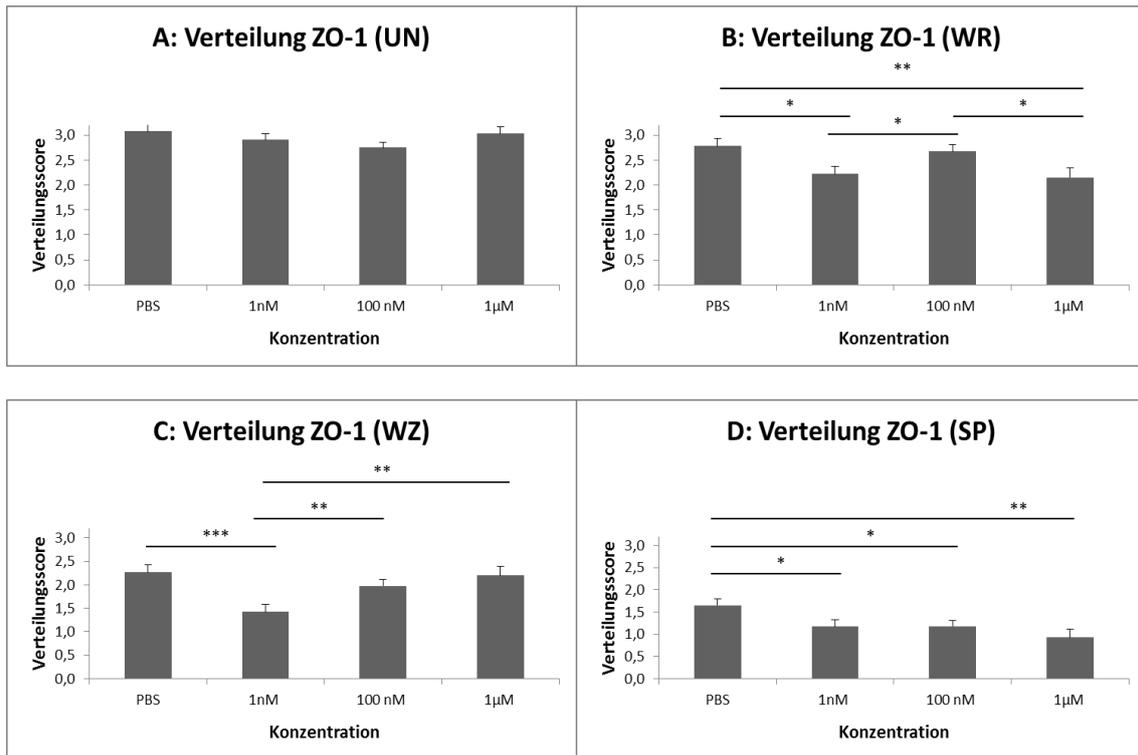


Abbildung 67: Verteilung von ZO-1 in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen, beurteilt nach Score an den verschiedenen Messorten; A: unbeteiligte Epidermis, MW PBS $2,86 \pm 0,12$ (n=12), 1 nM $2,90 \pm 0,11$ (n=12), 100 nM $2,84 \pm 0,10$ (n=12), 1 µM $2,81 \pm 0,14$ (n=7); B: Wundrand, MW PBS $2,78 \pm 0,16$ (n=12), 1 nM $2,22 \pm 0,15$ (n=12), 100 nM $2,68 \pm 0,13$ (n=12), 1 µM $2,15 \pm 0,19$ (n=7); C: Wundzunge, MW PBS $2,26 \pm 0,17$ (n=12), 1 nM $1,42 \pm 0,16$ (n=12), 100 nM $1,98 \pm 0,14$ (n=12), 1 µM $2,2 \pm 0,19$ (n=7); D: Spitze der Wundzunge, MW PBS $1,65 \pm 0,15$ (n=12), 1 nM $1,17 \pm 0,15$ (n=12), 100 nM $1,18 \pm 0,13$ (n=12), 1 µM $0,93 \pm 0,18$ (n=7); *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$ und * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der zellulären ZO-1-Verteilung vom Geschlecht

Das Geschlecht beeinflusste die Verteilung (ZZ/IZ) von ZO-1 an keinem der Messorte ($p=0,825$). Exemplarisch sind hier die Daten zusammenfassend für alle Messorte gezeigt (Abbildung 68).

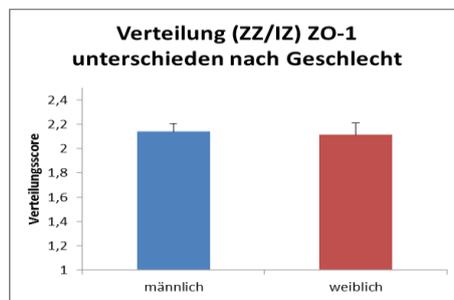


Abbildung 68: Verteilung (ZZ/IZ) von ZO-1 in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (alle Messorte), beurteilt nach Score; MW männlich $2,14 \pm 0,06$ (n=8), weiblich $2,11 \pm 0,10$ (n=4); keine sign. Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.3.6 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Verteilung des ZO-1 innerhalb der Zelle (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär)

Es zeigten sich signifikante Unterschiede im Wundheilungsfortschritt bezogen auf die Verteilung (IZ/ZZ) der ZO-1-Färbung in der unbeteiligten Epidermis UN ($p=0,036$), während an den anderen Orten kein signifikanter Unterschied beobachtet werden konnte (WR ($p=0,141$), WZ ($p=0,499$), SP ($p=0,595$)). Die Modelle mit Score von 3 in der Verteilung am Messort UN heilten signifikant schlechter als die mit 2 (1 gab es an UN nicht). Das bedeutet bei einer starken Konzentration des Proteins in der unbeteiligten Epidermis auf die Zell-Zell-Grenzen eine geringere Wundheilung als bei einer deutlicher zytoplasmatischen Lokalisation (siehe Abbildung 69).

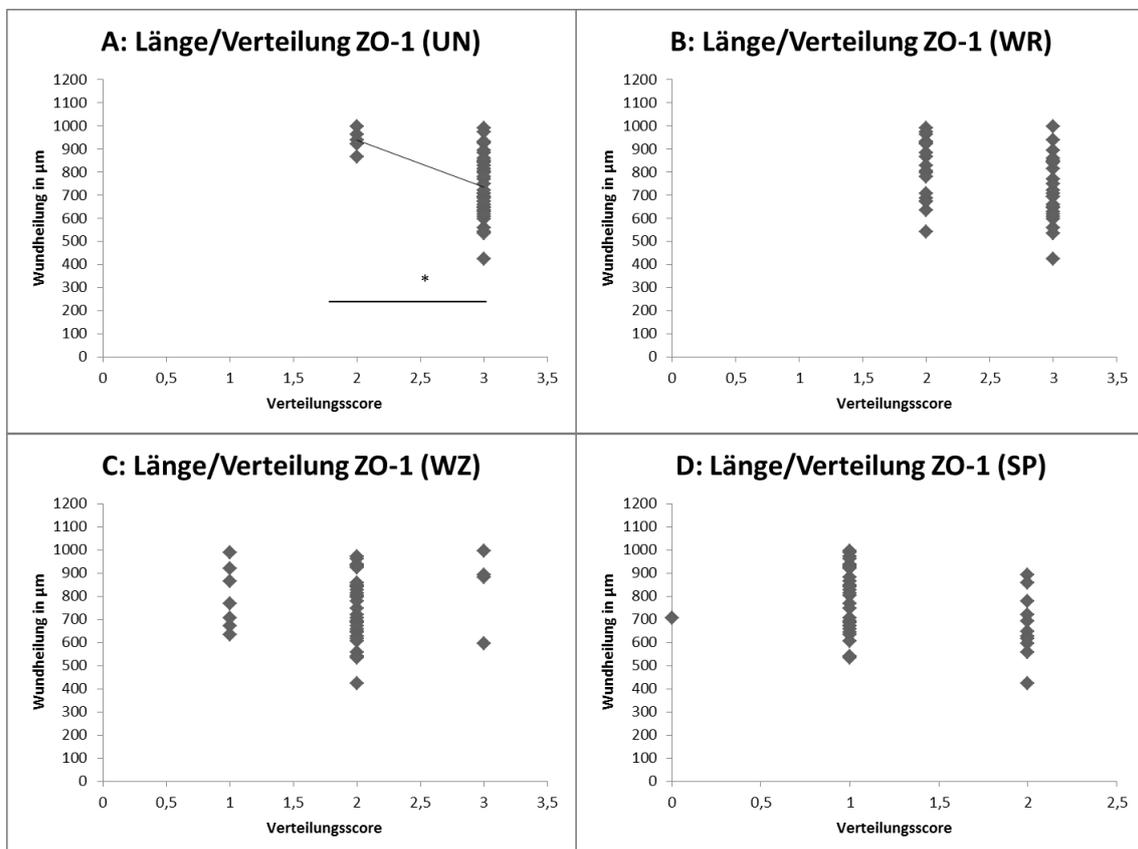


Abbildung 69: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Verteilung der ZO-1-Färbung innerhalb der Zellen an den jeweiligen Messorten (n=12), Trendlinie eingefügt, * = $p < 0,05$; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Auch hier wurde zum weiteren Beurteilung das Modell umgestellt und berechnet, inwieweit die Verteilung (ZZ/IZ) abhängig von der Länge der Wundheilung ist. Da auch dies signifikant war ($p=0,035$) ist wieder von einer Korrelation der Parameter zu sprechen.

4.3.3.7 Korrelation von Wundranderhaltung mit der Intensität, Schichtverteilung und Verteilung (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär) von ZO-1 an den jeweiligen Messorten

Die Wundranderhaltung wurde von keinem der erhobenen ZO-1 Parameter beeinflusst.

Die Wundranderhaltung wies keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Intensität von ZO-1 an den jeweiligen Messorten auf (UN $p=0,842$; WR $p=0,830$; WZ $p=0,860$; SP $p=0,705$).

Ebenso ergab sich kein signifikanter Unterschied der Wundranderhaltung in Bezug auf die Schichtverteilung von ZO-1 an den jeweiligen Messorten (UN/WR und WZ/SP wiesen keinen Unterschied auf und waren zusammen im Modell nicht zu berechnen. Es wurden daher die Messpunkte WR und WZ bei der Berechnung ausgeklammert). An UN waren alle Werte gleich, somit war ein p -Wert hier nicht zu berechnen. Für die Spitze ergab sich $p=0,847$.

Es ließ sich kein signifikanter Unterschied der Wundranderhaltung in Bezug auf die Verteilung (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär) von ZO-1 an den jeweiligen Messorten erkennen (UN ($p=0,278$); WR ($p=0,068$); WZ ($p=0,904$); SP ($p=0,206$)).

4.3.4 Occludin

Occludin konnte in unbeteiligter Epidermis in den unteren Schichten des Stratum corneums und im Stratum granulosum nachgewiesen werden. Dies war bzgl. des Stratum granulosums ähnlich der menschlichen und Schweineepidermis (Abbildung 70) (Pummi et al. 2001, Brandner et al. 2002, Ohnemus et al. 2008). Im Stratum corneum wird es in der Regel nur über Elektronenmikroskopie nachgewiesen (Kirschner et al. 2012). Da die Bedeutung von Occludin im Stratum corneum noch unklar, die Anfärbbarkeit schwierig (z.T. starker Hintergrund) ist und es große interindividuelle Unterschiede gibt, wurde dieser Anteil bei der Bewertung vernachlässigt und nur die Färbung des Stratum granulosums beurteilt. Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils die Intensität der Färbung, die Verteilung in den jeweiligen Hautschichten und die Lokalisation von Occludin innerhalb der Zelle beurteilt (siehe Methoden Kapitel 3.5).

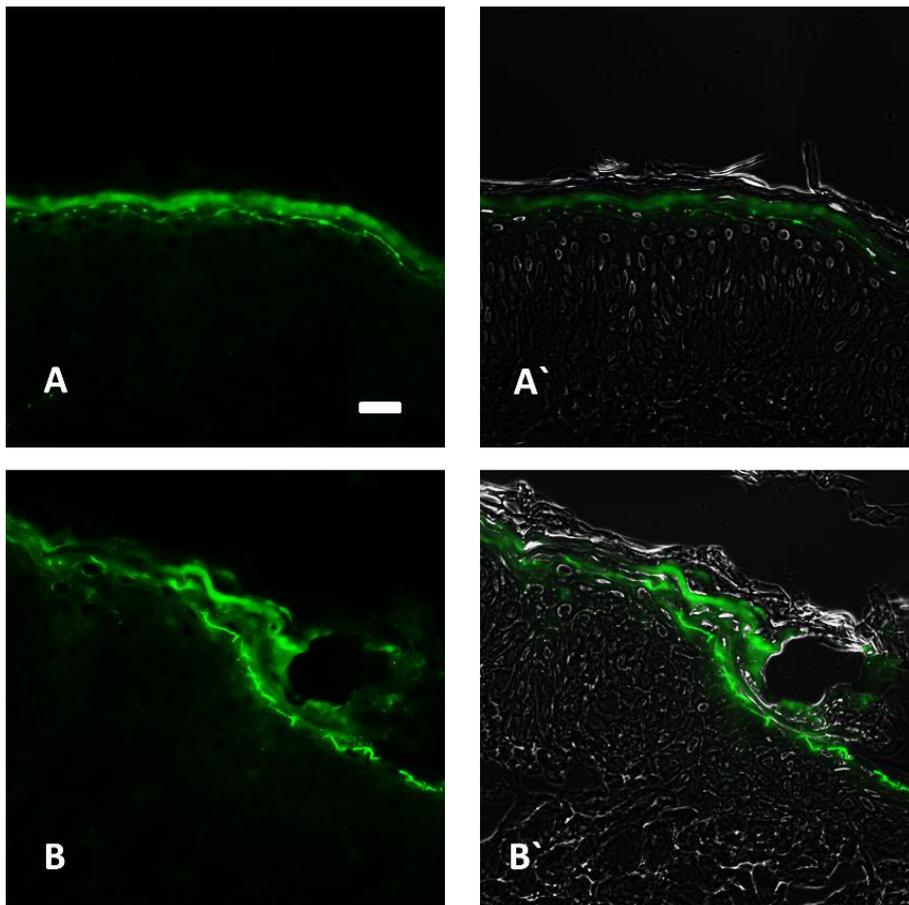


Abbildung 70: Beispiele für die Intensität, Schicht und Verteilung von Occludin (grün) in der unbeteiligten Epidermis (A, A') und am Wundrand (B, B'); A/B Immunfluoreszenz, A'/B' Überlagerung von Fluoreszenz und Phasenkontrast; A: die unbeteiligte Epidermis erhielt den Score 2 (von maximal 3) für die Intensität, 2 (von maximal 4) für die Schichtverteilung und 3 (von maximal 3) für die Verteilung innerhalb der Zelle; B: der Wundrand erhielt den Score 3 (von maximal 3) für die Intensität, 2 (von maximal 4) für die Schichtverteilung und einen Score von 3 (von maximal 3) für die Verteilung innerhalb der Zelle; Größenstandard 50 μ m

4.3.4.1 Intensität von Occludin

Abhängigkeit der Occludin-Intensität vom Messort

Die Intensität von Occludin in den mit PBS behandelten Modellen unterschied sich an den jeweiligen Messorten. Die höchste Intensität hatte UN ($2,67 \pm 0,18$), zur Spitze der Wundzunge hin nahm die Intensität der Fluoreszenz-Färbung ab (s. Abbildung 71, A).

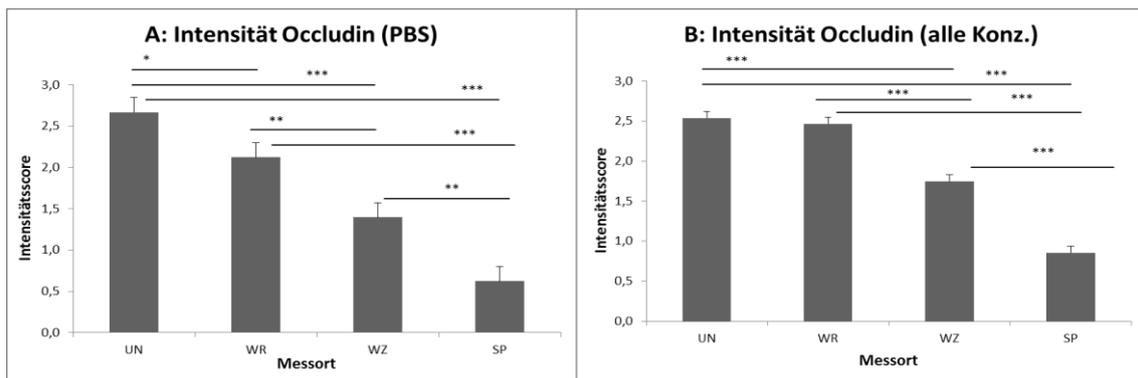


Abbildung 71: **A:** Intensität von Occludin in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei der Kontrolle mit PBS, beurteilt nach Score; MW UN $2,67 \pm 0,18$ ($n=12$), WR $2,12 \pm 0,18$ ($n=12$), WZ $1,40 \pm 0,18$ ($n=12$) und SP $0,62 \pm 0,08$ ($n=12$); **B:** Intensität von Occludin in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in allen Konzentrationen, beurteilt nach Score; MW UN $2,54 \pm 0,08$ ($n=12$), WR $2,47 \pm 0,08$ ($n=12$), WZ $1,75 \pm 0,08$ ($n=12$) und SP $0,86 \pm 0,08$ ($n=12$); *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtet man die Intensität von Occludin bei den mit Östrogen behandelten Modellen so hatte auch hier die unbeteiligte Epidermis die höchste Intensität der Fluoreszenz-Färbung auf Occludin ($2,54, \pm 0,08$). Es fand sich allerdings kein signifikanter Unterschied mehr zum Messort WR ($2,47, \pm 0,08$). Dieser war, wie auch die Messorte WZ und SP mit Östrogen behandelt deutlicher intensiver gefärbt als in der Kontrolle mit PBS. Die Unterschiede zwischen WR und WZ sowie WZ und SP waren in der Kontrolle mit PBS sehr signifikant, in den Konzentrationen dann hoch signifikant (siehe Abbildung 71, B).

Abhängigkeit der Occludin-Intensität von der Östrogenkonzentration

Weiter fielen Unterschiede über alle Messorte gemeinsam in den Konzentrationen auf ($p=0,016$). Die mit PBS ($1,67, \pm 0,09$) behandelte Kontrolle hatte im Mittel über die Messpunkte eine geringere Intensität in der Färbung als die mit Östrogen behandelten Modelle (siehe Abbildung 72).

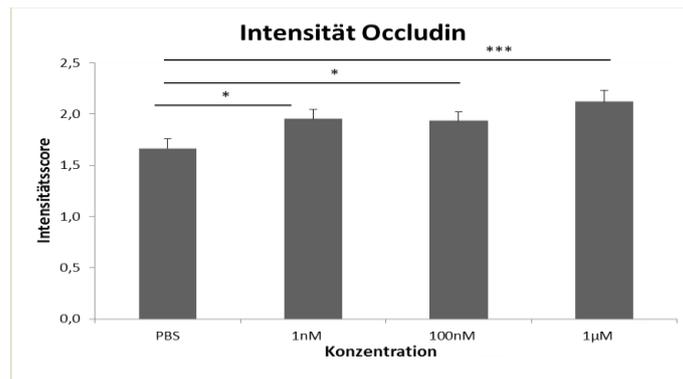


Abbildung 72: Intensität von Occludin in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen (alle Messorte gemeinsam), beurteilt nach Score; MW PBS $1,67 \pm 0,09$ (n=12), 1 nM $1,95 \pm 0,09$ (n=9), 100 nM $1,94 \pm 0,09$ (n=11), 1 µM $2,12 \pm 0,10$ (n=9); * = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model**

Bei der Betrachtung der einzelnen Messpunkte zeigten sich für die unbeteiligte Epidermis keine signifikanten Unterschiede in der Intensität der Occludinfärbung. Am Wundrand ($p=0,019$) und der Spitze der Wundzunge ($p=0,011$) hingegen waren die Intensitäten der mit Östrogen behandelten Modelle höher als die der Kontrolle mit PBS. In der Wundzunge (gesamt für den Messort $p=0,089$) selbst zeigte nur die höchste Konzentration von 1µM ($p=0,008$) Östrogen einen signifikanten Intensitätsunterschied zur Kontrolle mit PBS (siehe Abbildung 73).

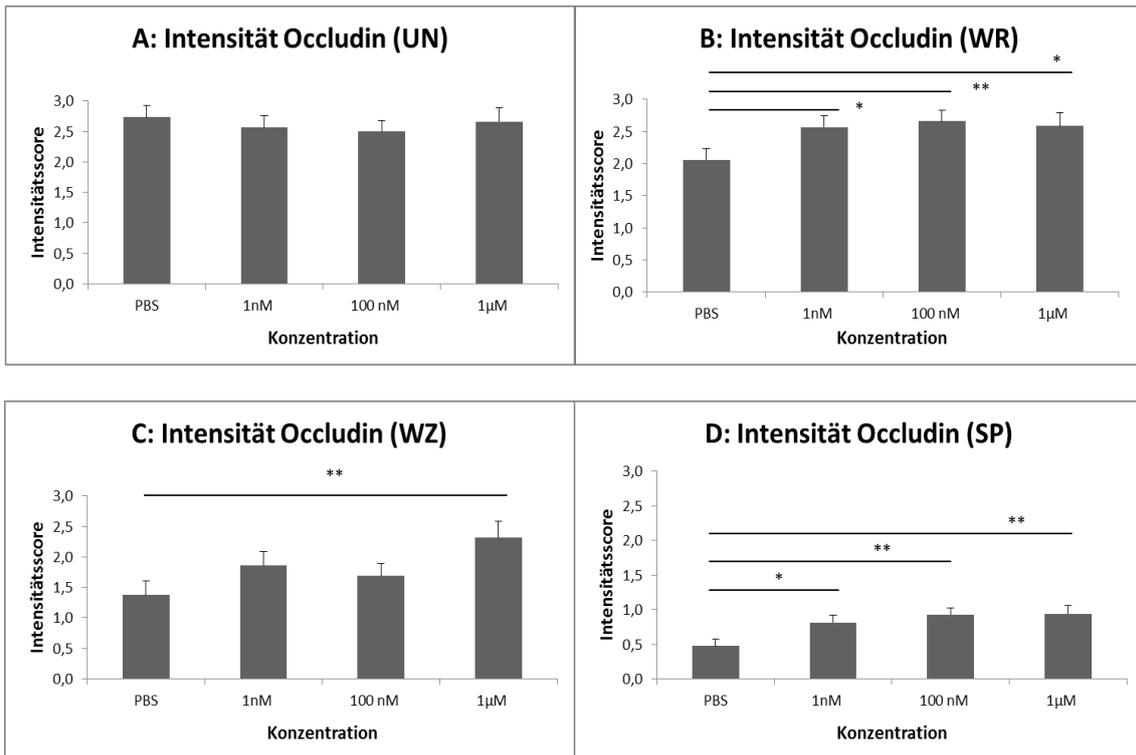


Abbildung 73: Intensität von Occludin in der Immunfluoreszenz innerhalb der verschiedenen Konzentrationen, beurteilt nach Score an den verschiedenen Messorten; A: unbeteteiligte Epidermis, MW PBS $2,73 \pm 0,19$ (n=12), 1 nM $2,57 \pm 0,19$ (n=9), 100 nM $2,50 \pm 0,17$ (n=11), 1 µM $2,66 \pm 0,23$ (n=9); B: Wundrand, MW PBS $2,06 \pm 0,18$ (n=12), 1 nM $2,57 \pm 0,18$ (n=9), 100 nM $2,66 \pm 0,17$ (n=11), 1 µM $2,57 \pm 0,21$ (n=9); C: Wundzunge, MW PBS $1,34 \pm 0,22$ (n=12), 1 nM $1,86 \pm 0,23$ (n=9), 100 nM $1,69 \pm 0,20$ (n=11), 1 µM $2,32 \pm 0,27$ (n=9); D: Spitze der Wundzunge, MW PBS $0,48 \pm 0,10$ (n=12), 1 nM $0,82 \pm 0,10$ (n=9), 100 nM $0,93 \pm 0,09$ (n=11), 1 µM $0,94 \pm 0,12$ (n=9); ** = p < 0,01, * = p < 0,05 signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der Occludin-Intensität vom Geschlecht

Die Modelle männlicher und weiblicher Schweine unterschieden sich an allen Messorten hinweg (alle Konzentrationen gemeinsam) in der Auswertung der Intensität von Occludin (Abbildung 74) mittels Score nicht signifikant voneinander (p=0,963).

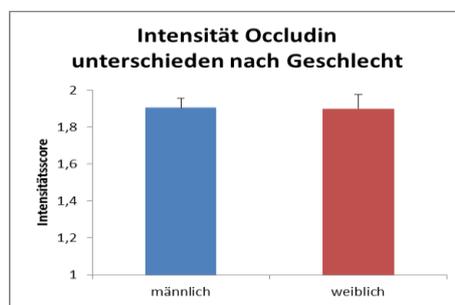


Abbildung 74: Intensität von Occludin in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine, beurteilt nach Score (alle Messorte gemeinsam); MW männlich $2,03 \pm 0,06$ (n=8), weiblich $2,01 \pm 0,10$ (n=4); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Betrachtete man die Messorte einzeln in allen Konzentrationen zusammen, so fielen signifikante Unterschiede am Messort UN ($p=0,012$) auf. Hier war Intensität von Occludin bei den Modellen weiblicher Schweine im Mittel (MW 2,85) größer als die Occludinintensität bei den Modellen männlicher Schweine (MW 2,36). Auch an der Spitze der Wundzunge ließen sich als Trend Unterschiede zwischen den Geschlechtern detektieren. Diese waren für den gesamten Messort zwar nicht signifikant ($p=0,059$), aber dennoch deutlich. Die Modelle männlicher Schweine waren hier im Mittel intensiver gefärbt (MW 0,92) als die weiblichen (MW 0,73) (siehe Abbildung 75).

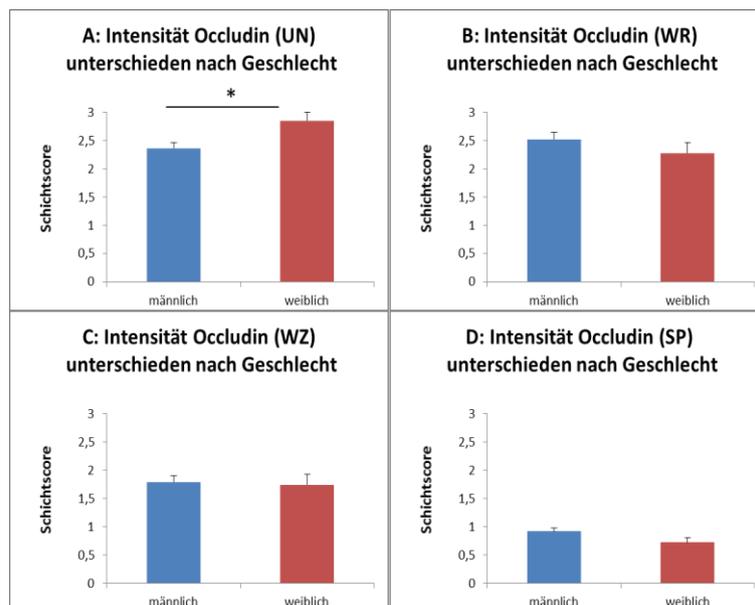


Abbildung 75: Intensität von Occludin in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher (n=8) und weiblicher (n=4) Schweine, beurteilt nach Score (alle Konzentrationen gemeinsam); A (UN): MW männlich $2,36 \pm 0,10$, weiblich $2,85 \pm 0,15$; B (WR): MW männlich $2,53 \pm 0,13$, weiblich $2,28 \pm 0,19$; C (WZ): MW männlich $1,79 \pm 0,12$, weiblich $1,75 \pm 0,18$; D (SP): MW männlich $0,92 \pm 0,06$, weiblich $0,73 \pm 0,08$; * = $p < 0,05$ signifikant verschieden, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der Occludin-Intensität von Konzentration und Geschlecht an den vier Messorten

Insgesamt zeigten sich im statistischen Test keine Wechselwirkungen von Konzentration und Geschlecht in Bezug auf die Occludinintensität. Bei den Modellen männlicher Schweine zeigten sich im Bereich der unbeteiligten Epidermis keine signifikanten Unterschiede in der Occludinintensität der behandelten im Vergleich zur Kontrolle mit PBS (Abbildung 76). Am Wundrand ergab sich bei den Modellen männlicher Schweine ein signifikanter Unterschied vom PBS zu allen Konzentrationen der behandelten Modelle (1 nM ($p=0,010$), 100 nM ($p=0,001$), 1 μ M ($p=0,008$)). An der Wundzunge zeigte sich

hier ein signifikanter Unterschied vom PBS zu den mit 1 μM ($p=0,020$) behandelten Modellen. Die niedrigeren Östrogenkonzentrationen zeigten im Trend eine höhere Intensität als die Kontrolle mit PBS. An der Spitze der Wundzunge ließ sich bei den Modellen männlicher Spender ein signifikanter Unterschied vom PBS zu allen mit Östrogen behandelten Modellen ermitteln (1 nM ($p=0,014$), 100 nM ($p < 0,001$), 1 μM ($p=0,003$)).

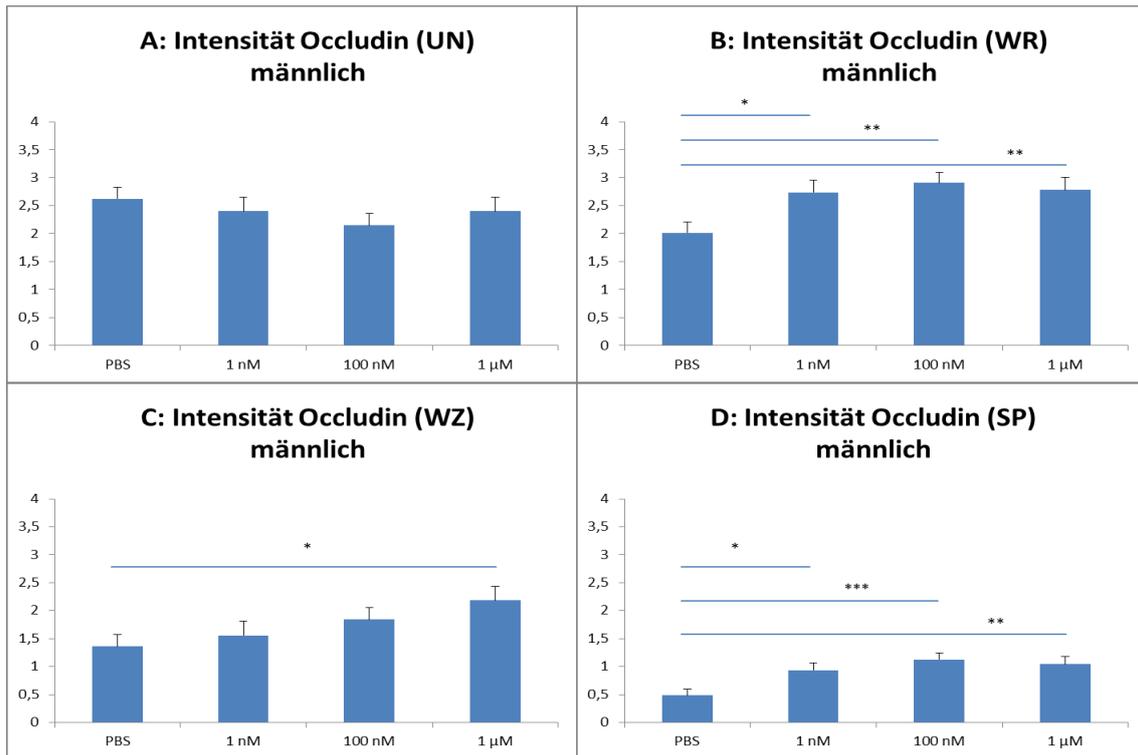


Abbildung 76: Intensität der Occludinfärbung mittels Score bei männlichen Schweinen an den jeweiligen Messorten, getrennt für die verschiedenen Konzentrationen; A: unbeteiligte Epidermis, MW PBS $2,61 \pm 0,21$ ($n=8$), 1 nM $2,40 \pm 0,24$ ($n=5$), 100 nM $2,15 \pm 0,21$ ($n=8$), 1 μM $2,40 \pm 0,24$ ($n=6$); B: Wundrand, MW PBS $2,01 \pm 0,19$ ($n=8$), 1 nM $2,73 \pm 0,22$ ($n=5$), 100 nM $2,91 \pm 0,19$ ($n=8$), 1 μM $2,78 \pm 0,22$ ($n=6$); C: Wundzunge, MW PBS $1,36 \pm 0,21$ ($n=8$), 1 nM $1,56 \pm 0,25$ ($n=5$), 100 nM $1,84 \pm 0,22$ ($n=8$), 1 μM $2,18 \pm 0,25$ ($n=6$); D: Spitze der Wundzunge, MW PBS $0,49 \pm 0,11$ ($n=8$), 1 nM $0,93 \pm 0,13$ ($n=5$), 100 nM $1,13 \pm 0,11$ ($n=8$), 1 μM $1,05 \pm 0,13$ ($n=6$); * = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model**

Bei der Auswertung der Modelle weiblicher Schweine zeigten sich im Bereich der unbeteiligten Epidermis keine signifikanten Unterschiede in der Intensität von Occludin beim Vergleich PBS zu den mit Östrogen behandelten Modellen. Es zeigte sich jedoch ebenfalls der Trend, dass die mit Östrogen behandelten Modelle intensiver gefärbt waren als die Kontrolle mit PBS. Am Wundrand zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In der Wundzunge fanden sich jedoch signifikante Unterschiede der mit 1 μM höchsten Konzentration ($p=0,018$) im Vergleich zur Kontrolle mit PBS. Der Unterschied

zu 1 nM ($p=0,110$) und zu 100 nM ($p=0,606$) war nicht signifikant. Die Konzentration 100 nM war jedoch signifikant weniger intensiv gefärbt als die anderen beiden Konzentrationen (zu 1 nM ($p=0,036$) und zu 1 μM ($p=0,008$)). An der Spitze der Wundzunge waren die Unterschiede in der Intensität der Occludinfärbung nicht signifikant, es zeigte sich jedoch der Trend, dass die behandelten Modelle intensiver gefärbt waren als die Kontrolle mit PBS (vergl. Abbildung 77).

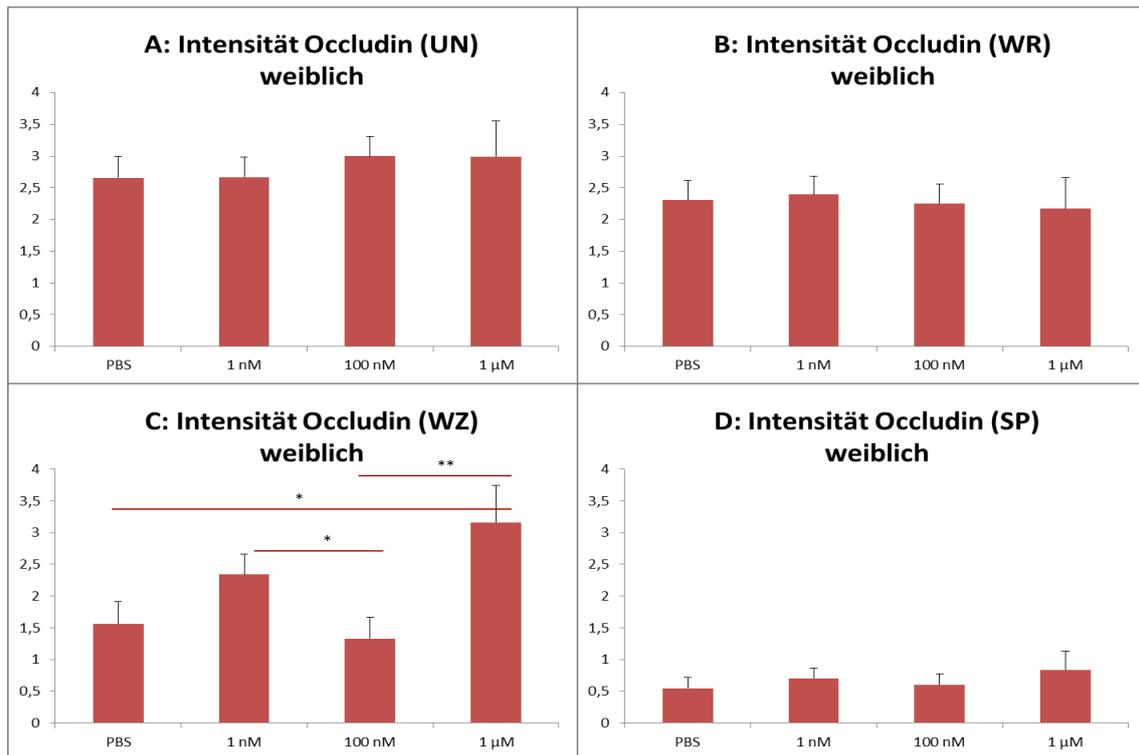


Abbildung 77: Intensität der Occludinfärbung mittels Score bei weiblichen Schweinen an den jeweiligen Messorten, getrennt für die verschiedenen Konzentrationen; A: unbeteiligte Epidermis, MW PBS $2,66 \pm 0,33$ ($n=4$), 1 nM $2,67 \pm 0,31$ ($n=4$), 100 nM $3,00 \pm 0,32$ ($n=3$), 1 μM $3,00 \pm 0,56$ ($n=3$); B: Wundrand, MW PBS $2,31 \pm 0,31$ ($n=4$), 1 nM $2,40 \pm 0,29$ ($n=4$), 100 nM $2,25 \pm 0,30$ ($n=3$), 1 μM $2,17 \pm 0,49$ ($n=3$); C: Wundzunge, MW PBS $1,56 \pm 0,35$ ($n=4$), 1 nM $2,34 \pm 0,32$ ($n=4$), 100 nM $1,33 \pm 0,36$ ($n=3$), 1 μM $3,16 \pm 0,58$ ($n=3$); D: Spitze der Wundzunge, MW PBS $0,55 \pm 0,18$ ($n=4$), 1 nM $0,70 \pm 0,17$ ($n=4$), 100 nM $0,60 \pm 0,17$ ($n=3$), 1 μM $0,84 \pm 0,30$ ($n=3$); ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.4.2 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Intensität des Occludins

Im statistischen Modell wurde berechnet, inwieweit die Länge der Wundzunge abhängig von der Intensität von Occludin an den jeweiligen Messorten ist (siehe Abbildung 78). Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang in der Länge der Wundzunge mit der Intensität der Occludin-Färbung an den Messorten (UN ($p=0,959$), WR ($p=0,817$), WZ ($p=0,846$), SP ($p=0,233$)).

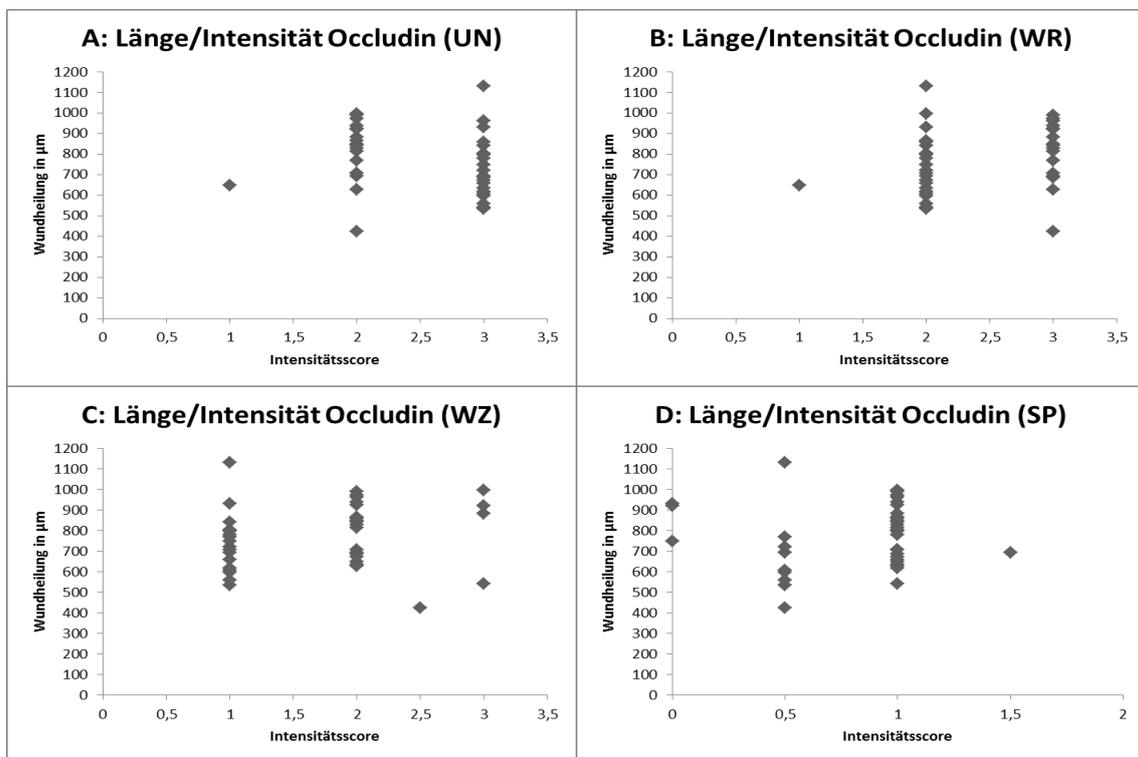


Abbildung 78: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Intensität der Occludin-Färbung an den jeweiligen Messorten (n=12); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.4.3 Schichtverteilung von Occludin

Abhängigkeit der Occludin-Schichtverteilung vom Messort

Zunächst wurde die Schichtverteilung von Occludin in den mit PBS behandelten Modellen beurteilt. Die Schichtverteilung von Occludin unterschied sich zwischen den Messorten. An der unbeteiligten Epidermis ($1,62 \pm 0,20$) war Occludin am breitesten (etwas breiter als am WR mit $1,44 \pm 0,20$) über die Schichten verteilt (siehe Abbildung 79, A und B). Die geringste Schichtverteilung gab es an der Spitze ($0,62 \pm 0,20$) der Wundzunge, der Unterschied zum Messort Wundzunge ($1,17 \pm 0,20$) war signifikant. Ein Vergleich zwischen den Messorten UN/WR und WZ/SP war nicht sinnvoll, da man 4 Schichten an UN/WR nicht mit 2 Schichten in WZ/SP vergleichen kann.

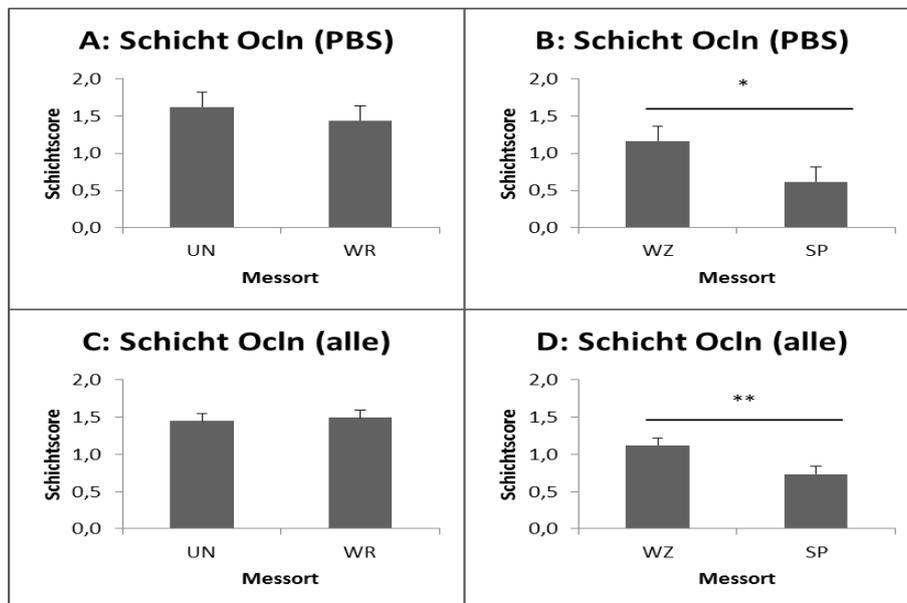


Abbildung 79: A + B: Schichtverteilung von Occludin in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten, beurteilt nach Score; MW UN $1,62 \pm 0,20$ (n=12), WR $1,44 \pm 0,20$ (n=12), WZ $1,17 \pm 0,20$ (n=12) und SP $0,62 \pm 0,20$ (n=12); C + D: Schichtverteilung von Occludin in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten, beurteilt nach Score; MW UN $1,45 \pm 0,10$ (n=12), WR $1,49 \pm 0,10$ (n=12), WZ $1,12 \pm 0,10$ (n=12) und SP $0,74 \pm 0,10$ (n=12); ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Bei allen Konzentrationen zeigten sich Unterschiede in der Schichtverteilung von Occludin. Hier war das Protein am WR ($1,49 \pm 0,10$) breitesten (UN $1,45 \pm 0,10$) über die Schichten verteilt (siehe Abbildung 79, C und D). Die geringste Schichtverteilung gab es an der Spitze ($0,74 \pm 0,10$) der Wundzunge, der Unterschied zum Messort Wundzunge ($1,12 \pm 0,10$) war jetzt sehr signifikant.

Abhängigkeit der Occludin-Schichtverteilung von der Östrogenkonzentration

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Schichtverteilung für Occludin für alle Messorte gemeinsam festgestellt werden (Abbildung 80) in den verschiedenen Östrogenkonzentrationen ($p=0,238$). Einzeln betrachtet zeigten sich an den Messorten keine signifikanten Unterschiede, daher sind hier beispielhaft die Daten über alle Messorte dargestellt.

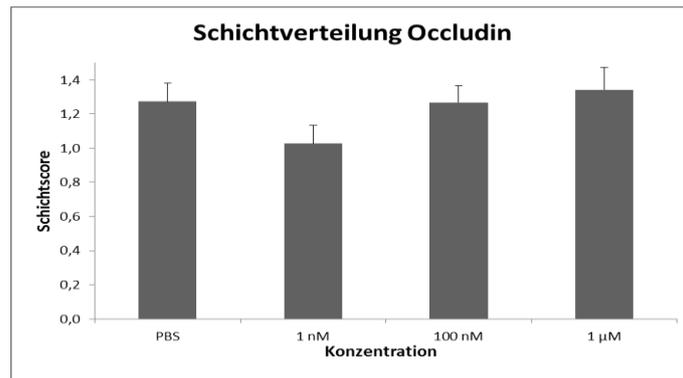


Abbildung 80: Schichtverteilung von Occludin in der Immunfluoreszenz in den Konzentrationen (alle Messorte), beurteilt nach Score; MW PBS $1,27 \pm 0,11$ ($n=12$), 1 nM $1,03 \pm 0,11$ ($n=9$), 100 nM $1,27 \pm 0,10$ ($n=11$) und 1 µM $1,34 \pm 0,13$ ($n=9$), ($p=0,111$ zwischen PBS und 1 nM); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der Occludin-Schichtverteilung vom Geschlecht

Das Geschlecht beeinflusste die Schichtverteilung von Occludin an keinem der Messorte ($p=0,445$). Exemplarisch sind hier die Daten zusammenfassend für alle Messorte gezeigt (siehe Abbildung 81).

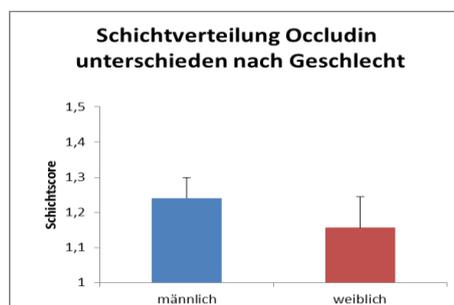


Abbildung 81: Schichtverteilung von Occludin in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (alle Messorte gemeinsam), beurteilt nach Score; MW männlich $1,24 \pm 0,06$ ($n=8$), weiblich $1,16 \pm 0,09$ ($n=4$); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.4.4 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Schichtverteilung von Occludin

Bei der Betrachtung der einzelnen Messorte zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Länge der Wundzunge bezogen auf die Schichtverteilung von Occludin in der Wundzunge ($p=0,021$), (siehe Abbildung 82). Hier fiel auf, dass Modelle mit einem niedrigen Schicht-Score (weniger breite Verteilung) in der Wundzunge besser heilten als jene mit einer breiteren Verteilung. Die Unterschiede für die anderen Messorte waren nicht signifikant (UN ($p=0,097$), WR ($p=0,160$), WZ ($p=0,021$), SP ($p=0,750$)).

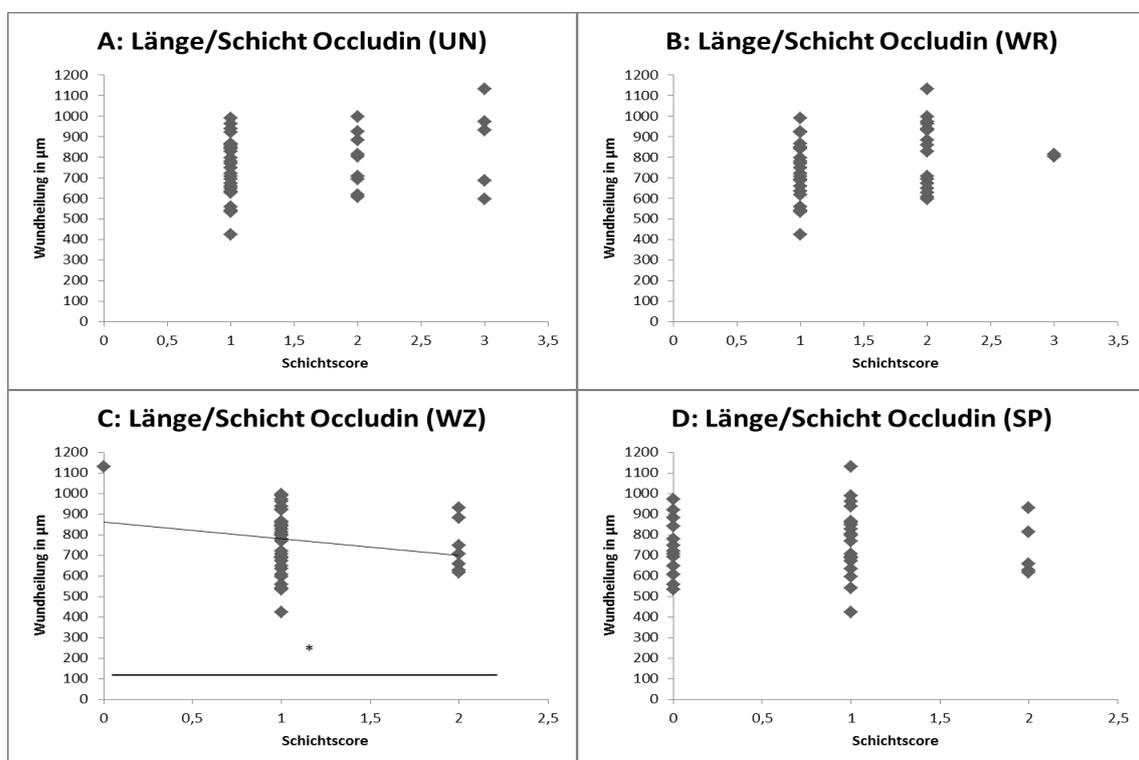


Abbildung 82: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Schichtverteilung der Occludin-Färbung an den jeweiligen Messorten (n=12), Trendlinie eingefügt, * = $p < 0,05$; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Hier stellte sich ebenfalls die Frage, ob die Modelle besser heilten, weil Occludin weniger breit exprimiert war oder ob die Heilung beschleunigt und die Expression deshalb bereits wieder beschränkt war. Um dies zu beantworten, wurde das linear-gemischte Modell erneut umgestellt und berechnet, inwieweit die Schichtverteilung von Occludin von der Länge der Wundzunge abhing. Hier zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang an der Wundzunge ($p=0,281$). Demzufolge ließ sich die Aussage treffen, dass die Wundheilung signifikant durch die Schichtverteilung von Occludin in der Wundzunge beeinflusst wird.

4.3.4.5 Verteilung von Occludin innerhalb der Zellen (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär)

Abhängigkeit der zellulären Occludin-Verteilung vom Messort

Betrachtete man die Verteilung von Occludin innerhalb der Zellen bei der Kontrolle mit PBS, so stellte man fest, dass die Verteilung an der UN ($2,86 \pm 0,15$) sehr stark auf die Zell-Zell-Grenzen bezogen war. Je näher man über den Verlauf der Wundzunge ($1,49 \pm 0,15$) bis zur Spitze ($0,49 \pm 0,15$) kam, desto mehr war Occludin intrazellulär lokalisiert (Abbildung 83, A).

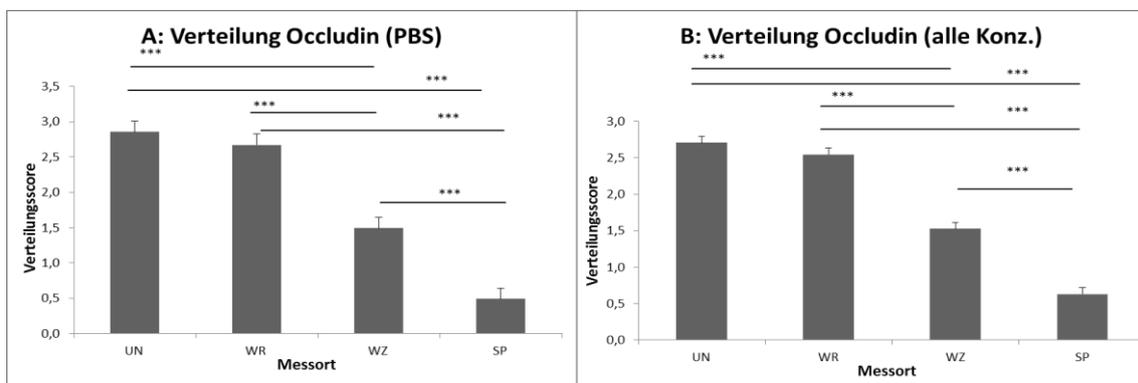


Abbildung 83: **A:** Verteilung von Occludin innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten bei der Kontrolle mit PBS, beurteilt nach Score; MW UN $2,86 \pm 0,15$ ($n=12$), WR $2,67 \pm 0,15$ ($n=12$), WZ $1,49 \pm 0,15$ ($n=12$) und SP $0,49 \pm 0,15$ ($n=12$); **B:** Verteilung von Occludin innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz an den vier Messorten in allen Konzentrationen, beurteilt nach Score; MW UN $2,71 \pm 0,09$ ($n=12$), WR $2,55 \pm 0,09$ ($n=12$), WZ $1,52 \pm 0,09$ ($n=12$) und SP $0,63 \pm 0,09$ ($n=12$); *** = $p < 0,001$ signifikant verschieden; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Die Auswertung der Konzentrationen zeigte ein ähnliches Ergebnis. Auch hier zeigte sich, dass die Verteilung an der UN ($2,71, \pm 0,09$) sehr stark auf die Zell-Zell-Grenzen bezogen war und je näher man zu Wundzunge ($1,52, \pm 0,09$) und deren Spitze ($0,63, \pm 0,09$) kam, desto mehr war Occludin intrazellulär lokalisiert (Abbildung 83, B). Unterschiede in den Signifikanzen ergaben sich hier nicht.

Abhängigkeit der zellulären Occludin-Verteilung von der Östrogenkonzentration

Die verschiedenen Östrogenkonzentrationen beeinflussten die Verteilung von Occludin an keinem der Messorte. Exemplarisch sind hier die Daten zusammenfassend für alle Messorte gezeigt (siehe

Abbildung 84).

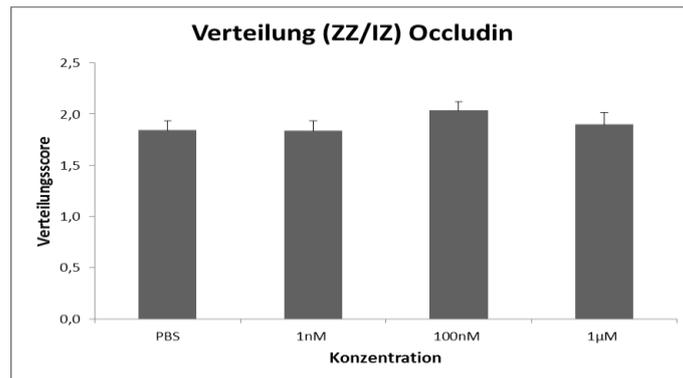


Abbildung 84: Verteilung von Occludin innerhalb der Zellen in der Immunfluoreszenz in den verschiedenen Konzentrationen (an allen Messorten gemeinsam), beurteilt nach Score; MW PBS $1,84 \pm 0,10$ (n=12), 1 nM $1,84 \pm 0,10$ (n=9), 100 nM $2,03 \pm 0,09$ (n=11), 1 µM $1,90 \pm 0,11$ (n=9); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Abhängigkeit der zellulären Occludin-Verteilung vom Geschlecht

Das Geschlecht beeinflusste die Verteilung (ZZ/IZ) von Occludin an keinem der Messorte ($p=0,881$). Exemplarisch sind hier die Daten zusammenfassend für alle Messorte gezeigt (siehe Abbildung 85).

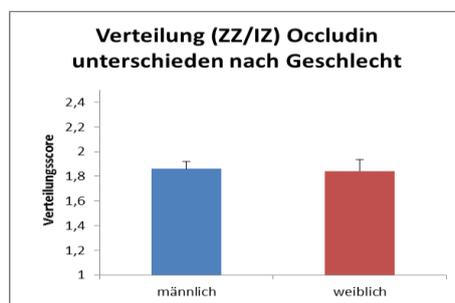


Abbildung 85: Verteilung (ZZ/IZ) von Occludin in der Immunfluoreszenz bei Modellen männlicher und weiblicher Schweine (über alle Messorte gemeinsam), beurteilt nach Score; MW männlich $1,86 \pm 0,06$ (n=8), weiblich $1,84 \pm 0,09$ (n=4); keine signifikanten Unterschiede, statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

4.3.4.6 Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Verteilung von Occludin innerhalb der Zellen (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär)

Die Messorte UN ($p=0,221$), WR ($p=0,978$) und SP ($p=0,644$) zeigten keinen signifikanten Einfluss der Verteilung von Occludin auf die Länge der Wundzunge. Signifikant waren die Unterschiede in der Wundzunge ($p= 0,017$). Modelle, bei denen die Occludin-Verteilung in der Wundzunge diffuser im Intrazellulären lag, heilten im Schnitt besser als jene mit stärkerer Lokalisation an den Zell-Zell-Grenzen (siehe Abbildung 86).

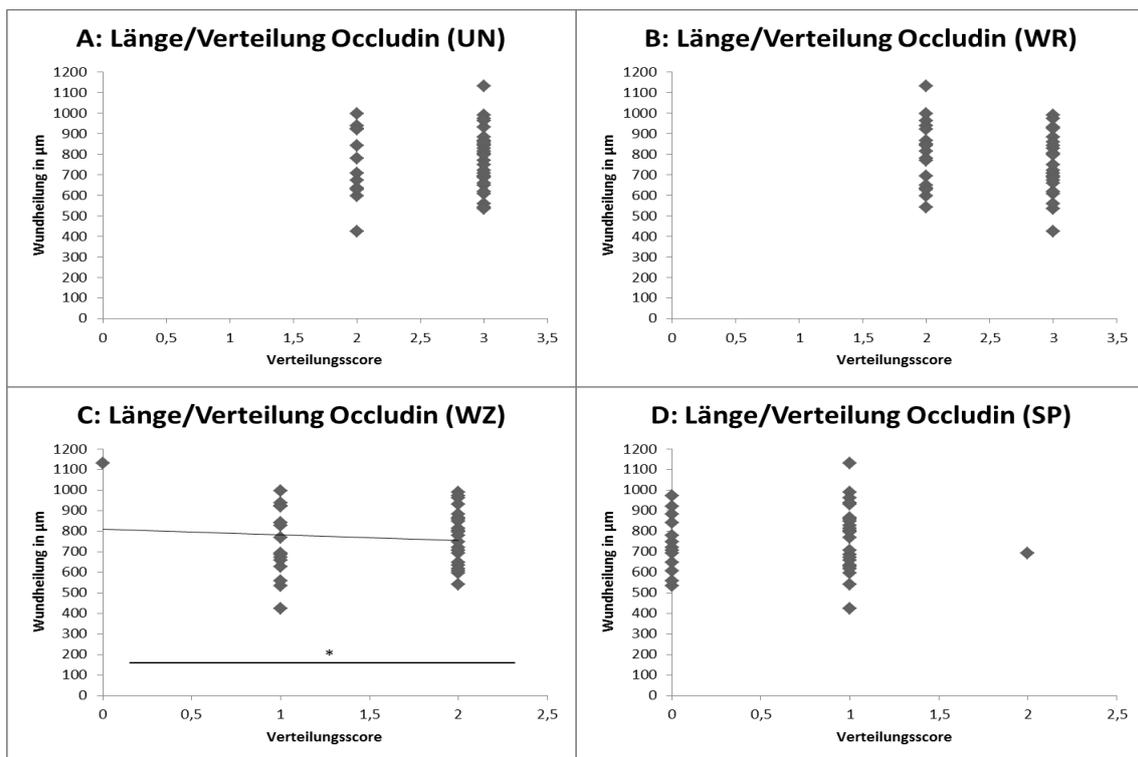


Abbildung 86: Abhängigkeit der Länge der Wundzunge von der Verteilung der Occludin-Färbung innerhalb der Zellen an den jeweiligen Messorten (n=12), Trendlinie eingefügt, * = $p < 0,05$; statistische Auswertung mit SPSS, linear-mixed-model

Da es sich ausschließlich um einen Messzeitpunkt (48 Stunden) handelte, konnte nicht beantwortet werden, ob die Wunden aufgrund der vermehrt intrazellulären Lokalisation besser heilten oder ob das Protein von der Heilung abhängig weniger an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert war. Um dies zu beantworten wurde das linear-gemischte Modell umgestellt und berechnet, inwieweit die Verteilung von Occludin von der Länge der Wundzunge abhing. Hier zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang an der Wundzunge ($p=0,571$).

4.3.4.7 Korrelation von Wundranderhaltung mit der Intensität, Schichtverteilung und Verteilung (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär) von Occludin an den jeweiligen Messorten

Die Wundranderhaltung war nicht signifikant abhängig von der Intensität von Occludin an den jeweiligen Messorten (UN ($p=0,857$); WR ($p=0,470$); WZ ($p=0,589$); SP ($p=0,992$)).

Es ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Wundranderhaltung in Bezug auf die Schichtverteilung von Occludin an den jeweiligen Messorten erkennen (UN ($p=0,973$); WR ($p=0,358$); WZ ($p=0,831$); SP ($p=0,974$)).

Es zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied der Wundranderhaltung in Bezug auf die Verteilung (Zell-Zell-Grenzen/intrazellulär) von Occludin an den jeweiligen Messorten (UN ($p=0,284$); WR ($p=0,833$); WZ ($p=0,492$); SP ($p=0,777$)).

5 Diskussion

5.1 Der Einfluss von Östrogen auf den Wundheilungsfortschritt im ex-vivo Wundmodell

Die Arbeitsgruppe Brandner hat zur Erforschung von akuten Wunden ein porcines ex-vivo Wundheilungsmodell (Patent-Nr. DE 10317400) entwickelt. Porcine Haut ermöglicht aufgrund der großen Ähnlichkeit zu menschlicher Haut (Sullivan et al. 2001) eine bessere Vergleichbarkeit und Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse als bei Versuchen z.B. an Nagern (Brandner J.M. et al. 2006). Das Wundmodell hat weitere Vorteile, es ist preisgünstig, gut an verschiedene Fragestellungen anzupassen und man vermeidet damit Forschung am lebenden Versuchstier. Da die Modelle von der systemischen Versorgung des Tieres abgeschnitten werden, ist es möglich, die intrinsischen Effekte der Wundheilung isoliert zu betrachten. Diese Effekte resultieren aus dem Zusammenspiel aller residenten Zellen in der Epidermis und Dermis (Keratinozyten, Fibroblasten, Merkelzellen, Melanozyten, Langerhans-Zellen und teilweise auch vorab eingewanderte T-Zellen). Effekte, die beispielsweise durch einwandernde Zellen des Immunsystems verursacht werden, können aber nicht untersucht werden.

Wunden allgemein und insbesondere schlecht heilende, chronische Wunden stellen für den einzelnen Patienten eine erhebliche Belastung und Bedrohung der körperlichen Unversehrtheit dar. Volkswirtschaftlich betrachtet stellen sie zudem eine große finanzielle Belastung dar. Es werden in Deutschland laut Studien jährlich 8 Milliarden Euro für die Versorgung chronischer Wunden ausgegeben. Die Zahl der Patienten mit chronischen Wunden wird derzeit auf 1,2 Millionen geschätzt (Ärzteblatt 10. Mai 2016) Um die Heilungsdauer für den Einzelnen zu senken und die Kosten für die Gesellschaft zu reduzieren, wird verstärkt daran geforscht, Faktoren zu identifizieren, die die Wundheilung positiv beeinflussen. Aus den Ergebnissen der Studien zur Hormonersatztherapie weiß man einiges über die positiven Effekte, die Östrogene auf die Haut im Allgemeinen haben. Es wurden zudem bereits einige Ansatzpunkte für den wundheilungsfördernden Effekt von Östrogen gefunden.

Eine der zentralen Fragen dieser Arbeit war, ob Östrogen auch in den ex-vivo Wundmodellen einen positiven Effekt hervorruft und ob diese somit als prä- bzw. postmenopausale Modelle verwendet werden könnten. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass auch die mit Östrogen behandelten ex-vivo Wundmodelle eine bessere Wundheilung aufwiesen als die unbehandelte Kontrolle. Dies bestätigt die Ergebnisse

der vorangegangenen Doktorarbeit, in der die Heilung noch mit einem Score bewertet wurde (Krüger 2014) (siehe auch Kapitel 5.2). Dieser Unterschied war in jeder Konzentration signifikant. Betrachtete man Modelle männlicher und weiblicher Spender gesondert, zeigte sich, dass die Modelle männlicher und weiblicher Schweine in der mit PBS behandelten Kontrolle nicht signifikant voneinander unterschieden. Durch die Östrogenbehandlung kam es aber bei den Modellen männlicher Schweine insgesamt zu einer deutlicheren Steigerung der Heilung als bei denen weiblicher Spender. Die Art der Applikation (in die Wunde oder über das Medium) wies dabei keinen signifikanten Unterschied auf. Die weiblichen Schweine hatten eine mittlere Östrogenkonzentration von 56ng/l (SEM +/- 4,6ng/l) (Krüger 2014). Als Referenz gilt prämenopausal der Bereich von 24,5-411ng/l je nach Zyklusphase. Bei den männlichen Tieren handelte es sich um kastrierte Schweine, die eine mittlere Östrogenkonzentration von 38ng/l (SEM +/- 5,7ng/l) (Referenzbereich 13,5-59,5ng/l) aufwiesen. Diese entsprach der Östrogenkonzentration postmenopausaler Frauen (< 39,5ng/l). Der Unterschied zwischen beiden Geschlechtern war signifikant ($p=0,032$) (Krüger 2014). Das bessere Ansprechen der männlichen Tiere kann möglicherweise durch die niedrigeren Östrogen-Spiegel bedingt sein. Ihnen fehlt somit eine entsprechende „Gewöhnung“ an hohe Östrogenspiegel. Ebenfalls fielen durch die Kastration die eher Heilung hemmenden Effekte der Androgene weg (Ashcroft und Mills 2002). In der unbehandelten Kontrolle heilen beide Geschlechter vergleichbar gut.

Die Effekte, die Östrogen in der Haut hervorruft, sind vielfältig und abhängig von vorhandenen Zelltypen und den jeweils vorliegenden Rezeptoren. Eine verzögerte Heilung im Alter geht mit niedrigeren TGF β 1-Level, verminderter Kollagensynthese und vermehrter Aktivität von Proteasen (z.B. Elastase) einher (Ashcroft et al. 1997, Ashcroft et al. 1999, Brincat et al. 2005).

Die verbesserte Heilung unter Östrogenbehandlung ist dagegen verbunden mit einer gesteigerten TGF β 1-Sekretion dermalen Fibroblasten (Ashcroft et al. 1997). Dermalen Fibroblasten haben sowohl ER α als auch ER β und zeigten unter der Behandlung mit Östrogen oder einem ER α -Agonisten eine erhöhte Migration (Stevenson et al. 2008, Stevenson et al. 2009, Thornton 2013). Demgegenüber exprimieren ER α -defiziente Makrophagen und dendritische Zellen höhere Level des pro-inflammatorischen Zytokins TNF α (Lambert et al. 2004), welches neben IL1 β eine wichtige Rolle in der verzögerten Heilung chronischer Wunden spielt (Basler und Brandner 2017, Volksdorf 2017).

In diesem Zusammenhang findet sich, dass Östrogen beispielsweise T-Zellen via ER α gegen eine von TNF α induzierte Zytotoxizität schützt (Takao et al. 2005). Wenn ein

Effekt auf T-Zellen möglich ist, könnten auch andere Zellen protegiert werden. Hierzu findet sich jedoch bisher nichts in der Literatur. Stimulierende Effekte (z.B. auf Fibroblasten) werden beschrieben (Stevenson et al. 2009).

Positive Effekte auf die Wundheilung scheinen ebenfalls über ER β (z.B. auf Keratinozyten) vermittelt zu sein. Sein Knock-Out verzögert die Wundheilung (Campbell et al. 2010). Östrogen steigert zudem die Angiogenese (in vitro) und die Wundkontraktion (Morales et al. 1995).

Ein weiterer verbessernder Faktor ist MIF (macrophage migration inhibitory factor). MIF wird während der Wundheilung in der proliferierenden Epidermis, von Immunzellen und Endothelzellen gebildet und ist ein Faktor, der die Wundheilung verzögert. Postmenopausal findet man stark erhöhte MIF-Level. Premenopausal unterdrückt Östrogen via ER α die Bildung von MIF (Ashcroft et al. 2003, Hardman et al. 2005). Östrogen wirkt ebenfalls auf Proliferation und Migration dermalen Zellen. Es stimuliert beispielsweise die Keratinozyten und supprimiert ihre Apoptose (Kanda und Watanabe 2003). Weitere Untersuchungen bzgl. dieser Faktoren im Östrogen-behandelten Wundmodell wären sinnvoll. Dies sind mögliche Faktoren, die die bessere Heilung der behandelten Modelle erklären können.

Während viel über die positiven Effekte von Östrogen auf die Haut im Allgemeinen und auf die Heilung von Wunden im Speziellen berichtet wurde, fanden Plackett et al. auch negative Effekte im Bereich Wundheilung. Sie konnten in Versuchen an Mäusen mit hohen Konzentrationen Östrogen (Gabe von 0,5 mg als implantiertes Pellet pro Maus, entspricht etwa 1,8 μ M), wie zum Ende einer Schwangerschaft, einen hemmenden Effekt auf die Wundheilung zeigen. Mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Östrogen in niedrigen Dosen stimulierend auf Keratinozyten und Makrophagen wirkt. Eine gewisse Inflammation ist für die Wundheilung erforderlich. Bei hohen Östrogenkonzentrationen scheint dann der anti-entzündliche Effekt aber so groß zu sein, dass er die positiven Effekte der Aktivierung von Keratinozyten überwiegt (Plackett et al. 2015). In den in meiner Arbeit vorliegenden Ergebnissen heilte jedoch auch die höchste Konzentration von 1 μ M (bei Modellen männlicher Schweine signifikant und bei denen weiblicher im Trend) besser als die Kontrolle mit PBS. Dies entspricht jedoch nur der halben Dosierung von Plackett. Es könnte also sein, dass bei den ex-vivo-Modellen unserer Schweine die tatsächlich erreichte Konzentration im Modell nicht hoch genug war, um die Heilung zu hemmen. Bei der Betrachtung des Wundheilungsfortschrittes der Modelle weiblicher Schweine fiel auf, dass die niedrigen Konzentrationen (1 nM und 2 nM) einen guten Effekt aufwiesen, während sich in den höheren Konzentrationen eine stufenweise Verschlechterung der Wundheilung als Trend zeigte. Zum Teil heilten

sie sogar signifikant schlechter als bei den Modellen männlicher Schweine (vergleiche Abbildung 16). Hinzu kommt noch, dass die initial gemessenen Konzentrationen im Blut der Mäuse und der Schweine sich deutlich unterschieden. Wir bestimmten Werte zwischen 38 ng/ml (männlich) und 56 ng/ml (weiblich) (Krüger 2014). Plackett wies dagegen Werte von 43 pg/ml für die Placebo-Gruppe aus. Die Konzentrationen zwischen Mäusen und Schweinen können sicherlich nicht 1:1 miteinander verglichen werden, jedoch sind die der Mäuse bereits von vornherein deutlich niedriger. Wenn dann noch mit etwa der doppelten Konzentration behandelt wurde, lassen sich hemmende Effekte auch damit erklären.

5.2 Vergleich der Auswertung des Wundheilungsfortschrittes mittels Score und mittels Längenvermessung unter dem Mikroskop

In der vorangegangenen Doktorarbeit von Frau Dr. Carmen Klingelhöller (geb. Krüger) wurde der Wundheilungsfortschritt unter dem Mikroskop mittels Score bewertet. Mittlerweile wurde die Technik verbessert, so dass ich in der hier vorliegenden Arbeit die Wundheilung unter dem Mikroskop mittels Längenmessung der Wundzungen in μm beurteilen konnte. Ziel dieser Vermessung war es, die vorliegenden Ergebnisse zu überprüfen und objektiver statistisch auszuwerten.

Im Wesentlichen konnte ich die bereits vorliegenden Ergebnisse bestätigen. Frau Dr. Klingelhöller zeigte in ihrer Auswertung mittels Score, dass sich die mit PBS behandelte Kontrolle nicht signifikant zwischen Modellen männlicher und weiblicher Schweine unterschied. Dies konnte ich ebenfalls nachweisen. Ebenso bestätigte sich, dass das Gesamtkollektiv in jeder Konzentration signifikant besser heilte als die Kontrolle mit PBS. Auch die Art der Applikation (direkte Applikation/Applikation übers Medium) zeigte in meinen Ergebnissen, wie in der Arbeit zuvor, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Modellen. Dabei spielte auch das Geschlecht keine Rolle.

Feine Unterschiede ergaben sich jedoch bei den Konzentrationen. Bei Frau Dr. Klingelhöller gab es zwischen den Konzentrationen selbst keine signifikanten Unterschiede, es zeigte sich jedoch der Trend das die Konzentration mit 1 nM für die Geschlechter getrennt die höchsten Scorewerte erreichte. In meiner Auswertung konnte ich zudem signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen beobachten. Hier heilten im Gesamtkollektiv Modelle, die mit 1nM Östrogen behandelt wurden, signifikant besser als die Kontrolle mit PBS und die mit 2 nM behandelten. Zu 100 nM und 1 μM war der Unterschied knapp nicht signifikant. Ich habe hier jedoch, wie auch Frau Dr. Klingelhöller, keinen linearen Zusammenhang zwischen Östrogenkonzentration (zum Beispiel höhere Konzentrationen/ bessere Heilung) und Fortschritt der Wundheilung feststellen können, so dass eine Konzentration von 1 nM zur Verbesserung der Heilung ausreichend ist.

Auch bei der Auswertung von Konzentration und Geschlecht gab es vergleichbare Resultate, aber mit anderen Signifikanzen. Die vorherige Arbeit kam zu dem Ergebnis, dass in allen Konzentrationen einzeln die männlichen Modelle signifikant besser heilten als die weiblichen. In meiner Auswertung konnte ich diesen Trend bestätigen. Auch bei mir heilten die männlichen Modelle tendenziell besser als die weiblichen. Signifikant

war der Unterschied jedoch nur in der Konzentration 100 nM. Die detektierten feinen Unterschiede in den Ergebnissen könnten an der linearen Art der Auswertung liegen, bei der feinere Unterschiede besser abgebildet werden konnten als in der etwas gröberen Auswertung mit Hilfe der Scores. Zudem ist die Auswertung mit Hilfe der Scores eine eher subjektive Auswertung. Die Messung unter dem Mikroskop definiert die letzte Reteleiste als Startpunkt der Längenmessung und umfasst die zusammenhängenden Anteile der Wundzunge. Hier liegt weniger subjektive Abweichung vor. Trotz der höheren Subjektivität des Scores sind die Ergebnisse in ihrer Grundaussage gleich. Durch die genauere Methode nur noch etwas differenzierter.

Insgesamt gesehen konnte ich die Ergebnisse der Arbeit von Dr. Klingelhöller geb. Krüger in Bezug auf die wundheilungsfördernde Wirkung des Östrogens bestätigen. Nach der Auswertung scheinen die ex-vivo Wundmodelle männlicher Tiere als postmenopausales Modell verwendet werden zu können. Da sich bei der Art der Applikation keine wesentlichen Unterschiede ergaben ist eine lokale Applikation aufgrund der leichteren Handhabung der systemischen vorzuziehen.

5.3 Der Einfluss von Östrogen auf die Wundrand-erhaltung im ex-vivo Wundmodell

Bei der Wundrand-erhaltung zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Östrogen-Konzentration und der Art der Applikation, nicht aber des Geschlechts. Die mit PBS behandelte Kontrolle zeigte den optisch schönsten Wundrand. Alle behandelten Modelle (sowohl direkt als auch über das Medium) zeigten eine schlechtere Wundrand-erhaltung. Zudem fiel auf, dass die direkt behandelten Modelle eine schlechtere Wundrand-erhaltung hatten als PBS und die über das Medium behandelten.

In den unbehandelten Modellen und niedrigeren Konzentrationen (1 nM und 100 nM) zeigte sich bei den Modellen weiblicher Spender der optisch schönere Wundrand. In der höchsten Konzentration von 1 μM sah dieser jedoch signifikant schlechter aus als bei den Modellen männlicher Spender.

Mögliche Erklärung wäre, dass Östrogen bei direkter Applikation etwas an der Organisation und Anordnung am Wundrand verändert bzw. unruhiger erscheinen lässt. Trotz der optischen Unterschiede konnte dennoch keinerlei negativer Effekt auf den Wundheilungsfortschritt auch durch die hohen Dosierungen gezeigt werden. Berger et al. untersuchten bereits die verschiedenen Arten der Applikation über 9 Monate an Ratten und konnten ebenfalls keinerlei nachteiligen Effekt in Bezug auf die Wundheilung feststellen (Berger et al. 2010). Somit ist die optische Beurteilung der Wundrand-erhaltung nur bedingt geeignet für Prognosen, ob eine Wunde gut heilt oder nicht.

5.4 Der Einfluss von Östrogen auf die TJ-Proteine Claudin 1, Claudin 4, ZO-1 und Occludin

TJ-Proteine spielen in der Wundheilung eine Rolle. Östrogen beeinflusst die Wundheilung positiv, daher war die zweite zentrale Frage dieser Arbeit, inwieweit die Behandlung mit Östrogen einen Einfluss auf die TJ-Proteine (Claudin 1, Claudin 4, ZO-1 und Occludin) hat. Diese Proteine sind in unverletzter Haut in den Schichten der Epidermis unterschiedlich lokalisiert. Claudin 1 beispielsweise ist in allen lebenden Zellschichten vorhanden, Claudin 4 und ZO-1 finden sich im Stratum granulosum und im oberen Stratum spinosum, während Occludin vor allem im Stratum granulosum an Zellgrenzen vorkommt.

Die typischen TJ-Strukturen zeigen sich nur im Stratum granulosum (Kirschner und Brandner 2012). Nach einer Verletzung der Hautbarriere müssen sich im regenerierten Epithel die Tight Junctions zügig neu formieren, um die epitheliale Barriere wieder zu gewährleisten. Die genaue Bedeutung der Tight-Junction-Verbindungen zwischen Zellen für die Migrationsfähigkeit haben ist bisher noch nicht endgültig geklärt. Zum einen scheinen sich die Zellverbindungen lösen zu müssen um Migration zu ermöglichen (Pastar et al. 2014). Zum anderen scheinen die Zell-Zell-Verbindungen jedoch erforderlich um eine einheitliche und gerichtete Migration im Verbund zu ermöglichen (Hirashima et al. 2013). Das Verhältnis zwischen Lösen und Festhalten scheint muss scheinbar gut ausbalanciert sein um Wundheilungsstörungen zu vermeiden (Nunan et al. 2015). Die eigentlichen Tight Junctions bilden sich unter high-calcium Bedingungen (Brandner et al. 2002). Östrogen ist in der Lage, intrazellulär Calcium zu mobilisieren, so könnte es möglicherweise zu einer schnelleren Formierung funktionsfähiger Tight Junctions beitragen (Björnstrom und Sjöberg 2005).

Über welche Signalwege Östrogen die Regulation der Tight-Junction-Moleküle in der kutanen Wundheilung beeinflusst ist bisher nicht bekannt. Da in diesen Versuchen ausschließlich Modelle nach 48h untersucht wurden, wäre sowohl der genomische als auch der nicht genomische Pfad in der Signaltransduktion möglich. Es könnten Second-Messenger-Kaskaden wie MAPK, PKA oder AKT involviert sein (Watters und Dorsa 1998, Prossnitz und Maggiolini 2009, Yang und Reckelhoff 2011). Es gibt Ergebnisse zur Proliferation, die zeigen, dass Östrogen die Expression von Zellzyklusprotein Cyklin D2 induziert (über GPER/cAMP/PKA-Signalweg (Kanda und Watanabe 2004). Das Team um Verdier-Sevrain konnte zeigen, dass Östrogen zudem die Expression von Zellzyklusprotein Cyklin D1 über ER α und den MAPK-Signalweg induziert (Verdier-Sevrain et al. 2004).

Bei den immunhistochemischen Färbungen wurde pro Protein jeweils beurteilt, inwieweit es bei Intensität, Schichtverteilung und Verteilung (ZZ/IZ) des Proteins Unterschiede durch die Behandlung mit verschiedenen Östrogenkonzentrationen gibt. Dabei wurden der Messort und das Geschlecht berücksichtigt. Darüber hinaus wurde durch statistische Wechselwirkungen untersucht, ob mögliche Veränderungen der TJ-Proteine mit dem Wundheilungsfortschritt korrelieren.

5.4.1 Claudin 1

Intensität

Claudin 1 gehört zur Gruppe der Transmembranproteine (Furuse et al. 1998, Morita et al. 1999, Aijaz et al. 2006). Claudin 1 ist von besonderer Bedeutung für die Funktion der Tight Junctions. Wie bedeutend wurde mit Knock-Out-Experimenten belegt (Furuse et al. 2002). Bei der Auswertung wurde zu Beginn die Intensität der Färbung beurteilt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Intensität von Claudin 1 signifikant vom Messort abhing. Die unbeteiligte Epidermis (UN) war signifikant intensiver gefärbt als alle anderen Messorte. Je kürzer die regenerierte Wundzunge, desto weniger intensiv war die Färbung. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern. Betrachtete man die einzelnen Konzentrationen so ergab sich bei der Intensität ein signifikanter Unterschied in der Wundzunge zwischen PBS und 1nM. Die mit 1nM behandelten Modelle waren in der Wundzunge signifikant weniger intensiv angefärbt als die Kontrolle mit PBS. Interessanterweise wiesen die mit 1 nM Östrogen behandelten Modelle unter allen den besten Wundheilungsfortschritt auf. Alle anderen Vergleiche waren zwar nicht signifikant, es zeigte sich aber auch für die anderen Konzentrationen der Trend, dass die mit Östrogen behandelten Modelle an den Messorten WR, WZ und SP eher weniger intensiv gefärbt waren als die Kontrolle mit PBS. Die Arbeitsgruppe von Zhou fand eine Herunterregulation von Claudin 1 und damit verbunden eine Korrelation mit einer geringeren Adhäsion sowie gesteigerten Invasivität und Migration von Brustkrebszellen (MCF-7) (Zhou et al. 2015). Claudin 1 steht neben den Funktionen, die es als Tight-Junction-Protein hat, auch in der Diskussion als Tumorsuppressorgen und findet sich häufig in Mammakarzinomen (Krämer et al. 2000) und bei kolorektalen Karzinom herabreguliert (Süren et al. 2014). Wundheilung und Tumorstadium ähneln sich insofern, dass in beiden Fällen Zellen migrieren (EMT = Epithelial-mesenchymale Transition) proliferieren und Angiogenese stattfindet (Morales et al. 1995). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Oh et al.. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Expression von Claudin 1, ZO-1 und Occludin im vaginalen Epithel von Ratten und fand heraus, dass die Expression nach Ovariectomie signifikant abnahm und sich durch Behandlung mit Östrogen wieder auf das Niveau der Kontrolle erhöhte (Oh et al. 2016). Zu allen Zeitpunkten der Schwangerschaft bei Mäusen fanden Ahn et al. in der Plazenta von Mäusen relativ hohe Expressionslevel von Claudin 1, 2, 4 und 5 im Vergleich mit anderen Mitgliedern der Claudin-Familie und brachten dies in Zusammenhang mit den deutlich höheren Östrogenspiegeln im Vergleich zu nicht schwangeren Mäusen (Ahn et al. 2015). Mögliche Erklärungen für die im ersten Moment gegensätzlichen Effekte könnten die verschiedenen Techniken und Gewebe-

typen, vorherrschenden Östrogenrezeptoren in den jeweiligen Geweben und die Spezies sein.

Schicht

In meinen Ergebnissen ließ sich Claudin 1 in der unbeteiligten Epidermis immer in allen Schichten anfärben. Am Wundrand war die Färbung nicht immer in allen Schichten vorhanden. In der Wundzunge war Claudin 1 überwiegend in allen regenerierten Schichten angefärbt. In der Spitze manchmal nur in den oberen regenerierenden Schichten. Dr. Janina Heilmann, geb. Lentfer beobachtete für den Wundrand zu frühen Zeitpunkten eine Herabregulation für Claudin 1, dieser Effekt war nach 5 Tagen nicht mehr nachweisbar. Diese Korrelation wurde von ihr unabhängig vom Wundheilungsfortschritt sondern abhängig vom Messzeitpunkt nachweisen (Lentfer 2012). Bei Dr. Thomas Volksdorf konnte zum Teil am Wundrand - mit fortschreitender Wundheilung zunehmend - ein Verlust der Claudin-1-Expression im Stratum granulosum und des oberen Stratum spinosum beobachtet werden (Volksdorf 2017). Diesen Verlust konnte ich mit meinen Ergebnissen nicht zeigen. Hier war Claudin 1 in der Kontrolle mit PBS am Wundrand stets in allen Schichten angefärbt. Die Auswertungen meiner Arbeit beziehen sich jedoch nur auf einen Zeitpunkt (Auswertung nach 48 Stunden). Zudem könnten die Unterschiede auch daran liegen, dass in den vorherigen Arbeiten die Messorte Wundrand und regenerierende Epidermis nicht klar definiert wurden und sich somit die ausgewerteten Bereiche nicht 1:1 decken. Interessant in der Auswertung meiner Modelle war, dass die Claudin-1-Färbung in den mit Östrogen behandelten Modellen am Wundrand teils weniger breit war (bei 1 nM waren 91%, bei 100 nM 82% und bei 1 µM 86% in allen Schichten angefärbt). In der Arbeit von Dr. Heilmann konnte gezeigt werden, dass in regenerierenden Epidermis nach 48h 28,6% der Modelle negativ für Claudin 1 waren (Lentfer 2012). Auch die Arbeitsgruppe von Nunan und die Arbeit von Dr. Thomas Volksdorf beschrieben Claudin-1-negative Zellen an der Spitze der Wundzunge (Nunan et al. 2015, Volksdorf 2017). Diese Ergebnisse konnte ich bestätigen, bei meinen Auswertungen wiesen 36% der mit PBS behandelten Kontrolle an der Spitze der Wundzunge eine negative Färbung für Claudin 1 auf (bei 1 nM Östrogen waren es nur 9% und bei den höheren Konzentrationen gab es keine negativen Färbungen). Dr. Volksdorf konnte in Knockdown-Experimenten an humanen Keratinozyten zeigen, dass eine verminderte Expression von Claudin 1 zu einer beeinträchtigten Wundheilung im Scratch-Assay sowie einer verminderten Migration und Proliferation führte (Volksdorf et al. 2017). In meinen Versuchen war an der Spitze der Wundzunge Claudin 1 (mit Östrogen) breiter verteilt als in der mit PBS behandelten Kontrolle und

somit auch in den basalen Schichten zu finden. Dies weist auf eine verstärkte Wirkung auf basale Prozesse wie zum Beispiel Proliferation hin (Safferling et al. 2013). Der Verlust von Claudin 1 (und Occludin) am Wundrand und/oder in der regenerierenden Epidermis, wie er häufig in chronischen Wunden beobachtet wird, hat dagegen direkte negative Auswirkungen auf die Wundheilung (geminderte Migration und Proliferation von Keratinozyten). Der Verlust der Proteine tritt häufig zusammen auf, so dass sich die negativen Folgen addieren und zum gestörten Heilungsprozess chronischer Wunden beitragen (Volksdorf 2017). Eine direkte Abhängigkeit des Wundheilungsfortschrittes von der Schichtverteilung des Claudin 1 konnte ich zwar nicht nachweisen, ein fehlender Verlust des Proteins könnte jedoch zusammen mit anderen Effekten eine bessere Wundheilung der behandelten Modelle erklären.

Verteilung

Die Verteilung (ZZ/IZ) von Claudin 1 war in der unbeteiligten Epidermis überwiegend auf die Zell-Zell-Grenzen bezogen, je näher man an die Spitze der Wundzunge kam, desto mehr fand sich das Protein intrazellulär. Diese Unterschiede waren weder konzentrations- noch geschlechtsabhängig, durch Östrogenbehandlung waren die Ergebnisse auch auf niedrigerem Signifikanzniveau signifikant ($p < 0,001$ statt unbehandelt $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Wenn Claudin 1 vermehrt innerhalb der Zellen und weniger an den Zell-Zell-Grenzen zu finden ist, so führt dies zu einer verminderten Barrierefunktion der Tight Junctions (Bäsler et al. 2016). Weniger Protein an den Zell-Zell-Grenzen (kein Verlust des Proteins) könnte den Zellen ebenfalls eine bessere Migration ermöglichen. In der Literatur lassen sich hierzu lediglich Untersuchungen zur Menge des Proteins finden (gemessen mit mRNA, Proteinmenge etc.), jedoch konnte ich keine Ergebnisse zur Beschreibung der Lokalisation des Proteins innerhalb der Zellen finden.

Wundheilung

Für Claudin 1 zeigten sich einige Veränderungen in der Verteilung, Schichtverteilung und Intensität durch die Behandlung mit Östrogen. Eine direkte positive Korrelation zwischen diesen Parametern und dem Wundheilungsfortschritt konnte nicht nachgewiesen werden. Die Veränderungen könnten jedoch, auch in der Summe mit den Effekten auf die anderen Tight-Junction-Proteine, die deutlich verbesserte Wundheilung im Vergleich zur Kontrolle mit PBS erklären.

5.4.2 Claudin 4

Intensität

Claudin 4 gehört wie auch Claudin 1 zur Gruppe der Transmembranproteine (Furuse et al. 1998, Morita et al. 1999, Aijaz et al. 2006). Während der Wundheilung zeigte sich Claudin 4 in der unbeteiligten Epidermis in den oberen lebenden Schichten der Epidermis, anfärbbar. Die Intensität von Claudin 4 nahm in der Kontrolle mit PBS von der unbehandelten Epidermis über den Wundrand bis zu Spitze der Wundzunge hin stetig ab. Bei den behandelten Modellen zeigte sich eine vermehrte Anfärbbarkeit insbesondere am Wundrand. Der Vergleich zur unbeteiligten Epidermis und zur Spitze der Wundzunge war signifikant. Süren et. al. untersuchten den Verlust der Tight-Junction-Proteine Claudin 1, 4 und 7 in Bezug auf die Aggressivität kolorektaler Karzinome (Süren et al. 2014). Hier hatte die verminderte Expression eine vermehrte Motilität, Proliferation und Invasivität des Tumors zur Folge. Eine Hochregulation am Wundrand scheint sinnvoll, um eine suffiziente Barriere („inside-out“ und „outside-in“) bei fehlendem Stratum corneum zu bilden. Eine Runterregulation an der Wundzunge und deren Spitze ermöglicht demnach die erforderliche Motilität und Fähigkeit zur Proliferation, die erforderlich ist, um die Wunde zügig zu schließen. Ein kompletter Knock-Down von Claudin 4 wiederum inhibierte die Zell-Motilität in den Versuchen von Webb et. al. (Webb et al. 2013). Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass die zweite extrazelluläre Schleife der Claudine mit der extrazellulären Umgebung interagiert und normale und Tumorzellmotilität beeinflusst, wenn sie nicht mit den Tight Junctions assoziiert ist.

Zunächst im Gegensatz dazu scheinen Ergebnisse aus Forschungen an östrogensensitiven Geweben wie beim Endometriumkarzinom (Cuevas et al. 2015) und Mammakarzinom (Lanigan et al. 2009) zu stehen. Im Gewebe des gesunden Uterus findet sich generell nur eine geringe Claudin-4-Expression. Beim Endometriumkarzinom zeigte dagegen eine Überexpression von Claudin 4 eine damit positive Korrelation mit Tumorprogression und erhöhter myometrialer Invasion (Cuevas et al. 2015). Auch Lanigan et al. wiesen eine erhöhte Expression von Claudin 4 in Mammakarzinomen nach. Diese führte zu einem gewissen Polaritätsverlust und korrelierte positiv mit dem Grading des Tumors und HER2 und negativ mit ER. Eine hohe Claudin-4-Expression war vergesellschaftet mit einer schlechteren Überlebensrate der Patienten (Lanigan et al. 2009). Betrachtete man in den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit die Intensitäten der verschiedenen Konzentrationen, so ließ sich feststellen, dass die höchste Östrogenkonzentration 1 μM die höchsten Intensitätswerte aufwies. Dies war am Wundrand im Vergleich zu allen anderen Konzentrationen signifikant. Diese Ergebnisse pas-

sen zu denen aus der Arbeit von Ahn et al. (Ahn et al. 2015) in der nach Gabe eines Östrogenrezeptoragonisten sowohl die Expression von Claudin 4 mRNA als auch die Menge des Proteins selbst anstieg. Durch diesen Effekt ließ sich jedoch weder eine positive noch eine negative Korrelation zum Wundheilungsfortschritt feststellen. Mögliche Erklärungen für die unterschiedlichen Effekte (vermehrte/ verminderte Expression von Claudin 4) könnten die verschiedenen Techniken und Gewebetypen, die vorherrschenden Rezeptoren in den jeweiligen Geweben und die verschiedenen Spezies sein.

Schicht

Betrachtete man die Schichtverteilung von Claudin 4, so war diese am Wundrand verbreitert gegenüber allen anderen Messorten. Hier fielen insbesondere Effekte durch die Behandlung mit Östrogen auf. Bei der Kontrolle mit PBS hatten hier 9% der Modelle eine Färbung des Stratum granulosum und gesamten Stratum spinosum (Score 3) oder aller Schichten (Score 4). Bei Modellen, die mit 1 nM Östrogen behandelt wurden, waren es 18%, bei 100 nM 55% und bei 1 µM 34%. Eine Verbreiterung am Wundrand wurde zwar auch während der unbehandelten Wundheilung (Lentfer 2012) beschrieben, durch die Behandlung mit Östrogen erhielt ich jedoch signifikante Ergebnisse. In der Literatur wird bei Patienten mit eingeschränkter Hautbarriere (atopischer Dermatitis) Claudin 4 beispielsweise in nicht läSIONaler Haut breiter verteilt und intensiver gefärbt als bei gesunden Kontrollpersonen. Dies könnte ein Kompensationsmechanismus zur Wiederherstellung der beeinträchtigten Barriere des Stratum corneum sein (Gruber et al. 2015).

In der Schichtverteilung fielen zwischen den Modellen männlicher und weiblicher Schweine in der Wundzunge signifikante Unterschiede auf. Hier war das Protein bei den weiblichen Schweinen breiter über die Schichten verteilt als bei den männlichen. (Modelle weiblicher Schweine heilten im Vergleich schlechter als männliche). Eine breitere Verteilung könnte zu mehr Schichten mit funktionellen Tight Junctions führen und so einen Versuch darstellen, die Barrierefunktion der Haut trotz Verletzung aufrecht zu erhalten (Kirschner et al. 2009). Kirschner et. al. konnten in ihren Versuchen an Haut von Psoriasis-Patienten (frühe Stadien und Psoriasis vom Plaque-Typ) in dem Zusammenhang keinen Einfluss der veränderten Lokalisation der TJ-Proteine auf Differenzierung und Proliferation feststellen. Interessant wäre in diesem Kontext, ob es Auswirkungen auf die Migration der Zellen gab. Möglich wäre eine geringere Migrationsfähigkeit durch breitere Schichtverteilung was die geringere Heilung bei Modellen weiblicher Schweine erklären könnte.

Verteilung

Die Verteilung von Claudin 4 in den mit PBS behandelten Kontrollen war in der unbelegten Epidermis stark auf die Zell-Zell-Grenzen bezogen, zur Spitze der Wundzunge hin zunehmend intrazellulär lokalisiert. Die Ergebnisse durch die Behandlung mit Östrogen waren auch auf niedrigerem Niveau signifikant ($p < 0,001$ statt unbehandelt $p < 0,01$). Bei den einzelnen Messorten fanden sich an der SP signifikante Unterschiede zwischen PBS und 100 nM. Hier war die Claudin-4-Verteilung in der Konzentration 100 nM (für 1 nM als Trend) mehr auf den Intrazellularraum bezogen als in der mit PBS behandelten Kontrolle. In der höchsten Konzentration 1 μ M kehrte sich dieser Trend um und Claudin 4 war wieder vermehrt an den Zell-Zell-Grenzen zu finden. Wenn Claudin 4 vermehrt innerhalb der Zellen und weniger an den Zell-Zell-Grenzen zu finden ist, so führt dies zu einer verminderten Barriere-Funktion der Tight Junctions (Bäsler et al. 2016) und zu vermehrter Proliferation, Motilität und Invasivität der Zellen. Die Arbeitsgruppe von Hahn-Strömberg konnte zeigen, dass die Intensität der Claudin-4-Färbung an der Zellmembran von kolorektalen Karzinomen signifikant niedriger als in normaler Mucosa ist und die Krebszellen eine dystopie zytoplasmatische Lokalisation des Claudins zeigten (Hahn-Strömberg et al. 2017). Auch Kirschner et. al. konnten in der Forschung zum Thema Psoriasis neben einer Verbreiterung der Schichtlokalisierung auch eine vermehrt zytoplasmatische Lokalisation für Claudin 4 feststellen (Kirschner et al. 2009). In der zuvor zitierten Arbeit von Cuevas konnten bezüglich der Claudin-4-Verteilung innerhalb der Zellen zu meiner Arbeit ähnliche, dosisabhängige, Unterschiede mit stärkerem Bezug auf die Zell-Zell-Grenzen in der Kontrolle und bei hohen Dosierungen und vermehrter intrazellulärer/ zytoskelettaler Lokalisation in mittlerer Konzentration (biphasischer Effekt) gezeigt werden.

Bei der Verteilung innerhalb der Zelle fielen zwischen den Modellen männlicher und weiblicher Schweine am Wundrand signifikante Unterschiede auf. Hier war das Protein bei den weiblichen Schweinen mehr an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert als bei den männlichen. Eine vermehrte Lokalisation an den Grenzen würde bedeuten, dass dort auch mehr für die Bildung für Tight Junctions zur Verfügung steht, dort gebunden ist und eine Barriere ausbildet (Bäsler et al. 2016). Im Gegenzug kommt es dadurch auch zu verminderter Proliferation, Motilität und Invasivität der Zellen. Modelle weiblicher Schweine heilten hier im Vergleich schlechter als männliche.

Wundheilung

Betrachtete man die Wundheilung, so ließ sich feststellen, dass Wunden mit einem höheren Verteilungsscore für Claudin 4 (mehr Protein an den Zell-Zell-Grenzen) im Mittel eine längere Wundzunge hatten als Wunden mit einem niedrigeren Score (mehr Protein intrazellulär). Zunächst schien sich hier ein Widerspruch zu zuvor angeführten Quellen zu ergeben, die mehr Protein an den Zell-Zell-Grenzen mit geringerer Motilität und Proliferation in Zusammenhang brachten. Es stellte sich natürlich die Frage, ob die Verteilung die längere Wundzunge bedingte oder ob aus der fortgeschrittenen Heilung die Verteilung zurück an die Zell-Zell-Grenzen resultierte. Um dies zu beantworten, wurde das linear-gemischte Modell umgestellt und berechnet, inwieweit die Verteilung von Claudin 4 von der Länge der Wundzunge abhing. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang für die Messorte Wundrand ($p=0,017$) und Spitze der Wundzunge ($p=0,048$), was bedeutete: Je fortgeschrittener die Heilung, desto mehr lag Claudin 4 an den Zell-Zell-Grenzen vor. Man kann also hier von einer Korrelation der beiden Parameter sprechen, eine Untersuchung der Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten während der Wundheilung wäre hier ergänzend erforderlich. Eventuell trägt die Summe der geschlechtsspezifischen Unterschiede zur besseren Wundheilung der Modelle männlicher Spender bei.

5.4.3 ZO-1

Intensität

ZO-1 ist ein TJ-Protein, welches an den Zellgrenzen in den oberen Schichten der Epidermis nachgewiesen werden konnte (Pummi et al. 2001, Brandner et al. 2002). Es gehört, anders als die zuvor beschriebenen Claudine, zu den Plaqueproteinen der Tight Junctions (Stevenson et al. 1986) und stellt die Verbindung mit dem Aktinzytoskelett her (Anderson et al. 1995, Keon et al. 1996). Bei der Auswertung der Intensität von ZO-1 konnte ich zeigen, dass diese von der unbeteiligten Epidermis zum Wundrand hin zunächst zu- und zur Spitze der Wundzunge hin wieder abnahm. Hier fand man keine Unterschiede zwischen den Konzentrationen oder den Geschlechtern und auch keinen signifikanten Einfluss auf die Wundheilung. Diese größere Intensität am Wundrand könnte ein Hinweis auf mehr Protein sein. Mehr Protein könnte über den Transkriptionsfaktor ZONAB die Proliferation von Zellen positiv beeinflussen (s.u.) (Jaramillo et al. 2004). Die Zellen am Wundrand und in der Wundzunge sind diejenigen, die vorwiegend migrieren und proliferieren (Martin 1997). Dass ZO-1 für ausreichende Migration erforderlich ist, konnten Lee et al. zeigen, da ein Knockdown von ZO-1 an humanen Zellen eines Adenokarzinoms der Lunge einen negativen Effekt auf die Migration aufwies (Lee et al. 2015). Ein Knockdown von ZO-1 führt zudem zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von IL-1 β (Bäsler et al. 2016). IL-1 β und TNF α wiederum beeinflussen selbst die Tight Junctions. So erhöhte sich nach Zugabe dieser proinflammatorischen Zytokine der TER aufgrund einer vermehrten Lokalisation der Tight-Junction-Proteine an den Zell-Zell-Grenzen. Bei Langzeitbehandlung dagegen sank der TER und die Proteine wurden vermindert exprimiert (Kirschner et al. 2009). Pathologisch erhöhte Konzentrationen von IL-1 β und TNF α sind als Zytokine vor allem in chronischen Wunden mit verzögerter Wundheilung in Verbindung gebracht worden (Volksdorf 2017). Auch für die Differenzierung der Zellen scheint ZO-1 erforderlich zu sein. Die Arbeitsgruppe von Hoover et. al. fand dazu in der Forschung an Mammakarzinomen heraus, dass die Anfärbarkeit von ZO-1 abnimmt, je undifferenzierter der Tumor ist (Hoover et al. 1998). In ihrer Arbeit wurde die Intensität der ZO-1-Färbungen im Tumor innerhalb jeder Patientenbiopsie mit normalem Drüsen- und Milchgangewebe verglichen. Somit wurden wie auch in meiner Arbeit die interindividuellen Unterschiede der Anfärbarkeit berücksichtigt. In einer weiteren Studie wurde die Korrelation von hochreguliertem ZO-1 und der Prognose für Patienten mit gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) untersucht. Hier zeigte sich, dass die Nachweisbarkeit von ZO-1 ein positiver Prognosefaktor der Überlebenszeit ist und unterstützt die Vorstellung das ZO-1 auch als Tumorsuppressorgen fungiert (Zhu et al. 2013).

Schicht

ZO-1 zeigte sich in meiner Auswertung in der unbehandelten Epidermis und dem Wundrand fast immer im Stratum granulosum und gesamten Stratum spinosum anfärbbar. Diese Ergebnisse decken sich im Wesentlichen mit denen von Dr. Heilmann. Zu frühen Zeitpunkten nach Verwundung zeigte sich ZO-1 in ihrer Arbeit nur im Stratum granulosum anfärbbar. Die Färbung verbreiterte sich zu späteren Zeitpunkten (48 Stunden, 5 Tage). Sie konnte zeigen, dass nach 48 Stunden etwa 90% der Modelle eine Färbung im Stratum granulosum und gesamten Stratum spinosum aufwiesen, in weniger als 10% der Fälle umfasste die Färbung nicht das gesamte, sondern nur das obere Stratum spinosum (Lentfer 2012). Auch in der Arbeit von Dr. Volksdorf konnte gezeigt werden, dass ZO-1 am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis während der Wundheilung zum Teil stark verbreitert lokalisiert war (Volksdorf 2017). Er beschrieb, dass ZO-1 in der regenerierenden Epidermis sogar bis ins Stratum basale nachzuweisen war. Dies deckte sich ebenfalls mit meinen Beobachtungen: In Bezug auf die Schichtverteilung fiel auf, dass bei den mit PBS behandelten Modellen ZO-1 tendenziell in der Wundzunge breiter verteilt war als an der Spitze der Wundzunge. Dort war es häufig nur noch in der obersten Schicht der regenerierenden Epidermis anzufärben. Durch die Behandlung mit Östrogen (alle Konzentrationen) verstärkte sich dieser Trend und man erhielt hier ein signifikantes Ergebnis. Betrachtete man die Konzentrationen zudem noch einzeln, so hatte die Behandlung mit Östrogen an allen Messorten signifikante Auswirkungen auf die Schichtverteilung von ZO-1. In der unbehandelten Epidermis und am Wundrand waren die Schichten mit Östrogen breiter, in der Wundzunge mit zunehmender Konzentration eher schmaler. Eine Korrelation von ZO-1-Expression und Applikation von Östrogen wurde ebenfalls in Arbeiten der Arbeitsgruppe von Oh et al. publiziert. Sie fanden im vaginalen Epithel von Ratten heraus, dass die Expression von ZO-1 nach Ovariectomie signifikant abnahm und sich durch Behandlung mit Östrogen wieder erhöhte (Oh et al. 2016). Kreft et al. fanden in Versuchen mit Urothelzellen heraus, dass die „leading-edge“-Zellen ZO-1, Claudin 4, Occludin, aber kein Claudin 8 exprimieren. ZO-1, Claudin 4, Occludin wurden dabei an den Zellmembranen mit Kontakt zu Nachbarzellen schon zu frühen Zeitpunkten während der Wundheilung gefunden, was darauf hindeuten könnte, dass die Formierung von Tight Junctions wichtig für den späteren Differenzierungsprozess sein könnte (Kreft et al. 2006).

Verteilung

In der Verteilung (ZZ/IZ) der mit PBS behandelten Kontrolle fiel auf, dass ZO-1 in der unbeteiligten Epidermis überwiegend an den Zell-Zell-Grenzen zu finden war, während es, je näher man der Spitze der Wundzunge kam, zunehmend intrazellulär lokalisiert war. Dieser Effekt wurde durch Östrogen (alle Konzentrationen zusammen) noch verstärkt und das Protein war an den Messorten WR, WZ und SP verstärkt intrazellulär anfärbbar. Dazu fanden Jaramillo et al. heraus, dass ZO-Proteine (1 und 2) beispielsweise in Phasen gesteigerter Proliferation vermehrt im Zellkern zu finden sind und für die vermehrte Produktion von Zellzyklusproteinen sorgen und diese stabilisieren (Jaramillo et al. 2004). ZO-1 beispielsweise interagiert mit dem Transkriptionsfaktor ZONAB. Solange ZO-1 an den Tight Junctions assoziiert ist, bindet und inhibiert es den Transkriptionsfaktor ZONAB über die SH3-Domäne. Liegt ZO-1 nicht an die Tight Junctions gebunden, sondern im Kern vor, fällt die Bindung und Inhibition von ZONAB weg und beeinflusst so die Proliferation positiv (Balda und Matter 2009). ZO-1 und ZONAB regulieren zusätzlich die Expression vom Erb-B2 (HER2/neu) (Balda und Matter 2000). Neben den ZO-Proteinen gibt es noch weitere Faktoren, die während der Wundheilung, wenn wenig „reife“ Tight Junctions bestehen, im Zellkern für Proliferation sorgen. Ein Beispiel wäre die Aktivierung von β -Catenin durch Akt (Farkas et al. 2012).

Betrachtete man bei der Verteilung (ZZ/IZ) von ZO-1 ergänzend die einzelnen Östrogenkonzentrationen, so zeigten sich an WR, WZ und SP deutliche Unterschiede. Es ließ sich feststellen, dass die Konzentration 1 nM an WR und WZ die stärkste intrazelluläre ZO-1-Verteilung aufwies. Aber auch die anderen Östrogenkonzentrationen wiesen mehr intrazelluläre Lokalisation auf als die mit PBS behandelte Kontrolle auf. Die Konzentration von 1 nM zeigte bei der Auswertung des Wundheilungsfortschrittes die beste Wundheilung. In der Literatur finden sich im Wesentlichen zwei Studien zur Wirkung von Östrogen auf ZO-1. Die Arbeitsgruppe von Zhou untersuchte in diesem Zusammenhang die Expression von ZO-1 und den Östrogenrezeptoren ER α und ER β im humanen Darm bei männlichen und weiblichen Spendern. Für ER β konnten sie keine Unterschiede detektieren. Für ER α und ZO-1 fanden sie jedoch bei Proben weiblicher Spender niedrigere Level als bei denen männlicher Spender. In vitro sank bei der Behandlung mit Östrogen sowohl die mRNA als auch die Proteinexpression von ZO-1 (Zhou et al. 2017). Die Arbeitsgruppe von Oh et al. dagegen untersuchte die Expression von ZO-1 im vaginalen Epithel von Ratten und fand heraus, dass die Expression nach Ovariectomie signifikant abnahm und sich durch Behandlung mit Östrogen wieder auf das Niveau der Kontrolle erhöhte (Oh et al. 2016). Eventuell ist die Beurteilung mittels Score hier nicht sensitiv genug, um die gleichen Ergebnisse wie eine Analyse auf

mRNA-Ebene zu liefern, eventuell sind jedoch auch einfach unterschiedliche Effekte in Darm, Vagina und Haut zu beobachten. Das gleiche gilt für die unterschiedlichen Tumorentitäten. Auch hier findet man unterschiedliche Veränderungen (Hoch/Runterregulation) der einzelnen Tight-Junction-Proteine in den jeweiligen Geweben (als Review (Martin 2014)). Dr. Volksdorf verglich im Rahmen seiner Dissertation die porcinen WHM zudem mit humanen Wunden und konnte bereits zu Beginn der Wundheilung deutliche Abweichungen ZO-1 betreffend feststellen. Diese führte er im Wesentlichen auf spezies-spezifische Regulationen und/ oder altersspezifische Prozesse zurück (Haut jugendlicher Schweine / älterer Menschen). Demzufolge schienen die WHM nicht geeignet, um seine Fragestellung zu beantworten. Die Auswirkungen von Östrogenen auf Veränderung der Tight-Junction-Proteine wurden bisher nicht in humaner Haut untersucht. Um das porcine Modell, speziell für Veränderungen ZO-1 betreffend, als Ersatz zu empfehlen/ verwenden, müssten die Auswirkungen auf humane Haut zunächst überprüft und verglichen werden.

Wundheilung

Ich konnte signifikante Unterschiede in der Wundheilung in Bezug auf die Schichtverteilung von ZO-1 zeigen. Wunden mit einer weniger breiten Expression von ZO-1 in UN und WR hatten im Schnitt eine bessere Heilung als solche, in denen die Expression breiter war. Dies ließe sich damit erklären, dass, wenn die Schichtverteilung weniger breit ist, die Verbindung zum Aktinzytoskelett in den unteren Schichten weniger ausgeprägt ist und die Zellen formbarer sein können (Van Itallie et al. 2009). Diese Ergebnisse sollten jedoch mit einer größeren n-Zahl noch einmal validiert werden (nur ein Messwert mit Score von 2, vergleiche Abbildung 64). Zusätzlich stellte sich auch hier die Frage, ob die Schichtverteilung geringer war weil die Wunde geschlossener war, oder ob die geringere Schichtverteilung einen zügigeren Schluss bewirkte. Das lineargemischte Modell wurde daher umgestellt und ich habe berechnet, inwieweit die Schichtverteilung von ZO-1 von der Länge der Wundzunge abhing. Da es auch hier Signifikanzen gab ($p=0,026$) ließ sich folgende Korrelation treffen: je kürzer die Wundzunge desto breiter die Schichtverteilung von ZO-1 an den beiden Messorten. Dr. Heilmann fand im Rahmen ihrer Arbeit heraus, dass Schichtverteilung von ZO-1 am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis mit dem Wundheilungszeitpunkt korreliert (ich habe nur die Auswertung zu einem Zeitpunkt, 48 Stunden nach Verwundung). Sie konnte von 6-48 Stunden eine stetige Zunahme der Verbreiterung beobachten. Sie beschrieb für ZO-1 jedoch auch eine größere interindividuelle Variabilität der Färbungen (Anfärbbarkeit im Stratum spinosum/ granulosum) und führte dies darauf

zurück, dass ZO-1 sensibler auf Kulturbedingungen zu reagieren scheint (Lentfer 2012). Diese ausgeprägte interindividuelle Variabilität konnte ich in meinen Auswertungen jeweils nur bei der Intensität der Färbungen feststellen. In der Arbeit von Dr. Volksdorf zeigte sich ebenfalls am Wundrand und in der regenerierenden Epidermis während der Wundheilung im WHM eine teils stark verbreiterte Lokalisation von ZO-1 (Volksdorf 2017).

Bei der Verteilung (ZZ/IZ) in der unbeteiligten Epidermis zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede in Bezug auf die Wundheilung. Die Modelle, in denen ZO-1 in der unbeteiligten Epidermis auch intrazellulär lokalisiert war, heilten besser als jene, in denen ZO-1 ausschließlich an den Zellgrenzen zu finden war (Abbildung 69). Auch hier wurde zum weiteren Beurteilung das Modell umgestellt und berechnet, inwieweit die Verteilung (ZZ/IZ) abhängig von der Länge der Wundheilung ist. Da auch dies signifikant war ($p=0,035$) ist wieder von einer Korrelation der Parameter zu sprechen. Man fand an diesem Messort jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Östrogenkonzentrationen und der Kontrolle mit PBS. Die gefundenen Unterschiede in der Wundheilung scheinen somit unabhängig vom Östrogen zu sein und würden eine Aussage für die Heilung an sich zulassen. Dazu würden die Ergebnisse von Balda und Matter (Balda und Matter 2009) passen, die eine Verbindung von weniger ZO-1 an den Tight Junctions (dafür im Intrazellularraum) und vermehrter Proliferation sehen. Dass Effekte in der unbeteiligten Epidermis zu sehen sind (wie auch zuvor bei der Schichtverteilung), spricht in diesem Fall dafür, dass hier in der Nähe zum Wundrand auch ein gewisser Einfluss entsteht und sie gegebenenfalls nicht gänzlich unbehandelt ist (z.B. vermehrte Proliferation, Wundkontraktion (Pierce et al. 1991, Vaughan et al. 2000))

5.4.4 Occludin

Intensität

Occludin ist ein Protein aus der Gruppe der TAMP's (Tight Junction associated Marvel Proteins) (Raleigh et al. 2010). Bei der Auswertung der Intensität von Occludin fanden sich signifikante Unterschiede beim Messort und der Konzentration. In den mit PBS behandelten Modellen war die unbeteiligte Epidermis und der Wundrand waren am intensivsten gefärbt, die Wundzunge und deren Spitze weniger. Durch die Behandlung mit Östrogen (alle Konzentrationen) zeigte sich eine intensivere Färbung der Messorte WR, WZ und SP. Die signifikanten Unterschiede waren zum Teil auch auf niedrigerem Niveau noch statistisch bedeutsam ($p < 0,001$ statt $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$ in der Kontrolle mit PBS). Betrachtete man die Konzentrationen und Messorte einzeln, so fanden sich nach Östrogenbehandlung signifikante Unterschiede für alle Konzentrationen zur Kontrolle mit PBS am Wundrand und an der Spitze der Wundzunge. In der Wundzunge selbst war nur die höchste Konzentration von $1 \mu\text{M}$ signifikant intensiver gefärbt als die Kontrolle mit PBS. Verglich man dann nur die Konzentrationen für alle Messorte zwischen den Modellen weiblicher und männlicher Schweine, so zeigten sich bei den männlichen Modellen die Ergebnisse, die auch im Gesamtkollektiv zu beobachten waren, bei den weiblichen Modellen ließen sich nur die Unterschiede in der Wundzunge von PBS und höchsten Konzentration Östrogen $1 \mu\text{M}$ als signifikant nachweisen. Mögliche kausale Erklärung für dieses Phänomen könnte eine bestehende „Gewöhnung“ der weiblichen Schweine auf höhere Östrogenkonzentrationen sein. Möglich wäre auch ein biphasischer Effekt (bei den Modellen männlicher Schweine am Wundrand und bei denen weiblicher Schweine in der Wundzunge zu beobachten) - erst Zunahme dann Abnahme der Intensität. Der Effekt scheint bei den Modellen weiblicher Schweine aufgrund ihrer endogen von vornherein höheren Konzentration früher, beziehungsweise in niedrigeren Konzentrationen aufzutreten. Cho et al. fanden heraus, dass die Behandlung mit Östrogen die selektive Permeabilität für Kationen in HUVEC (humane umbilicale vein endothelial cells) von Frauen erhöhte, sie konnten jedoch keinen Effekt auf den transendothelialen Widerstand nachweisen (Cho et al. 1998).

Die Arbeitsgruppe von Ye beschrieb, wie auch in meinen Ergebnissen, einen biphasischen Effekt bei der Behandlung von HUVEC. Dieser jedoch in entgegengesetzter Ausprägung. Dort zeigten sich gesenkte Occludinlevel und erhöhte Permeabilität bei Behandlung in höheren Östrogenkonzentrationen, bei niedrigen Konzentration fanden sich dagegen erhöhte Occludinlevel und verminderte Permeabilität (Ye et al. 2003). Hier konnte jedoch anders als zuvor bei Cho et al. ein Effekt auf den transendothelialen

Widerstand nachgewiesen werden: Durch die Behandlung mit Östrogen sank dieser. Die Effekte, die durch Östrogen vermittelt werden, hängen also anscheinend vom Gewebe und vom jeweils exprimierten Rezeptor ab. Bei Ye et al. wurden HUVEC genutzt, welche ER β aber kein ER α exprimierten. Studien an dermalen Fibroblasten zeigen dagegen die Expression von sowohl ER α als auch ER β . Viele der Effekte auf eine verbesserte Wundheilung sind ER α -vermittelt (Stevenson et al. 2008, Stevenson et al. 2009, Thornton 2013). Gonzalez-Mariscal et al. fanden heraus, dass die Expression von Occludin mit dem Anstieg des TER korreliert (Gonzalez-Mariscal et al. 2000). Bei einer Verletzung wäre so eine Kompensation der epithelialen Barriere aufgrund des Fehlens des Stratum corneum denkbar. Eine vermehrte Expression von Occludin (nicht von ZO-1) als Reaktion auf Östrogen konnte bereits im Ösophagus von Hasen (Honda et al. 2016), im Kolon von Ratten (Braniste et al. 2009) und an humanen epithelialen Cervixzellen gezeigt werden (Zeng et al. 2004). Die Arbeitsgruppe von Hernandez-Monge fand in der Epidermis von Mäusen den gegenteiligen Effekt (Hernandez-Monge et al. 2013). Östrogen scheint also in der Lage zu sein, die Expressionslevel von TJ-Proteinen und die Barriereeigenschaften, je nach Gewebetyp, sowohl zu fördern als auch zu vermindern. Mögliche Erklärungen hierfür könnten sowohl die verschiedenen Gewebe, verschiedenen Spezies, verschiedenen Techniken, unterschiedlichen Zeitpunkte der Auswertung und ggf. auch durch die unterschiedliche Verteilung der Rezeptortypen auf den Zielzellen sein.

Schicht

Occludin zeigte sich während der Wundheilung in der unbeteiligten Epidermis überwiegend im Stratum granulosum der Epidermis anfärbbar. In der Kontrolle mit PBS war die Schichtverteilung in der unbeteiligten Epidermis am breitesten und nahm zur Spitze der Wundzunge hin stetig ab. Durch die Behandlung mit Östrogen (alle Konzentrationen) zeigte sich die breiteste Schichtverteilung von Occludin meinen Auswertungen am Wundrand, zur unbeteiligten Epidermis und zur Spitze der Wundzunge abnehmend. Der Unterschied zwischen Wundzunge und Spitze der Wundzunge war auf niedrigerem Niveau signifikant ($p < 0,01$ statt $p < 0,05$ bei der Kontrolle mit PBS). Es zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Schichtverteilung durch die einzelnen Östrogenkonzentrationen (kleinere n-Zahl) oder das Geschlecht. Die Ergebnisse zur Schichtverteilung decken sich mit zuvor beobachtetem (Brandner et al. 2002, Malminen et al. 2003). Auch Dr. Heilmann stellte am Wundrand zum Teil eine deutliche Verbreiterung der Lokalisation von Occludin fest. Dies korrelierte jedoch weder mit dem Wundheilungsfortschritt noch mit der Zeit (Lentfer 2012). Dr. Volksdorf zeigte ebenfalls

eine Verbreiterung im Bereich hinter dem Wundrand und dem Wundrand selbst. Er stellte zudem Veränderungen in der regenerierenden Epidermis fest, in der während der gesamten Heilung mindestens ein Drittel der Proben eine verbreiterte Lokalisation von Occludin zeigten. Dies führte dazu, dass in Abschnitten die noch einschichtig waren, Occludin auch in den basalen Zellen exprimierten (Volksdorf 2017). Er untersuchte zudem chronische Wunden und stellte fest, dass Occludin dort häufig vollständig fehlte und dass ein Verlust von Occludin zu einer gestörten Differenzierung, Adhäsion und zum Verlust von Zellen führte (Rachow et al. 2013, Volksdorf 2017).

Verteilung

Betrachtete man die Verteilung (ZZ/IZ) von Occludin in der Kontrolle mit PBS, so fanden sich signifikante Unterschiede an den verschiedenen Messorten. In der unbeteiligten Epidermis war Occludin stark auf die Zell-Zell-Grenzen bezogen, je weiter man zur Spitze der Wundzunge kam, desto mehr fand es sich intrazellulär lokalisiert. Die Effekte zeigten sich auch bei den mit Östrogen behandelten Modellen, wesentliche Unterschiede fanden sich hier nicht. Zur Verteilung (ZZ/IZ) wurde veröffentlicht, dass zu viel Occludin an den Zell-Zell-Grenzen die Motilität der Epithelzellen hemmte und somit die Heilung verlangsamte. Die Verwundung einer Epithelschicht stellt laut Fletcher et al. einen Stimulus für die Endozytose von Occludin dar. Das Tight-Junction-Protein wird nach Verletzung über Clathrin-vermittelte-Endozytose in die Zellen aufgenommen (Fletcher et al. 2012).

Wundheilung

Bei der Verteilung (ZZ/IZ) der Occludin-Färbung zeigte sich, dass Modelle mit einem höheren intrazellulären Anteil in der Wundzunge besser heilten, als jene mit einem höheren Anteil an den Zell-Zell-Grenzen. Da es sich hier ausschließlich um einen Messzeitpunkt handelte, konnte nicht beantwortet werden, ob die Wunden aufgrund der vermehrt intrazellulären Lokalisation besser heilten oder ob das Protein von der Heilung abhängig weniger an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert war. Um dies zu beantworten wurde das linear-gemischte Modell umgestellt und berechnet, inwieweit die Verteilung von Occludin von der Länge der Wundzunge abhing. Hier zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang an der Wundzunge ($p=0,571$). Demzufolge ließ sich die Aussage treffen, dass die Wundheilung signifikant durch die Occludin-Verteilung in der Wundzunge beeinflusst wird. Safferling et al. zeigten in ihren Versuchen 2013, dass

Occludin an den Membranen eine wichtige Rolle während der Wundheilung und für die Migration von Keratinozyten spielt (Safferling et al. 2013).

Bei der Auswertung der Schicht-Scores war die Länge der Wundzunge bei Modellen mit einem niedrigen Schicht-Score (1 = angefärbt in den oberen Schichten) in der Wundzunge signifikant höher als bei jenen mit einem Wert von 2 (in allen Schichten angefärbt). Hier stellte sich ebenfalls die Frage, ob die Modelle besser heilten, weil Occludin weniger breit exprimiert war oder ob die Heilung beschleunigt und die Expression deshalb bereits wieder beschränkt war (vergleichbar zu Claudin 1 und 4; (Kirschner et al. 2012). Um dies zu beantworten, wurde das linear-gemischte Modell erneut umgestellt und berechnet, inwieweit die Schichtverteilung von Occludin von der Länge der Wundzunge abhing. Hier zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang an der Wundzunge ($p=0,281$). Demzufolge ließ sich die Aussage treffen, dass die Wundheilung signifikant durch die Schichtverteilung von Occludin in der Wundzunge beeinflusst wird. Chronische Wunden weisen beispielsweise häufig verminderte Expression von Occludin am Wundrand und fast immer ein Fehlen von Occludin in der regenerierenden Epidermis auf (Volksdorf 2017). In seiner Dissertation untersuchte Dr. Volksdorf unter anderem die Effekte, die ein Knock-Down der Tight-Junction-Proteine hervorruft. Beim Knock-Down von Occludin zeigte sich im Scratch-Assay teils eine verminderte Wundheilung gegenüber der Kontrolle. Deutlicher wurden die Ergebnisse unter mechanischer Belastung. Hier zeigte der Knock-Down eine deutlich schlechtere Heilung und verminderte Zell-Zell-Verbindungen (Rachow et al. 2013, Volksdorf 2017). Auch Safferling wies die Wichtigkeit von Occludin bei der Verbindung der Zellen an suprabasale Schichten nach (Safferling et al. 2013).

6 Zusammenfassung

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich die Heilung fördernden Effekte des Östrogens im ex-vivo Modell, die Wundranderrhaltung sowie deren Korrelation zum Wundheilungsfortschritt beurteilt. Hierbei habe ich insbesondere auf Unterschiede der verschiedenen Östrogen-Konzentrationen, das Geschlecht des Schweines und der Applikationsform (systemisch/ topisch) geachtet. Studien zur Hormonersatztherapie wiesen bereits auf einen positiven Effekt von Östrogen bei der Heilung von Wunden hin. Dieser positive Effekt konnte in einer vorhergegangenen Arbeit mit Hilfe eines Score-Systems belegt werden. Mittlerweile wurde die Technik verbessert, und die Wundheilung konnte in meiner Arbeit μm -genau vermessen werden, was zu einer verbesserten Objektivierung und statistischen Auswertung führte. Ich konnte bestätigen, dass die mit Östrogen behandelten Wundmodelle besser heilten als die Kontrolle mit PBS. Die Art der Applikation war dabei nicht entscheidend. Die Modelle männlicher Schweine heilten nach Östrogenapplikation insgesamt besser als die weiblicher Schweine. Die Höhe der Konzentration war dabei nicht relevant, es fand sich keine dosisabhängige Verbesserung des Heilungsfortschrittes. Die Ergebnisse zur Wundranderrhaltung zeigten, dass mit Östrogen behandelte Wunden eine tendenziell eher schlechtere Wundranderrhaltung aufwiesen. Es zeigte sich jedoch keine negative Auswirkung auf die Wundheilung, dies deutet darauf hin, dass die Wundranderrhaltung nicht als prognostischer Faktor geeignet ist, um den Heilungsfortschritt vorherzusagen. Insgesamt gesehen konnte ich die Ergebnisse der Arbeit von Dr. Klingelhöller geb. Krüger in Bezug auf die wundheilungsfördernde Wirkung des Östrogens mit der Methode der Wundvermessung bestätigen. Nach den Auswertungen scheinen die ex-vivo Wundmodelle männlicher Tiere als postmenopausales Modell verwendet werden zu können. Da sich bei der Art der Applikation keine wesentlichen Unterschiede ergaben, ist eine lokale Applikation aufgrund der leichteren Handhabung der systemischen vorzuziehen. Die zweite entscheidende Fragestellung dieser Arbeit war, ob die durch Östrogen beschleunigte Wundheilung zu einer veränderten Expression/ Lokalisation von Tight-Junction-Proteinen führt oder ob deren Veränderungen die beschleunigte Heilung bedingen.

Bezüglich der Intensität der immunhistochemischen Färbungen konnte ich in den Kontrollen mit PBS für Claudin 1, Claudin 4, ZO-1 und Occludin beobachten, dass sie vom Wundrand bis zur Wundspitze abnahm. Durch die Behandlung mit Östrogen war Claudin 1 am Wundrand, der Wundzunge und der Wundspitze tendenziell weniger intensiv angefärbt als in der Kontrolle mit PBS. Die Gabe von 1 nM Östrogen erniedrigte die Intensität von Claudin 1 an der Wundzunge signifikant. Bei Claudin 4 und Occludin

beobachtete ich dagegen eine Erhöhung der Intensität am Wundrand, der Wundzunge und der Wundspitze nach Behandlung mit Östrogen. Bei Claudin 4 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Intensität am Wundrand bei der Gabe von 1 μM Östrogen, die anderen Konzentrationen hatten tendenzielle, aber nicht signifikante Intensitätssteigerungen. Bei Occludin führte die Östrogenzugabe in verschiedenen Konzentrationen zu einer signifikanten Intensitätssteigerung am Wundrand, der Wundzunge und der Wundspitze. Die Intensität von ZO-1 wurde nicht signifikant beeinflusst.

Bei Betrachtung der Verteilung der Proteine in den einzelnen epidermalen Schichten konnte ich in den Kontrollen mit PBS für Claudin 1, Claudin 4, ZO-1 und Occludin beobachten, dass sie vom Wundrand bis zur Wundspitze hin eher abnahm, d.h. dass die Proteine in weniger Schichten zu finden waren. Bei Claudin 4 und Occludin war die Verteilung in mit Östrogen behandelten Wunden deutlich breiter als in der Kontrolle mit PBS. Claudin 1 war an der Wundspitze bei den mit Östrogen behandelten Modellen breiter verteilt als in der Kontrolle mit PBS (signifikant verschieden bei 1 nM und 100 nM). Für ZO-1 führte die Behandlung der einzelnen Östrogenkonzentrationen in der „unbeteiligten“ Epidermis und am Wundrand zu einer breiteren Verteilung, in der Wundzunge und an deren Spitze wurde die Verteilung mit zunehmender Konzentration tendenziell schmaler.

Bei der Auswertung der Verteilung der untersuchten Proteine innerhalb der Zellen (Zell-Zell-Grenzen/ intrazellulär) konnte ich feststellen, dass die Proteine in der „unbeteiligten“ Epidermis stark auf die Zell-Zell-Grenzen bezogen vorlagen. Vom Wundrand über die Wundzunge bis zu deren Spitze fanden sie sich zunehmend zytoplasmatisch lokalisiert. Durch die Behandlung mit Östrogen zeigte sich bei Claudin 4 und ZO-1 eine Verstärkung dieses Effektes. Bei Claudin 4 war dieser insbesondere an der Wundspitze messbar und bei der Konzentration 100 nM signifikant. Für ZO-1 ließ sich der Effekt am Wundrand, in der Wundzunge und an der Wundspitze beobachten. Die größte Verschiebung in den zytoplasmatischen Bereich wies dabei meist die Konzentration 1 nM auf, welche auch die beste Wundheilung zeigte.

Für die untersuchten Tight-Junction-Proteine Claudin 4 und Occludin konnte ich darüber hinaus zeigen, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede gab. Claudin 4 war bei Modellen weiblicher Schweine am Wundrand (Trend) und in der Wundzunge (signifikant) breiter über die Schichten verteilt als bei den männlichen. Es war bei den Modellen weiblicher Schweine zudem vor allem am Wundrand mehr an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert als bei den männlichen Modellen. Dies zeigte sich als Trend auch in der „unbeteiligten“ Epidermis und der Wundzunge, an der Wundspitze kehrte sich dies um. Bei Occludin zeigten sich Unterschiede bei der Intensität. Vergleich man die Ge-

schlechter, so zeigte sich in der „unbeteiligten“ Epidermis bei den Modellen weiblicher Schweine eine höhere Occludinintensität als bei den Modellen männlicher Schweine. An der Wundspitze gab es den Trend (nicht signifikant), dass die Modelle männlicher Schweine hier im Mittel intensiver gefärbt waren als die weiblichen. Bei Claudin 1 und ZO-1 konnte ich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede feststellen.

Bezüglich der Korrelation von Tight-Junctions-Proteinen und Wundheilung konnte ich zeigen, dass je fortgeschrittener die Heilung war, desto mehr lag Claudin 4 am Wundrand an den Zell-Zell-Grenzen vor (gegenseitige Korrelation). Für ZO-1 ließ sich feststellen, dass je kürzer die Wundzunge war, desto breiter verteilt lag ZO-1 in der „unbeteiligten“ Epidermis und am Wundrand vor (gegenseitige Korrelation). Darüber hinaus konnte für ZO-1 beobachtet werden, dass je mehr intrazelluläre Lokalisation in der „unbeteiligten“ Epidermis vorlag, umso länger war die Wundzunge (gegenseitige Korrelation). Da es sich um gegenseitige Korrelationen handelte, konnte im hier gegebenen Versuchsaufbau nicht bestimmt werden, ob die durch Östrogen veränderte Wundheilung die Verteilung der Proteine beeinflusst oder umgekehrt. Bei Occludin ließ sich feststellen, dass Wunden, bei denen Occludin in der Wundzunge in den oberen Schichten lokalisiert war, besser heilten als Wunden mit Occludin in allen Schichten (einseitige Signifikanz). Zudem konnte ich feststellen, dass Modelle mit einem höheren intrazellulären Anteil von Occludin in der Wundzunge besser heilten, als jene mit einem höheren Anteil an den Zell-Zell-Grenzen (einseitige Signifikanz). Demzufolge ließ sich die Aussage treffen, dass die Wundheilung signifikant durch die Occludin-Verteilung in der Wundzunge beeinflusst wird.

In der Literatur finden sich vielfältige Effekte, die Östrogen auf die Wundheilung hat. Ich konnte mit meiner Arbeit und den vorliegenden Ergebnissen zeigen, dass Östrogen Veränderungen auf Ebene der Tight Junctions (Intensität, Schichtverteilung sowie Verteilung innerhalb der Zelle) hervorruft sowie Korrelationen und Einfluss auf die Wundheilung zeigen. Ich konnte nicht die „eine“ Veränderung detektieren, die die Heilung exponentiell verbesserte. Es scheint eher die Summe der detektierten Veränderungen zu sein, die die Wundheilung positiv beeinflussen. Der genaue Mechanismus und die Signalwege, über die Östrogen die Regulation der Tight-Junction-Moleküle in der kutanen Wundheilung beeinflusst, sollten in Zukunft näher untersucht werden.

7 Summary

In my thesis I evaluated the healing effects of estrogen in the ex-vivo model, wound preservation and their correlation to wound healing progress. I paid particular attention to differences in the various estrogen concentrations, the sex of the pig and the form of administration (systemic / topical). Hormone replacement therapy studies have already shown a positive effect of estrogen in healing wounds. This positive effect could be proven in a previous work with the help of a score system. In the meantime, the technique has been improved, and wound healing in my work has been measured with micrometer precision, resulting in improved objectification and statistical evaluation. I was able to confirm that estrogen-treated wound models healed better than control with PBS. The type of application was not decisive. The models of male pigs generally recovered better than the female pigs after estrogen administration. The level of concentration was not relevant. There was no dose-dependent improvement in the healing progress. Results on wound preservation showed that estrogen-treated wounds tended to have poorer wound edge retention. However, there was no adverse effect on wound healing indicating that wound preservation is not a prognostic factor for predicting healing progress. Overall, I was able to see the results of Dr. Klingelhöller geb. Krüger with regard to the wound healing promoting effect of the estrogen with the method of wound measurement confirm. According to the evaluations, the ex-vivo wound models of male animals seem to be used as a postmenopausal model. Since there were no significant differences in the nature of the application, a local application is preferable because of the easier handling compared to the systemic. The second crucial question of this work was whether the estrogen accelerated wound healing leads to an altered expression / localization of tight junction proteins or whether their changes cause the accelerated healing.

Regarding the intensity of the immunohistochemical staining, I was able to observe in the controls with PBS for Claudin 1, Claudin 4, ZO-1 and Occludin that it decreased from the edge of the wound to the tip of the wound tongue. By treatment with estrogen the staining of Claudin 1 tended to be less intensively at the edge of the wound, the wound tongue and the wound tip, compared to the control with PBS. The administration of 1 nM estrogen significantly reduced the intensity of Claudin 1 in the wound tongue. In the case of Claudin 4 and Occludin, on the other hand, I observed an increase in the intensity of the wound edge, the wound tongue and the wound tip after treatment with estrogen. In the case of Claudin 4, there was a significant increase in the intensity at the edge of the wound when 1 μ M estrogen was administered. The other concentra-

tions had tendencies, but not significant increases in intensity. For Occludin, estrogen addition at various concentrations led to a significant increase in intensity at the wound edge, the wound tongue and the wound tip. The intensity of ZO-1 was not significantly affected.

Looking at the distribution of proteins in the individual epidermal layers, I was able to observe in the controls with PBS for Claudin 1, Claudin 4, ZO-1 and Occludin that distribution was decreasing from the edge of the wound to the peak of the wound. That means the proteins were found in fewer layers. In the case of Claudin 4 and Occludin, the distribution was significantly wider in estrogen-treated wounds than in the control with PBS. Claudin 1 was more widely distributed at the wound tip in the estrogen-treated models than in the control with PBS (significantly different at 1 nM and 100 nM). For ZO-1, the treatment of the individual estrogen concentrations in the "uninvolved" epidermis and the wound edge led to a broader distribution. In the wound tongue and at the tip, the distribution tended to become narrower with increasing concentration.

In evaluating the distribution of the proteins within the cells (cell-cell boundaries / intracellular), I found that the proteins in the "uninvolved" epidermis were strongly related to the cell-cell boundaries. From the edge of the wound over the wound tongue to its tip, they were increasingly localized cytoplasmic. The treatment with estrogen showed an amplification of this effect in Claudin 4 and ZO-1. In the case of Claudin 4 this was measurable especially at the wound tip and significant at the concentration of 100 nM. For ZO-1, the effect was observed at the wound edge, in the wound tongue and at the wound tip. The largest shift in the cytoplasmic area usually showed the concentration of 1 nM, which also showed the best wound healing.

Furthermore, for the tight-junction-proteins Claudin 4 and Occludin I could show that there were gender-specific differences. Claudin 4 was more broadly distributed over the layers of female pigs at the edge of the wound (trend) and in the wound tongue than in the male ones. It was more localized at the cell-cell boundaries in the models of female pigs, especially at the wound edge, than in the male models. This was a trend also in the "uninvolved" epidermis and the wound tongue, at the wound tip this turned around. Occludin showed differences in intensity. Compared with the sexes, the "uninvolved" epidermis showed a higher Occludin intensity in the models of female pigs than in the models of male pigs. At the wound tip, there was a trend (not significant) for the male pigs to be more intensely colored than the females. In Claudin 1 and ZO-1 I could not find any gender differences.

Regarding the correlation of tight-junction-proteins and wound healing, I could show that the more advanced the healing, the more Claudin 4 was present at the edge of the wound at the cell-cell boundaries (mutual correlation). For ZO-1 it could be stated that the shorter the wound tongue, the more widely distributed ZO-1 was in the "uninvolved" epidermis and at the edge of the wound (mutual correlation). In addition, it could be observed for ZO-1 that the more intracellular localization was present in the "uninvolved" epidermis, the longer the wound tongue (mutual correlation). Since these correlations were mutual, it could not be determined in the experimental setup given here whether the estrogen-modified wound healing influenced the distribution of the proteins or vice versa. In case of Occludin could be shown that wounds with Occludin in the upper layer of the wound were better cured than Occludin in all layers (unilateral significance). In addition, I found that models with a higher intracellular fraction of Occludin in the wound tongue healed better than those with a higher proportion of cell-cell boundaries (unilateral significance). Consequently, it could be said that wound healing is significantly influenced by the distribution of Occludin in the wound tongue.

There are a variety of effects that estrogen has on wound healing in the literature. With my work and the results available, I have been able to show that estrogen causes changes at the level of tight junctions (intensity, layer distribution and distribution within the cell) and shows correlations and effects on wound healing. I could not detect the "one" change that improved healing exponentially. It rather seems to be the sum of the detected changes that positively influence wound healing. The exact mechanism and signaling pathways through which estrogen affects the regulation of tight-junction-molecules in cutaneous wound healing should be further investigated in the future.

8 Literaturverzeichnis

Aberdeen GW, Wiegand SJ, Bonagura TW, Jr., Pepe GJ, Albrecht ED (2008) Vascular endothelial growth factor mediates the estrogen-induced breakdown of tight junctions between and increase in proliferation of microvessel endothelial cells in the baboon endometrium. *Endocrinology*. 149(12):6076-6083.

Ahn C, Yang H, Lee D, An BS, Jeung EB (2015) Placental claudin expression and its regulation by endogenous sex steroid hormones. *Steroids*. 100:44-51.

Aijaz S, Balda MS, Matter K (2006) Tight Junctions: Molecular Architecture and Function. In: *International Review of Cytology*. (Hrg.) Academic Press, 261-298.

Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci*. 115(Pt 24):4969-4976.

Anderson JM, Fanning AS, Lapierre L, Van Itallie CM (1995) Zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: membrane-associated guanylate kinase homologues (MAGuKs) of the tight junction. *Biochem Soc Trans*. 23(3):470-475.

Anwar A, McTernan PG, Anderson LA, Askaa J, Moody CG, Barnett AH, Eggo MC, Kumar S (2001) Site-specific regulation of oestrogen receptor-alpha and -beta by oestradiol in human adipose tissue. *Diabetes Obes Metab*. 3(5):338-349.

Ärzteblatt D. 10. Mai 2016. Versorgung von Wunderkrankungen kostet acht Milliarden Euro. In *Ärzteblatt*, pp. www.aerzteblatt.de

Ashcroft GS, Dodsworth J, van Boxtel E, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MW (1997) Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nat Med*. 3(11):1209-1215.

Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW (1999) Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol*. 155(4):1137-1146.

Ashcroft GS, Mills SJ (2002) Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *J Clin Invest*. 110(5):615-624.

Ashcroft GS, Mills SJ, Lei K, Gibbons L, Jeong MJ, Taniguchi M, Burow M, Horan MA, Wahl SM, Nakayama T (2003) Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest*. 111(9):1309-1318.

Balda MS, Matter K (2000) The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J.* 19(9):2024-2033.

Balda MS, Matter K (2009) Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 1788(4):761-767.

Basler K, Brandner JM (2017) Tight junctions in skin inflammation. *Pflugers Arch.* 469(1):3-14.

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

Bäsler K, Galliano MF, Bergmann S, Rohde H, Wladykowski E, Vidal YSS, Guiraud B, Houdek P, Schuring G, Volksdorf T, Caruana A, Bessou-Touya S, Schneider SW, Duplan H, Brandner JM (2017) Biphasic influence of *Staphylococcus aureus* on human epidermal tight junctions. *Ann N Y Acad Sci.* 1405(1):53-70.

Batista DI, Perez L, Orfali RL, Zaniboni MC, Samorano LP, Pereira NV, Sotto MN, Ishizaki AS, Oliveira LM, Sato MN, Aoki V (2015) Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 29(6):1091-1095.

Baum CL, Arpey CJ (2005) Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg.* 31(6):674-686; discussion 686.

Bazzoni G (2003) The JAM family of junctional adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology.* 15(5):525-530.

Bebo BF, Jr., Fyfe-Johnson A, Adlard K, Beam AG, Vandenbark AA, Offner H (2001) Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J Immunol.* 166(3):2080-2089.

Berger L, El-Alfy M, Martel C, Labrie F (2010) Effect of long-term topical application of dehydroepiandrosterone (DHEA) and oral estrogens on morphology, cell proliferation, procollagen A1 and androgen receptor levels in rat skin. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2(2):267-275.

Björnstrom L, Sjöberg M (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 19(4):833-842.

Bönisch G, Hahn, Lutz, A. Bob, K. Bob. 2001. *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie:* Georg Thieme Verlag

Brandner J.M., Houdek P., Quitschau T., Siemann-Harms U., Ohnemus U., Willhardt I., I. M (2006) An Ex-vivo model to evaluate dressings & drugs for wound healing.

Example: Influence of *Lucilia sericata* extracts on wound healing progress. EWMA Journal. 6:11-15.

Brandner JM, Kief S, Grund C, Rendl M, Houdek P, Kuhn C, Tschachler E, Franke WW, Moll I (2002) Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol.* 81(5):253-263.

Brandner JM, Kief S, Wladykowski E, Houdek P, Moll I (2006) Tight junction proteins in the skin. *Skin Pharmacol Physiol.* 19(2):71-77.

Brandner JM, Zorn-Kruppa M, Yoshida T, Moll I, Beck LA, De Benedetto A (2015) Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers.* 3(1-2):e974451.

Braniste V, Leveque M, Buisson-Brenac C, Bueno L, Fioramonti J, Houdeau E (2009) Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor beta-mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. *J Physiol.* 587(Pt 13):3317-3328.

Brincat M, Moniz CF, Studd JW, Darby AJ, Magos A, Cooper D (1983) Sex hormones and skin collagen content in postmenopausal women. *Br Med J (Clin Res Ed).* 287(6402):1337-1338.

Brincat MP, Baron YM, Galea R (2005) Estrogens and the skin. *Climacteric.* 8(2):110-123.

Brouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF (2001) Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor- α but not estrogen receptor- β . *Circulation.* 103(3):423-428.

Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE (2006) The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 117(7 Suppl):12S-34S.

Brown JB, McDowell F (1942) Massive Repairs of Burns with Thick Split-Skin Grafts: Emergency "Dressings" with Homografts. *Ann Surg.* 115(4):658-674.

Burek M, Arias-Loza PA, Roewer N, Forster CY (2010) Claudin-5 as a novel estrogen target in vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(2):298-304.

Campbell L, Emerson E, Davies F, Gilliver SC, Krust A, Chambon P, Ashcroft GS, Hardman MJ (2010) Estrogen promotes cutaneous wound healing via estrogen receptor beta independent of its antiinflammatory activities. *J Exp Med.* 207(9):1825-1833.

Chen L, Dyson M, Rymer J, Bolton PA, Young SR (2001) The use of high-frequency diagnostic ultrasound to investigate the effect of hormone replacement therapy on skin thickness. *Skin Res Technol.* 7(2):95-97.

Cho MM, Ziats NP, Abdul-Karim FW, Pal D, Goldfarb J, Utian WH, Gorodeski GI (1998) Effects of estrogen on tight junctional resistance in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Soc Gynecol Investig.* 5(5):260-270.

Cuevas ME, Gaska JM, Gist AC, King JM, Sheller RA, Todd MC (2015) Estrogen-dependent expression and subcellular localization of the tight junction protein claudin-4 in HEC-1A endometrial cancer cells. *Int J Oncol.* 47(2):650-656.

Cunningham M, Gilkeson G (2011) Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 40(1):66-73.

Cuzzocrea S, Santagati S, Sautebin L, Mazzon E, Calabro G, Serraino I, Caputi AP, Maggi A (2000) 17beta-estradiol antiinflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy. *Endocrinology.* 141(4):1455-1463.

De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo RL, Novak N, Weidinger S, Beaty TH, Leung DY, Barnes KC, Beck LA (2011) Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 127(3):773-786 e771-777.

Delpy L, Douin-Echinard V, Garidou L, Bruand C, Saoudi A, Guery JC (2005) Estrogen enhances susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis by promoting type 1-polarized immune responses. *J Immunol.* 175(8):5050-5057.

Drummond AE, Fuller PJ (2010) The importance of ERbeta signalling in the ovary. *J Endocrinol.* 205(1):15-23.

Duden. 2016. www.duden.de.

Dunn LB, Damesyn M, Moore AA, Reuben DB, Greendale GA (1997) Does estrogen prevent skin aging? Results from the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I). *Arch Dermatol.* 133(3):339-342.

Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D (2004) Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci.* 117(Pt 1):19-29.

Farkas AE, Capaldo CT, Nusrat A (2012) Regulation of epithelial proliferation by tight junction proteins. *Ann N Y Acad Sci.* 1258:115-124.

Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P (2007) Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*. 148(7):3236-3245.

Filardo EJ, Thomas P (2005) GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab*. 16(8):362-367.

Fletcher SJ, Poulter NS, Haining EJ, Rappoport JZ (2012) Clathrin-mediated endocytosis regulates occludin, and not focal adhesion, distribution during epithelial wound healing. *Biol Cell*. 104(4):238-256.

Forster C, Makela S, Warri A, Kietz S, Becker D, Hultenby K, Warner M, Gustafsson JA (2002) Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(24):15578-15583.

Fritsch P (1983) [Use of systemic retinoids in dermatology]. *Wien Klin Wochenschr*. 95(23):817-822.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 123(6 Pt 2):1777-1788.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, 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(7):1539-1550.

Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol*. 153(2):263-272.

Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*. 156(6):1099-1111.

Furuse M, Izumi Y, Oda Y, Higashi T, Iwamoto N (2014) Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers*. 2:e28960.

Gabbiani G, Majno G (1972) Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol*. 66(1):131-146.

Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Imhof BA (2014) Tight junction dynamics: the role of junctional adhesion molecules (JAMs). *Cell Tissue Res*. 355(3):701-715.

- Gilliver SC, Ashcroft GS (2007) Sex steroids and cutaneous wound healing: the contrasting influences of estrogens and androgens. *Climacteric*. 10(4):276-288.
- Gilliver SC, Ashworth JJ, Ashcroft GS (2007) The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clin Dermatol*. 25(1):56-62.
- Godbout JP, Glaser R (2006) Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *J Neuroimmune Pharmacol*. 1(4):421-427.
- Goldman R (2004) Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care*. 17(1):24-35.
- Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, Valencia L, Muriel P, Ponce L, Reyes JL (2000) Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int*. 57(6):2386-2402.
- Gorodeski GI (2007) Estrogen decrease in tight junctional resistance involves matrix-metalloproteinase-7-mediated remodeling of occludin. *Endocrinology*. 148(1):218-231.
- Gosain A, DiPietro LA (2004) Aging and wound healing. *World J Surg*. 28(3):321-326.
- Grosman N, Hvidberg E, Schou J (1971) The effect of oestrogenic treatment on the acid mucopolysaccharide pattern in skin of mice. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 30(5):458-464.
- Gruber R, Bornchen C, Rose K, Daubmann A, Volksdorf T, Wladykowski E, Vidal YSS, Peters EM, Danso M, Bouwstra JA, Hennies HC, Moll I, Schmuth M, Brandner JM (2015) Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis. *Am J Pathol*. 185(10):2777-2789.
- Guo S, DiPietro LA (2010) Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 89(3):219-229.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008) Wound repair and regeneration. *Nature*. 453(7193):314-321.
- Gustafsson JA (1999) Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol*. 163(3):379-383.
- Haapasaari KM, Raudaskoski T, Kallioinen M, Suvanto-Luukkonen E, Kauppila A, Laara E, Risteli J, Oikarinen A (1997) Systemic therapy with estrogen or estrogen with progestin has no effect on skin collagen in postmenopausal women. *Maturitas*. 27(2):153-162.
- Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, De Prost Y, Munnich A, Hadchouel M, Smahi A (2004) Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing

cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology*. 127(5):1386-1390.

Hahn-Strömberg V, Askari S, Ahmad A, Befekadu R, Nilsson TK (2017) Expression of claudin 1, claudin 4, and claudin 7 in colorectal cancer and its relation with CLDN DNA methylation patterns. *Tumour Biol*. 39(4):1010428317697569.

Hall G, Phillips TJ (2005) Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol*. 53(4):555-568; quiz 569-572.

Hardman MJ, Waite A, Zeef L, Burow M, Nakayama T, Ashcroft GS (2005) Macrophage migration inhibitory factor: a central regulator of wound healing. *Am J Pathol*. 167(6):1561-1574.

Hardman MJ, Ashcroft GS (2008) Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome Biol*. 9(5):R80.

Hata M, Yamanegi K, Yamada N, Ohyama H, Yukitatsu Y, Nakasho K, Okamura H, Terada N (2014) Estrogen decreases the expression of claudin-5 in vascular endothelial cells in the murine uterus. *Endocr J*. 61(7):705-715.

Herard AL, Zahm JM, Pierrot D, Hinnrasky J, Fuchey C, Puchelle E (1996) Epithelial barrier integrity during in vitro wound repair of the airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 15(5):624-632.

Hernandez-Monge J, Garay E, Raya-Sandino A, Vargas-Sierra O, Diaz-Chavez J, Popoca-Cuaya M, Lambert PF, Gonzalez-Mariscal L, Gariglio P (2013) Papillomavirus E6 oncoprotein up-regulates occludin and ZO-2 expression in ovariectomized mice epidermis. *Exp Cell Res*. 319(17):2588-2603.

Hirashima T, Hosokawa Y, Iino T, Nagayama M (2013) On fundamental cellular processes for emergence of collective epithelial movement. *Biol Open*. 2(7):660-666.

Honda J, Iijima K, Asanuma K, Ara N, Shiroki T, Kondo Y, Hatta W, Uno K, Asano N, Koike T, Shimosegawa T (2016) Estrogen Enhances Esophageal Barrier Function by Potentiating Occludin Expression. *Dig Dis Sci*. 61(4):1028-1038.

Hoover KB, Liao SY, Bryant PJ (1998) Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol*. 153(6):1767-1773.

Huang C, Liao R, Wang F, 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(6):783-790.

Hung CF, Fang CL, Al-Suwayeh SA, Yang SY, Fang JY (2012) Evaluation of drug and sunscreen permeation via skin irradiated with UVA and UVB: comparisons of normal skin and chronologically aged skin. *J Dermatol Sci.* 68(3):135-148.

Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 171(6):939-945.

Islas S, Vega J, Ponce L, Gonzalez-Mariscal L (2002) Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res.* 274(1):138-148.

Jaramillo BE, Ponce A, Moreno J, Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Gonzalez-Mariscal L (2004) Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Exp Cell Res.* 297(1):247-258.

Jensen EV, Desombre ER, Hurst DJ, Kawashima T, Jungblut PW (1967) Estrogen-receptor interactions in target tissues. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 56(3):547-569.

Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA (2015) Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 29(4):557-568.

Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS (1999) Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med.* 5(12):1418-1423.

Josefsson E, Tarkowski A, Carlsten H (1992) Anti-inflammatory properties of estrogen. I. In vivo suppression of leukocyte production in bone marrow and redistribution of peripheral blood neutrophils. *Cell Immunol.* 142(1):67-78.

Joshi R (2014) Learning from eponyms: George F. Odland and Odland bodies. *Indian Dermatol Online J.* 5(3):334-338.

Kanda N, Watanabe S (2003) 17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *J Invest Dermatol.* 121(6):1500-1509.

Kanda N, Watanabe S (2004) 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. *J Invest Dermatol.* 123(2):319-328.

Keon BH, Schafer S, Kuhn C, Grund C, Franke WW (1996) Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol.* 134(4):1003-1018.

Kirschner N, Poetzl C, von den Driesch P, Wladykowski E, Moll I, Behne MJ, Brandner JM (2009) Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol.* 175(3):1095-1106.

Kirschner N, Houdek P, Fromm M, Moll I, Brandner JM (2010) Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol.* 89(11):839-842.

Kirschner N, Brandner JM (2012) Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci.* 1257:158-166.

Kirschner N, Rosenthal R, Gunzel D, Moll I, Brandner JM (2012) Tight junctions and differentiation--a chicken or the egg question? *Exp Dermatol.* 21(3):171-175.

Kirschner N, Rosenthal R, Furuse M, Moll I, Fromm M, Brandner JM (2013) Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 133(5):1161-1169.

Krämer F, White K, Kubbies M, Swisshelm K, Weber BH (2000) Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum Genet.* 107(3):249-256.

Krawczyk WS (1971) A pattern of epidermal cell migration during wound healing. *J Cell Biol.* 49(2):247-263.

Kreft ME, Sterle M, Jezernik K (2006) Distribution of junction- and differentiation-related proteins in urothelial cells at the leading edge of primary explant outgrowths. *Histochem Cell Biol.* 125(5):475-485.

Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Gunzel D, Westphal JK, Huber O, Schulzke JD, Fromm M (2009) Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell.* 20(16):3713-3724.

Krüger C. 2014. Der Einfluss von Östrogen auf die Wundheilung im porcinen System. <http://ediss.sub.uni-hamburg.de>

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(12):5925-5930.

Lambert KC, Curran EM, Judy BM, Lubahn DB, Estes DM (2004) Estrogen receptor-alpha deficiency promotes increased TNF-alpha secretion and bacterial killing by murine macrophages in response to microbial stimuli in vitro. *J Leukoc Biol.* 75(6):1166-1172.

Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, Jirstrom K, Landberg G, Martin F, Duffy MJ, Gallagher WM (2009) Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer*. 124(9):2088-2097.

Lee SH, Paek AR, Yoon K, Kim SH, Lee SY, You HJ (2015) Tight junction protein 1 is regulated by transforming growth factor-beta and contributes to cell motility in NSCLC cells. *BMB Rep*. 48(2):115-120.

Lentfer J. 2012. Regulation von Tight Junction Proteinen in der kutanen Wundheilung.

Liang GH, Weber CR (2014) Molecular aspects of tight junction barrier function. *Curr Opin Pharmacol*. 19:84-89.

Liu F, Koval M, Ranganathan S, Fanayan S, Hancock WS, Lundberg EK, Beavis RC, Lane L, Duek P, McQuade L, Kelleher NL, Baker MS (2016) Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family. *J Proteome Res*. 15(2):339-359.

Liu JQ, Zhao KB, Feng ZH, Qi FZ (2015) Hair follicle units promote re-epithelialization in chronic cutaneous wounds: A clinical case series study. *Exp Ther Med*. 10(1):25-30.

Loewenstein WR, Penn RD (1967) Intercellular communication and tissue growth. II. Tissue regeneration. *J Cell Biol*. 33(2):235-242.

Löffler P, Heinrich. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie*: Springer

Looijer-van Langen M, Hotte N, Dieleman LA, Albert E, Mulder C, Madsen KL (2011) Estrogen receptor-beta signaling modulates epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 300(4):G621-626.

Lüllmann-Rauch R. 2015. *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag

Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN (1989) Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest*. 84(2):640-646.

Malminen M, Koivukangas V, Peltonen J, Karvonen SL, Oikarinen A, Peltonen S (2003) Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis. *Br J Dermatol*. 149(2):255-260.

Maret A, Coudert JD, Garidou L, Foucras G, Gourdy P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F, Guery JC (2003) Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol*. 33(2):512-521.

- Margolis DJ, Knauss J, Bilker W (2002) Hormone replacement therapy and prevention of pressure ulcers and venous leg ulcers. *Lancet*. 359(9307):675-677.
- Martin P (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 276(5309):75-81.
- Martin TA (2014) The role of tight junctions in cancer metastasis. *Semin Cell Dev Biol*. 36:224-231.
- Mason RG, Saba HI (1978) Normal and abnormal hemostasis--an integrated view. A review. *Am J Pathol*. 92(3):775-812.
- McCartney MD, Cantu-Crouch D (1992) Rabbit corneal epithelial wound repair: tight junction reformation. *Curr Eye Res*. 11(1):15-24.
- Meyer MR, Clegg DJ, Prossnitz ER, Barton M (2011) Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors. *Acta Physiol (Oxf)*. 203(1):259-269.
- Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279(2):G250-254.
- Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW (1995) Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation*. 91(3):755-763.
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(2):511-516.
- Morita K, Tsukita S, 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(2):328-334.
- Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ (1997) Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 29(1):5-17.
- Nelson LR, Bulun SE (2001) Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*. 45(3 Suppl):S116-124.
- Niessen CM (2007) Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*. 127(11):2525-2532.

Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 81(4):1535-1565.

Nunan R, Campbell J, Mori R, Pitulescu ME, Jiang WG, Harding KG, Adams RH, Nobes CD, Martin P (2015) Ephrin-Bs Drive Junctional Downregulation and Actin Stress Fiber Disassembly to Enable Wound Re-epithelialization. *Cell Rep.* 13(7):1380-1395.

Ogawa S, Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M (1998) Cross-inhibition of both estrogen receptor alpha and beta pathways by each dominant negative mutant. *FEBS Lett.* 423(2):129-132.

Oh KJ, Lee HS, Ahn K, Park K (2016) Estrogen Modulates Expression of Tight Junction Proteins in Rat Vagina. *Biomed Res Int.* 2016:4394702.

Ohnemus U, Kohrmeyer K, Houdek P, Rohde H, Wladykowski E, Vidal S, Horstkotte MA, Aepfelbacher M, Kirschner N, Behne MJ, Moll I, Brandner JM (2008) Regulation of Epidermal Tight-Junctions (TJ) during Infection with Exfoliative Toxin-Negative Staphylococcus Strains. *Journal of Investigative Dermatology.* 128(4):906-916.

Olde B, Leeb-Lundberg LM (2009) GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends Endocrinol Metab.* 20(8):409-416.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science.* 277(5331):1508-1510.

Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, Patel SB, Khalid L, Isseroff RR, Tomic-Canic M (2014) Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 3(7):445-464.

Pierard-Franchimont C, Letawe C, Goffin V, Pierard GE (1995) Skin water-holding capacity and transdermal estrogen therapy for menopause: a pilot study. *Maturitas.* 22(2):151-154.

Pierce GF, Vande Berg J, Rudolph R, Tarpley J, Mustoe TA (1991) Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds. *Am J Pathol.* 138(3):629-646.

Plackett TP, Gregory MS, Kovacs EJ (2015) Effects of High Estrogen Levels on Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 4(2):92-99.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM (2008) The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 17(12):1063-1072.

Prossnitz ER, Maggiolini M (2009) Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol.* 308(1-2):32-38.

Pummi K, Malminen M, Aho H, Karvonen SL, Peltonen J, Peltonen S (2001) Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 117(5):1050-1058.

Pummi KP, Heape AM, Grenman RA, Peltonen JT, Peltonen SA (2004) Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium. *J Histochem Cytochem.* 52(8):1037-1046.

Rachow S, Zorn-Kruppa M, Ohnemus U, Kirschner N, Vidal-y-Sy S, von den Driesch P, Bornchen C, Eberle J, Mildner M, Vettorazzi E, Rosenthal R, Moll I, Brandner JM (2013) Occludin is involved in adhesion, apoptosis, differentiation and Ca²⁺-homeostasis of human keratinocytes: implications for tumorigenesis. *PLoS One.* 8(2):e55116.

Radice GP (1980) The spreading of epithelial cells during wound closure in *Xenopus* larvae. *Dev Biol.* 76(1):26-46.

Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, Long M, Turner JR (2010) Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell.* 21(7):1200-1213.

Safferling K, Sutterlin T, Westphal K, Ernst C, Breuhahn K, James M, Jager D, Halama N, Grabe N (2013) Wound healing revised: a novel reepithelialization mechanism revealed by in vitro and in silico models. *J Cell Biol.* 203(4):691-709.

Shi H, Seeley RJ, Clegg DJ (2009) Sexual differences in the control of energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol.* 30(3):396-404.

Shin JA, Yoon JC, Kim M, Park EM (2016) Activation of classical estrogen receptor subtypes reduces tight junction disruption of brain endothelial cells under ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 92:78-89.

Simpson ER (2003) Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 86(3-5):225-230.

Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (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(3):755-766.

Stevenson S, Taylor AH, Meskiri A, Sharpe DT, Thornton MJ (2008) Differing responses of human follicular and nonfollicular scalp cells in an in vitro wound healing assay: effects of estrogen on vascular endothelial growth factor secretion. *Wound Repair Regen.* 16(2):243-253.

Stevenson S, Sharpe DT, Thornton MJ (2009) Effects of oestrogen agonists on human dermal fibroblasts in an in vitro wounding assay. *Exp Dermatol.* 18(11):988-990.

Straub RH (2007) The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 28(5):521-574.

Sugawara T, Iwamoto N, Akashi M, Kojima T, Hisatsune J, Sugai M, 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(1):12-18.

Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P (2001) The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen.* 9(2):66-76.

Süren D, Yildirim M, Kaya V, Alikanoglu AS, Bulbuller N, Yildiz M, Sezer C (2014) Loss of tight junction proteins (Claudin 1, 4, and 7) correlates with aggressive behavior in colorectal carcinoma. *Med Sci Monit.* 20:1255-1262.

Takao T, Kumagai C, Hisakawa N, Matsumoto R, Hashimoto K (2005) Effect of 17beta-estradiol on tumor necrosis factor-alpha-induced cytotoxicity in the human peripheral T lymphocytes. *J Endocrinol.* 184(1):191-197.

Tandara AA, Mustoe TA (2004) Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World J Surg.* 28(3):294-300.

Thorlakson HH, Schreurs O, Schenck K, Blix IJ (2016) Lysophosphatidic acid regulates adhesion molecules and enhances migration of human oral keratinocytes. *Eur J Oral Sci.* 124(2):164-171.

Thornton MJ (2013) Estrogens and aging skin. *Dermatoendocrinol.* 5(2):264-270.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(4):285-293.

Van Itallie CM, Anderson JM (2004) The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc Am Thorac Soc.* 1(1):38-41.

Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, Anderson JM (2009) ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 20(17):3930-3940.

Van Itallie CM, Anderson JM (2014) Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol.* 36:157-165.

Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ (2000) Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res.* 257(1):180-189.

Velnar T, Bailey T, Smrkolj V (2009) The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 37(5):1528-1542.

Verdier-Sevrain S, Yaar M, Cantatore J, Traish A, Gilchrist BA (2004) Estradiol induces proliferation of keratinocytes via a receptor mediated mechanism. *FASEB J.* 18(11):1252-1254.

Volksdorf T. 2017. Die Rolle der Tight-Junction-Proteine Claudin-1, Occludin und ZO-1 in nativer und gestörter epidermaler Wundheilung. <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2017/8550/pdf/Dissertation.pdf>

Volksdorf T, Heilmann J, Eming SA, Schawjinski K, Zorn-Kruppa M, Ueck C, Vidal YSS, Windhorst S, Jucker M, Moll I, Brandner JM (2017) Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Are Important for Cutaneous Wound Healing. *Am J Pathol.*

Volksdorf TuB, J.M (2016) Tight Junctions and cutaneous wound healing. in revision.

Vrtacnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrac S, Marc J (2014) The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb).* 24(3):329-342.

Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hultenby K, Schwend T, Omoto Y, Warner M, Gustafsson JA (2006) Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(8):2959-2964.

Wagner AE, Huck G, Stiehl DP, Jelkmann W, Hellwig-Burgel T (2008) Dexamethasone impairs hypoxia-inducible factor-1 function. *Biochem Biophys Res Commun.* 372(2):336-340.

Watters JJ, Dorsa DM (1998) Transcriptional effects of estrogen on neuronal neurotensin gene expression involve cAMP/protein kinase A-dependent signaling mechanisms. *J Neurosci.* 18(17):6672-6680.

Webb PG, Spillman MA, Baumgartner HK (2013) Claudins play a role in normal and tumor cell motility. *BMC Cell Biol.* 14:19.

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994) Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(11):5212-5216.

Woo K, Ayello EA, Sibbald RG (2007) The edge effect: current therapeutic options to advance the wound edge. *Adv Skin Wound Care.* 20(2):99-117; quiz 118-119.

Yafang L, Qiong W, Yue R, Xiaoming X, Lina Y, Mingzi Z, Ting Z, Yulin L, Chengshi Q (2011) Role of Estrogen Receptor-alpha in the Regulation of Claudin-6 Expression in Breast Cancer Cells. *J Breast Cancer*. 14(1):20-27.

Yang XP, Reckelhoff JF (2011) Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 20(2):133-138.

Ye L, Martin TA, Parr C, Harrison GM, Mansel RE, Jiang WG (2003) Biphasic effects of 17-beta-estradiol on expression of occludin and transendothelial resistance and paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol*. 196(2):362-369.

Yokouchi M, Kubo A, Kawasaki H, Yoshida K, Ishii K, Furuse M, Amagai M (2015) Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum. *J Dermatol Sci*. 77(1):28-36.

Yoshida K, Yokouchi M, Nagao K, Ishii K, Amagai M, Kubo A (2013) Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *J Dermatol Sci*. 71(2):89-99.

Yoshida Y, Morita K, Mizoguchi A, Ide C, Miyachi Y (2001) Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 293(5):239-244.

Yuki T, Hachiya A, Kusaka A, Sriwiriyanont P, Visscher MO, Morita K, Muto M, Miyachi Y, Sugiyama Y, Inoue S (2011) Characterization of Tight Junctions and Their Disruption by UVB in Human Epidermis and Cultured Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 131(3):744-752.

Zancan V, Santagati S, Bolego C, Vegeto E, Maggi A, Puglisi L (1999) 17Beta-estradiol decreases nitric oxide synthase II synthesis in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. 140(5):2004-2009.

Zeng R, Li X, Gorodeski GI (2004) Estrogen abrogates transcervical tight junctional resistance by acceleration of occludin modulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 89(10):5145-5155.

Zhou B, Blanchard A, Wang N, Ma X, Han J, Schroedter I, Leygue E, Myal Y (2015) Claudin 1 promotes migration and increases sensitivity to tamoxifen and anticancer drugs in luminal-like human breast cancer cells MCF7. *Cancer Invest*. 33(9):429-439.

Zhou S, Zilberman Y, Wassermann K, Bain SD, Sadovsky Y, Gazit D (2001) Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem Suppl*. Suppl 36:144-155.

Zhou Z, Zhang L, Ding M, Luo Z, Yuan S, Bansal MB, Gilkeson G, Lang R, Jiang W (2017) Estrogen decreases tight junction protein ZO-1 expression in human primary gut tissues. *Clin Immunol.* 183:174-180.

Zhu H, Lu J, Wang X, Zhang H, Tang X, Zhu J, Mao Y (2013) Upregulated ZO-1 correlates with favorable survival of gastrointestinal stromal tumor. *Med Oncol.* 30(3):631.

9 Liste bisher veröffentlichter Arbeiten

Co-Autorenschaft an der Veröffentlichung "Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin are important for Cutaneous Wound Healing" (Am J Pathol. 2017 Jun; 187 (6):1301-1312 doi: 10.1016/j.ajpath.2017.02.006. Epub 2017 Apr 12)

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

.....Kathrin Schawjinski.....

(Unterschrift)

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan W. Schneider für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas und für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten an der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UKE bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Johanna Brandner, Leiterin des Labors für Zell- und Molekularbiologie der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UKE, die mir mit unermüdlichem Einsatz zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterhin bedanke ich mich bei den MTAs Frau Ewa Wladykowski, Pia Houdek und Sabine Vidal-Y-Sy für die Hilfestellung bei jeder offenen Frage. Herzlichen Dank an alle weiteren Mitarbeiter des Labors für Zell- und Molekularbiologie für das freundschaftliche Arbeitsklima und die konstruktiven Gespräche. Ebenso dankbar bin ich Frau Susanne Lezius aus dem Institut für Biometrie und Epidemiologie, die mich in der statistischen Auswertung unterstützt hat.

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinem Mann und meinen Eltern für ihre emotionale und motivierende Unterstützung.

12 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden darf.

Unterschrift: