

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Philipp Andreas Scholz

aus Immenstadt im Allgäu

Dezember 2015

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Thema:

Etablierung eines organotypischen Hautmodells zur Rolle der humanen epidermalen Stammzellen in der Wundheilung *in vitro*

Gutachter: Prof. Dr. Peter Angel

Prof. Dr. Petra Boukamp

INHALTSVERZEICHNIS

<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>III</u>
<u>1. EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1. DIE MENSCHLICHE HAUT	1
1.1.1. Die Epidermis	1
1.1.2. Dermis	5
1.2. WUNDHEILUNG <i>IN VIVO</i>	5
1.3. WUNDHEILUNG <i>IN VITRO</i>	7
1.4. ZIELSETZUNG	7
<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>9</u>
2.1. MATERIALIEN	9
2.1.1. Chemikalien Zellkultur	9
2.1.2. Medienzusammensetzungen Zellkultur	10
2.1.3. Antikörper Immunhistochemie	10
2.1.4. Sonstige Chemikalien	11
2.1.5. Geräte	11
2.1.6. Verbrauchsmaterialien	12
2.1.7. Software	12
2.2. METHODEN	12
2.2.1. Zellkultivierung	12
2.2.2. Herstellung und Verwendung organotypischer Kokulturen	13
2.2.3. Prozessierung von organotypischen Kulturen	15
2.2.4. Histologische Analysen	16
2.2.5. Biochemische Analysen	17
2.2.6. Bildanalysen	17
<u>3. ERGEBNISSE</u>	<u>19</u>
3.1. ETABLIERUNG DES WUNDMODELLS	19
3.1.1. Wundmodell auf Basis von colOTCs	19
3.1.2. Wundmodell auf Basis von scaOTCs	20
3.1.3. Zelleigene Matrix als Basis für das Wundmodell	21
3.2. CHARAKTERISIERUNG DES WUNDMODELLS	22
3.2.1. Differenzierungsmarker	22

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.2.	Wundheilungsmarker	23
3.2.3.	Wundheilungskinetik	24
3.3.	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN AM WUNDMODELL	25
3.3.1.	Serumgehalt des Mediums bedingt Wundheilungskinetik	25
3.3.2.	Vorkulturdauer bedingt Wundheilungskinetik	26
3.3.3.	Immortalisierte Zellen im Wundheilungsmodell	27
3.4.	ROLLE EPIDERMALER STAMMZELLEN IN DER WUNDHEILUNG	28
3.5.	GENEXPRESSIONSANALYSE	30
3.5.1.	RNA-Isolierung	30
3.5.2.	DNA-Microarray	30
3.5.3.	Signalweganalyse der Genregulation in der Epidermis	33
3.6.	BEDEUTUNG VON TLRs UND NF- κ B IN DER WUNDHEILUNG	41
<u>4.</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>42</u>
4.1.	ETABLIERUNG DES WUNDMODELLS	42
4.2.	CHARAKTERISIERUNG DES WUNDMODELLS	43
4.2.1.	Markereexpression	43
4.2.2.	Wundheilungskinetik	45
4.3.	SERUMGEHALT DES MEDIUMS	45
4.4.	VORKULTURDAUER	46
4.5.	MODIFIKATION DES WUNDMODELLS	47
4.5.1.	Verwendung von HaCaT-Zellen	47
4.5.2.	Verwendung von CDM-Kulturen	48
4.6.	LABEL-RETAINING CELLS	49
4.7.	GENEXPRESSIONSANALYSE	50
4.7.1.	DNA-Microarray	50
4.8.	FUNKTIONELLE ASPEKTE DES NF- κ B-SIGNALWEGS BEI DER WUNDHEILUNG	54
4.9.	FAZIT UND AUSBLICK	55
<u>5.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>57</u>
<u>6.</u>	<u>ABSTRACT</u>	<u>58</u>
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>		<u>59</u>
<u>VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN</u>		<u>68</u>
<u>ANHANG</u>		<u>69</u>
<u>DANKSAGUNG</u>		<u>75</u>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AMP	antimikrobielles Protein
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> , basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i> , knochenmorphogenetisches Protein
BrdU	Bromo-desoxy-uridin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDM	<i>cell-derived matrix</i> , zellgebildete Matrix
cdmOTC	CDM-basierte organotypische Kokultur
CE	<i>cornified envelope</i>
colOTC	kollagenbasierte organotypische Kokultur
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCD	<i>decellularized dermis</i> , zellfreie Dermis
DED	<i>de-epidermized dermis</i> , epidermisfreie Dermis
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i> , epithelial-mesenchymaler Übergang
EZM	extrazelluläre Matrix
FC	<i>fold change</i> , Änderung um einen Faktor
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
Flg	Filaggrin
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten- und Makrophagenkoloniestimulierender Faktor
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HaCaT	<i>human adult skin, low calcium, elevated temperature</i>
hBD	humanes beta-Defensin
IdU	Iodo-desoxy-uridin
IES	interfollikuläre epidermale Stammzelle
IFE	interfollikuläre Epidermis
IL	Interleukin
Inv	Involucrin
K	Keratin
kg	Kilogramm

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

KGF	<i>keratinocyte growth factor</i> , Keratinozyten-Wachstumsfaktor
KO	<i>knock-out</i>
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
LRC	<i>label-retaining cell</i> , Zelle mit behaltener Markierung
m	Meter
MET	<i>mesenchymal-epithelial transition</i> , mesenchymal-epithelialer Übergang
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
n. V.	nach Verwundung
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NHK	normale humane Keratinozyten
p	p-Wert
PA	Plasminogenaktivator
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
qPCR	quantitative PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
scaOTC	gerüstverstärkte organotypische Kokultur
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom
SE	<i>skin equivalent</i> , Hautäquivalent
SZ	<i>Stammzelle</i>
TA-Zelle	<i>transit amplifying</i> -Zelle, vorübergehend proliferierende Zelle
TG	Transglutaminase
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TIMP	<i>tissue inhibitor of MMPs</i> , Gewebeinhibitor von MMPs
TLR	<i>toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TnC	Tenascin-C
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
W	Woche

1. EINLEITUNG

1.1. DIE MENSCHLICHE HAUT

Die Haut gilt gemeinhin als das größte Organ des Menschen. Sie besitzt eine Fläche von 1,5-2 m², wiegt zwischen 3 und 10 kg und nimmt damit etwa 7-8 % der Körpermasse ein. Sie bildet die äußere Hülle des Körpers und nimmt als solche eine wichtige Schutzfunktion, die Barrierefunktion wahr. Sie schützt vor (UV-)Strahlung, Wasserverlust, mechanischen Einflüssen, chemischen Substanzen und biologischen Gefahren wie Pathogenen und Allergenen. Weitere, aktive Funktionen der Haut sind Thermoregulation durch Schweißbildung und Durchblutung, Wahrnehmung von Temperatur, Druck und Schmerz, sowie angeborene und adaptive Immunabwehr. Voraussetzungen für die Erfüllung dieser Aufgaben sind das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und die intakte Morphologie der Haut. Die Haut lässt sich in drei Kompartimente einteilen. Diese sind Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut) (Sterry 2011; Rassner 2013). Der Aufbau der Haut ist in Abbildung 1A dargestellt.

1.1.1. DIE EPIDERMIS

1.1.1.1. Aufbau der Epidermis

Die Epidermis besteht hauptsächlich aus Keratinozyten, welche ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel bilden. Die oberste Schicht ist die Hornschicht, das *Stratum corneum*, und wird von terminal differenzierten, akaryoten Keratinozyten gebildet. Diese Schicht stellt die primäre physikalische Barriere dar. Unter dem *Stratum corneum* befindet sich die Körnerschicht, das *Stratum granulosum*, welches Erscheinung und Bezeichnung den reichlich vorhandenen Keratohyalingranulae verdankt. Die Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) ist durch die einsetzende Differenzierung der suprabasalen Keratinozyten gekennzeichnet. Das auch als Basalschicht bezeichnete, einzellige *Stratum basale* enthält die epidermalen Stammzellen und stellt das regenerative Reservoir der Epidermis dar. Als unterste Schicht der Epidermis grenzt die Basalschicht an die extrazelluläre Basalmembran, welche Epidermis und Dermis trennt (Abbildung 1B).

Neben Keratinozyten enthält die Epidermis Melanozyten, Merkel-Zellen und Langerhans-Zellen. Langerhans-Zellen sind die dendritischen Zellen der Haut und sind für Aufnahme und Präsentation von Antigenen verantwortlich. Merkel-Zellen übernehmen sensorische Aufgaben bei der Tastwahrnehmung. Sie entstammen jedoch nicht der Neuralleiste, sondern sind möglicherweise epidermaler Herkunft (Morrison et al. 2009). Melanozyten sind die Pigmentzellen der Haut. Sie sitzen in der Basalschicht, synthetisieren das Hautpigment Melanin und geben dieses in Form von Melanosomen an die benachbarten etwa 36 Keratinozyten, mit denen sie die sog. epidermale Melanineinheit bilden, weiter (Wu & Hammer 2014).

Die Grenz- und Verbindungsschicht zwischen Dermis und Epidermis ist die 50–90 nm dicke Basalmembran (Burgeson & Christiano 1997). Ihre Funktion ist die stabile Verankerung des Epithels auf der Dermis, weshalb sie ein flächiges makromolekulares Ensemble verschiedener spezifischer Komponenten darstellt. Dieses besteht vornehmlich aus einem netzförmigen Aggregat von Typ IV-Kollagen und den Lamininen 511 und 521, in das Komponenten mit quervernetzenden Eigenschaften wie Nidogen integriert sind.

1. EINLEITUNG

Elektronenmikroskopisch lässt sich eine elektronendurchlässige, epidermisseitige *Lamina lucida* und die elektronendichte, dermisseitige *Lamina densa* unterscheiden. Die basalen Keratinozyten besitzen Hemidesmosomen, welche das Keratin-Zytoskelett über intrazelluläres BPAG1 und das Transmembranprotein Integrin $\alpha 6\beta 4$ mit extrazellulärem Laminin-332 verbindet (Wiche & Winter 2011). Zur Verankerung der Basalschicht an der Basalmembran dienen außerdem membranständiges Kollagen XVII, sowie Integrin $\alpha 3\beta 1$ -vermittelte Fokalkontakte (Franzke et al. 2005; Margadant et al. 2013). Die *Lamina lucida* wird von Filamenten aus Laminin-332 und Kollagen XVII durchspannt, welche in die *Lamina densa* reichen. Letztere besteht vorrangig aus Kollagen IV, Nidogen 1 und 2, Laminin-511 und Perlecan (Bruckner-Tuderman & Has 2014). Aus der *Lamina densa* reichen Ankerfibrillen aus Kollagen VII in die Dermis und befestigen die Basalmembran an der Kollagenmatrix der Dermis (Keene et al. 1987).

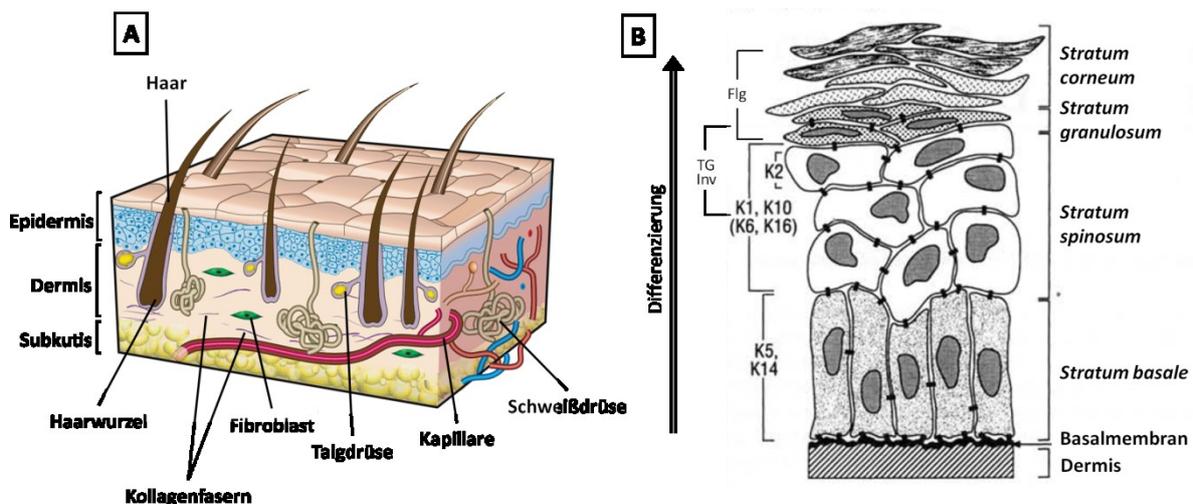


Abbildung 1: Schematische Darstellungen von Epidermis und Haut

A: Die Haut mit wichtigen Merkmalen und Anhängen. (Modifiziert aus Gurtner et al. 2008); **B:** Die Epidermis. Wichtige Differenzierungsmarker sind Keratine, sowie für den Aufbau des cornified envelope wichtige Proteine wie Transglutaminase (TG), Involucrin (Inv) und Filaggrin (Flg). Die Differenzierung beginnt in der Basalschicht und schreitet mit Expression verschiedener Proteine und der Wanderung der Zellen nach oben fort. (Modifiziert aus Presland & Dale 2000)

1.1.1.2. Epidermale Homöostase

Die adulte Epidermis unterliegt einem ständigen Prozess der Erneuerung. Terminal differenzierte, verhornte Keratinozyten gehen in Form von Hautschuppen „verloren“ und müssen ersetzt werden. Dieser Ersatz findet an der Basalschicht statt, wo sich die mitotisch aktiven Zellen befinden (Potten 1971). Innerhalb von etwa vier Wochen wird die Epidermis durch dieses Zusammenspiel von Proliferation und Differenzierung vollständig erneuert (Fuchs 1994).

Basale Zellen sind gekennzeichnet durch die Expression des Keratinspaars K5/K14. Keratin 14 ist ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der proliferativen Aktivität (Alam et al. 2011). Im Zuge der terminalen Differenzierung von Keratinozyten verlieren die Zellen die Expression der basalen Keratine 5 und 14 und damit ihr proliferatives Potential. Während sich die differenzierenden Zellen von der Basalschicht lösen und zum *Stratum spinosum* gelangen, wird das Keratinspaar K1/10 induziert (Fuchs & Green 1980). Die Reorganisation des Filamentnetzwerks hat eine mechanische Verfestigung des Zytoskeletts zur Folge, die sich im Verlauf der Differenzierung fortsetzt. Sind die Zellen aus der Basalschicht gelöst, setzt die Expression von Involucrin ein (Banks-Schlegel & Green 1981). Dieser Differenzierungsmarker ist zusammen mit Transglutaminasen essenziell für die Bildung des sogenannten *cornified envelope* (CE), welcher wiederum einen maßgeblichen Anteil an der

1. EINLEITUNG

Barrierefunktion der Epidermis hat (Watt 1989). Der CE entsteht, indem Involucrin und weitere Proteine wie Loricrin, Trichohyalin und *small proline-rich-proteins* (SPRRs) nahe der Zellmembran durch Transglutaminase kovalent verknüpft werden. Dieses Proteinnetzwerk gibt terminal differenzierten Keratinozyten des *Stratum corneum*, den sog. Korneozyten, mechanische Widerstandsfähigkeit (Proksch et al. 2008). Einen weiteren Beitrag zur Rigidität des *Stratum corneum* leistet Filaggrin, welches als Profilaggrin im *Stratum granulosum* gebildet wird. Nach Prozessierung durch Phosphatasen und Proteasen führt es Keratinfilamente zu Bündeln und Makrofibrillen zusammen (Presland & Dale 2000). Darüber hinaus fungieren Filaggrin und seine Prozessierungsprodukte als Regulatoren von Differenzierung, pH-Wert und Feuchtigkeit und sie tragen zum Schutz vor Sonneneinstrahlung und vor mikrobieller Besiedlung bei (Harding et al. 2013). Während der Differenzierung ändert sich auch die Zusammensetzung der Zell-Zell-Verbindungen, es entstehen die sog. Korneodesmosomen. Diese enthalten die Cadherine Desmoglein 1 und Desmocollin 1 sowie Corneodesmosin und sind intrazellulär mit dem CE verbunden. Somit tragen sie einerseits zur Integrität des *Stratum corneum* bei, andererseits ermöglichen sie das Abschuppen, indem sie im Laufe der terminalen Differenzierung gespalten werden (Ishida-Yamamoto et al. 2011).

Ebenso wichtig wie die mechanische Integrität des CE durch die Vernetzung und Bündelung von Proteinfilamenten ist die Bildung einer Diffusionsbarriere durch Einlagerung von Lipiden um die Korneozyten. Die Lipide des CE werden von Zellen der oberen *Stratum spinosum* und dem *Stratum granulosum* in intrazelluläre Lamellarkörper eingelagert. Die Lamellarkörper enthalten außerdem verschiedene Lipasen, Protease und antimikrobielle Proteine (Elias & Feingold 2005). Diese Organellen werden im oberen *Stratum granulosum* sezerniert; die enthaltenen Lipide werden extrazellulär modifiziert und bilden einen interzellulären Kitt, der die primäre Barriere gegen Wasser und Elektrolyte darstellt. Diese dient dem Schutz vor transepidermalem Wasserverlust, wie auch vor dem Eindringen wasserlöslicher Substanzen (Proksch et al. 2008).

1.1.1.3. Epidermale Stammzellen

Die epidermalen Stammzellen werden nach ihrer Zugehörigkeit zu den Hautkompartimenten eingeteilt. Die Stammzellen des Haarbalgs exprimieren Lgr5. Lgr5-positive Zellen lassen sich basal von der inneren Wurzelscheide bis zur dermalen Papille nachweisen (Jaks et al. 2008). Diese Stammzellen besitzen einen spezifischen K15-Promotor, mithilfe dessen sich die Stammzellen des Haarfollikels gentechnisch markieren lassen. So lassen sich auch Stammzellen in der Talgdrüse der Haarwurzel nachweisen (Morris et al. 2004). Stammzellen des murinen Haarbalgs tragen nach Verwundung auch zur Regeneration der interfollikulären Epidermis (IFE) bei, sie und ihre Nachkommen verbleiben jedoch nicht dauerhaft in der IFE (Blanpain & Fuchs 2009). Die Tatsache, dass Körperareale ohne Behaarung, wie etwa die Hand- und Fußflächen nach Verwundung ebenso gut heilen können legt nahe, dass auch in der IFE Stammzellen existieren und diese ausreichend für die Reepithelialisierung sind.

Die homöostatische Epidermis befindet sich im Gleichgewicht von Proliferation und Differenzierung und damit in einem ständigen Prozess der Regeneration. Ursprünglich wurde angenommen, dass die dorsale murine Haut in säulenartigen Stapeln hexagonaler Zellen über einer Grundfläche von etwa zehn Basalzellen angeordnet ist (Allen & Potten 1974; Mackenzie 1970). Diese Zellstapel wurden als epidermale proliferative Einheit (*epidermal proliferative unit*, EPU) bezeichnet. Dies wurde später durch Abstammungsverfolgung mithilfe von LacZ- und EGFP-Markierung weiter untersucht, konnte jedoch nicht eindeutig bestätigt werden (Ghazizadeh & Taichman 2001; Ro & Rannala 2004). Es

1. EINLEITUNG

wurde vermutet, dass die Stammzellen der humanen IFE sich an den tiefsten Stellen der Epidermis, in den Reteleisten befinden. In Handflächenhaut von Affen wurden basal in den Reteleisten weniger proliferativ aktive Zellen detektiert als in den erhöhten Bereichen (Lavker & Sun 1982), was auf die Gegenwart von Stammzellen in den basalen Bereichen hindeutet. Epidermale Zellen mit hoher Integrin β 1-Expression zeigten bei Kultivierung die höchste Replikationskapazität, und damit das höchste Stammzellpotenzial (Jones & Watt 1993). Ebenfalls tief in den Reteleisten sitzen Nester Integrin β 1-*high* Zellen, welche am basalen Zellpol eine besonders intensive Integrin β 1-Färbung aufweisen (Jones et al. 1995). Durch Zellsortierung konnten basale Keratinozyten mit der Kapazität zur langfristigen Koloniebildung angereichert werden. Diese Zellen besitzen den Phänotyp Integrin α 6 *high* und CD71(Transferrin-Rezeptor)-*low* (Li et al. 1998). Durch Anreicherung von Zellen mit diesen Oberflächenmerkmalen und Untersuchung dieser Zellen auf die differentielle Expression von Genen, wurde Wif-1 als potentieller Marker von Stammzellen der IFE identifiziert (Schlüter et al. 2013). Wif (*Wnt inhibitory factor*)-1 inhibiert den Wnt-Signalweg, welcher bei der Haarentwicklung, der Differenzierung von Keratinozyten und der Erhaltung von Stammzeleigenschaften eine wichtige Rolle spielt (Blanpain & Fuchs 2006), was eine Rolle von Wif-1 bei der Regulation von Stammzeleigenschaften nahelegt.

Zum Mechanismus der Stammzellregeneration in der Epidermis existieren zwei konkurrierende Modelle. Das klassische Modell geht von einem statischen Stammzellpool aus, dessen Stammzellen sich asymmetrisch teilen, was mit der Bildung einer (Tochter-)Stammzelle und einer *transit amplifying cell* (TA-Zelle, festgelegte Zelle) einhergeht (vgl. Abbildung 2). Die TA-Zellen können nach dem zugrundeliegenden Modell noch wenige Zellzyklen symmetrischer Zellteilung durchlaufen und so zur nötigen Zellmasse beitragen, sie besitzen jedoch keine Stammzeleigenschaften im engeren Sinne mehr. Dies bedeutet, dass sie bereits darauf festgelegt sind, nach diesen wenigen Zyklen den Weg der terminalen Differenzierung zu beschreiten (Kaur 2006). Eine neuere Hypothese widerspricht der Existenz von distinkten Stammzell- und TA-Zellpopulationen. Das *committed progenitor*-Modell (festgelegte Vorläufer) besagt, dass es nur eine einheitliche Population von Vorläuferzellen in der Basalschicht der Epidermis gibt, welche bei einer Zellteilung mit gleicher Wahrscheinlichkeit entweder zwei Vorläuferzellen oder zwei differenzierende Zellen, bzw. jeweils einen der Zelltypen produzieren können (Doupé & Jones 2012). Die Entscheidung über das Schicksal der Nachkommen bleibt dabei dem Zufall überlassen, weshalb der genannte Artikel den Titel *Interfollicular Epidermal Homeostasis: Dicing with Differentiation* trägt. Für das klassische Modell spricht der Nachweis von *label-retaining cells* (LRCs) als potentielle Stammzellen. Dieser Nachweis beruht auf der Annahme, dass Stammzellen sich relativ selten teilen und dadurch eine eingebrachte, stabile Kernmarkierung beibehalten können. TA-Zellen dagegen teilen sich häufiger und verdünnen daher die Markierung mit jedem Zellzyklus. Mittels dieser bewährten Methode konnten potenzielle Stammzellen als LRCs durch *pulse-chase*-Markierung in der Mundschleimhaut, in der IFE, im Haarbalg, in der Gebärmutter Schleimhaut, im Darmepithel, sowie in organotypischen Hautkulturen nachgewiesen und in ihrem Verhalten beschrieben werden (Bickenbach 1981; Langton et al. 2008; Chan & Gargett 2006; Potten 2004; Muffler et al. 2008).

Die beiden unterschiedlichen Hypothesen zeigen, wie umstritten das Thema interfollikuläre epidermale Stammzellen ist, und ebenso unklar ist der Mechanismus, wie die Stammzeleigenschaften in der IFE reguliert werden. Es kann jedoch als gesichert gelten, dass die IFE ein ausgeprägtes Wundheilungspotenzial, unabhängig vom regenerativen Potenzial der Haarfollikel besitzt (Langton et al. 2008).

1. EINLEITUNG

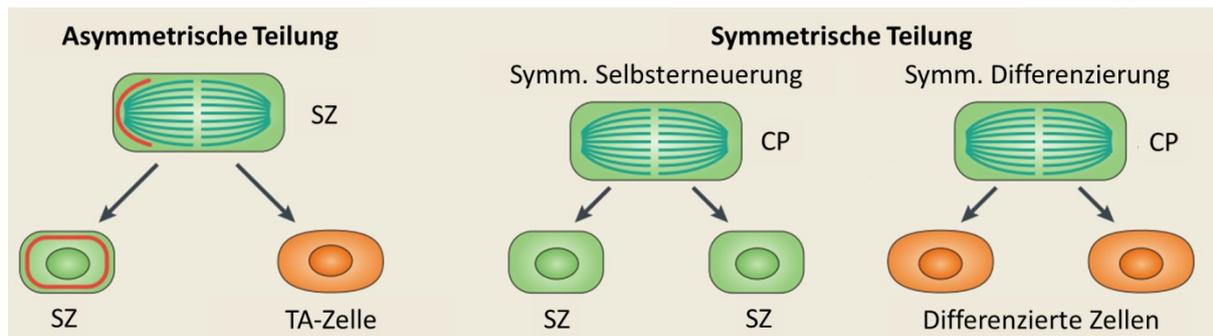


Abbildung 2: Symmetrische und asymmetrische Teilung von Stammzellen

Links: „klassisches“ Stammzellmodell, eine Stammzelle (SZ) teilt sich asymmetrisch und produziert eine Tochter-Stammzelle und eine *transit amplifying* (TA)-Zelle. Rechts: Möglichkeiten der Zellteilung nach dem *committed-progenitor* (CP)-Modell. Jede basale Vorläuferzelle (CP) kann nach dem Zufallsprinzip entweder eine symmetrische Selbsterneuerung oder eine symmetrische Differenzierung durchlaufen. (Modifiziert aus Blanpain & Fuchs 2009)

1.1.2. DERMIS

Die Dermis ist der Bindegewebsanteil der Haut der in zwei Zonen unterteilt werden kann. Das obere *Stratum papillare* ist eng mit der Epidermis verzahnt. Durch diese Verzahnung von dermalen Papillen und Reteleisten der Epidermis wird die Belastbarkeit gegenüber Scherkräften erhöht. Das *Stratum reticulare* liegt zwischen *Stratum papillare* und dem subkutanen Fettgewebe. Die extrazelluläre Matrix der Dermis enthält neben den dominierenden Kollagenfasern auch elastische Fasern und wasserbindende Grundsubstanz auf der Basis von Proteoglykanen. Die dermalen Strukturproteine werden vom Hauptzelltyp der Dermis, den dermalen Fibroblasten, gebildet. Neben Fibroblasten befinden sich in der dermalen extrazellulären Matrix Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten. Im Gegensatz zur gefäßfreien Epidermis ist die Dermis reich an Lymph- und Blutgefäßen, sowie an sensorischen Nerven. Außerdem finden sich hier Hautanhangsgebilde wie Haarwurzeln, Schweißdrüsen und Talgdrüsen (Stern 2011).

1.2. WUNDHEILUNG *IN VIVO*

Die Fähigkeit der Haut, Wunden zu heilen, ist eine lebenswichtige Eigenschaft, um Integrität und Barrierefunktion kontinuierlich sicher zu stellen. Beim Menschen ist diese Fähigkeit jedoch durch systemische Erkrankungen häufig beeinträchtigt, beispielsweise durch Diabetes, Durchblutungsstörungen (*Ulcus cruris*) oder Druckgeschwüre (Dekubitus), was zu chronischen Wunden führt. Das wachsende Wissen um die zellulären und molekularbiologischen Vorgänge konnte die Behandlungsmöglichkeiten bereits verbessern (Singer & Clark 1999). Zwar sind biotechnologische Transplantate und Gewebematrizen auf dem Markt, hingegen ist lediglich PDGF-BB als einziger Wachstumsfaktor zur Behandlung chronischer Wunden durch die US-amerikanische Aufsichtsbehörde FDA zugelassen (Mulder et al. 2014).

Die Wundheilung *in vivo* kann in drei Phasen eingeteilt werden. Diese sind Inflammation, Gewebeneubildung und Gewebeumbau. Direkt nach der Gewebsverletzung werden die Gerinnungskaskade, inflammatorische Signale und das Immunsystem aktiviert, womit die inflammatorische Phase einsetzt (Gurtner et al. 2008). Initiale Signale gehen von aggregierenden Blutplättchen aus, welche PDGF freisetzen und dadurch Fibroblasten, Neutrophile und Makrophagen aktivieren und rekrutieren (Heldin & Westermarck 1999). Gerinnungsfaktoren und das aktivierte Komplementsystem locken weitere Leukozyten in den Wundbereich. Gleichzeitig entsteht durch die Blutgerinnung ein provisorischer Wundverschluss. Neutrophile und Makrophagen halten die Wunde

1. EINLEITUNG

frei von Fremdstoffen und Keimen und setzen TNF, IL-1, TGF β und IGF frei. Damit stimulieren sie die Bildung von neuen Gefäßen und Bindegewebe durch Endothelzellen bzw. Fibroblasten (Riches 1996). Dies leitet den Übergang von der Inflammation zur Geweberegeneration ein. In der Regenerationsphase finden Reepithelialisierung, d.h. der Wundverschluss durch Keratinozyten, sowie die Bildung von Granulationsgewebe, dem vorläufigen Bindegewebe, durch Fibroblasten statt. Das vorrangige Ziel der Reepithelialisierung ist die Wiederherstellung einer intakten und dauerhaft funktionellen Hautbarriere.

Bei der Reepithelialisierung wird das mehrschichtige epitheliale Gewebe mobilisiert. Dieser Prozess ist so komplex, dass bislang keine einheitliche Hypothese zu den mechanistischen Abläufen formuliert werden konnte, sondern verschiedene konkurrierende Modelle zu seiner Erklärung bestehen. Nach dem *leap frog*-Modell breitet sich eine Epithelzunge aus, in der basale Zellen ähnlich einem Bocksprung von hinten nach vorn übereinander migrieren (Krawczyk 1971). Dem gegenüber steht der *sliding*-Mechanismus, wonach basale und suprabasale Zellschichten sich als Einheit nach vorn bewegen, wobei die Leitzellen an der Migrationsfront nicht ausgetauscht werden (Donaldson & Mahan 1988). Eine aktuelle Studie schlägt den *extending shield reepithelialization*-Mechanismus vor. Dieser besagt, dass die Epithelzunge durch kollektive Migration von basalen Zellen entsteht. Dabei heben sich Zellen an der Spitze ab und bilden die erste suprabasale Schicht, woraufhin die dahinter liegenden Zellen zu Leitzellen werden (Safferling et al. 2013).

Die Reepithelialisierung beginnt etwa 16 – 20 h nach der Verwundung. Hierfür sind zunächst weitreichende Umbauten im Zytoskelett der Keratinozyten nötig. U.a. werden spezielle Keratine, i.e. die Keratine 6, 16 und 17 (Paladini et al. 1996) exprimiert. Dies kann durch inflammatorische Signale wie IL-1, IL-6, Interferon- γ und TNF induziert werden (Komine et al. 1996). Im Zytoplasma der Keratinozyten liegen Pools von IL-1 vor, die nach Verletzung der Zelle prozessiert, dadurch aktiviert und spontan freigesetzt werden können. IL-1 kann in unterschiedlichsten Zellen, so auch in dermalen Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten, über 90 Gene induzieren, u.a. Zytokine, Chemokine, Proteasen und Matrixbestandteile (O'Neill & Greene 1998; Dinarello 1994; Werner & Grose 2003), welche ihrerseits essenziell für die Wundheilung sind.

Die Mobilisierung von Keratinozyten erfordert außerdem den Abbau von desmosomaler und hemidesmosomaler Verbindungen (Heng 2011). Die Zellen müssen dann die nötigen Integrine für die Adhäsion auf der neuen provisorischen Matrix, die vorrangig Fibrin und Fibronectin enthält, exprimieren. Auch werden von den migrierenden Keratinozyten promigratorische Komponenten der Basallamina sezerniert, z. B. Laminin 5 (Choma et al. 2007).

Auch Proliferation wird nach einer Verletzung der Haut induziert und trägt zum Wundschluss bei. Bereits während der Reepithelialisierung zeigen Keratinozyten am Wundrand und in der Epithelzunge verstärkte Proliferation (Moll et al. 1998), die zum raschen Ersatz der durch die Verletzung verlorengegangenen Zellen dient.

Nach Wundschluss beginnen Gewebeaufbau und -umbau. Die noch dünne Neoepidermis wird durch weiterhin stark erhöhte Proliferation verdickt. Die neu gebildeten Zellen durchlaufen den Prozess der terminalen Differenzierung und stellen so Barrierefunktion und Gewebeintegrität wieder her. Im dermalen Teil der Wunde wird das Granulationsgewebe zu Narbengewebe umgebaut. Dieser Prozess beinhaltet den Abbau der provisorischen Fibrinmatrix, sowie den Aufbau neuer Kollagenfasern, und -Bündel, was vorrangig durch dermale Makrophagen und Fibroblasten bewerkstelligt wird.

1. EINLEITUNG

Verantwortlich für den regulierten Umbau der Matrix sind MMPs (Matrix-Metalloproteasen) und deren Inhibitoren (TIMPs) (Singer & Clark 1999).

1.3. WUNDHEILUNG *IN VITRO*

Organotypische Hautmodelle leisten seit Jahrzehnten einen bedeutenden Beitrag zur Erforschung unterschiedlicher Aspekte physiologischer und pathologischer Vorgänge in der Haut. Dank der stark reduzierten Diversität beteiligter Zelltypen und der dadurch reduzierten Komplexität können Fragestellungen angegangen werden, die *in vivo* nicht zu bearbeiten wären. Insbesondere Morphogenese und Kanzerogenese in der Haut, sowie die grundlegenden Regulationsvorgänge wurden auch in einem dreidimensionalen Kontext *in vitro* untersucht (Boukamp et al. 1982; Boukamp et al. 1990). Da Forschung an menschlicher Haut *in situ* sich aus ethischen Gründen verbietet, und gravierende Unterschiede in Morphologie und Funktion zwischen menschlicher Haut und der Haut des meistverwendeten tierischen Modells, der Maus bestehen, sind humane *in vitro*-Modelle unentbehrlich. Mit der Verwendung humaner Zellen in organotypischen Modellen wird eine epidermale Architektur erreicht, die der humanen *in vivo*-Situation sehr nahe kommt.

Es gibt unterschiedliche humane Hautmodelle, die als Ausgangspunkt für *in vitro*-Wundheilungsmodelle dienen: Explantatkulturen (Steinstraesser et al. 2009; Moll et al. 1998), auf dezellularisierter Dermis basierende organotypische Kulturen (Schoop et al. 1999; Ouwehand et al. 2012), rekonstituierte Haut auf Basis von Hydrogelen (Garlick & Taichman 1994; Stark et al. 2004) oder zellgebildeter extrazellulärer Matrix (Larouche et al. 2011). Die unterschiedlichen Eigenschaften dieser Modelle werden auch für die Untersuchung verschiedener Aspekte der Wundheilung genutzt (Laplante et al. 2001; el-Ghalbzouri et al. 2002; Garlick & Taichman 1994; Kroeze et al. 2012; Xu et al. 2012). Eine gemeinsame Eigenschaft war jedoch bisher die eng begrenzte Kultivierungsdauer, die nur bis zu etwa vier Wochen beträgt.

Eine weitaus längere Kulturdauer ist mit fibrinbasierten, gerüstverstärkten Hautäquivalenten (Stark et al. 2004) und seit Kurzem auch mit sog. cdmOTCs (*cell-derived-matrix organotypic co-culture*, (Berning et al. 2015)) erreichbar. Dies kann eine umfangreichere Untersuchung von Prozessen über längere Zeiträume und unter weitgehend physiologischen Bedingungen ermöglichen, da die Einstellung der Homöostase unter Kulturbedingungen einige Wochen in Anspruch nimmt.

1.4. ZIELSETZUNG

Die Erforschung der Wundheilung menschlicher Haut ist angesichts des drängenden Problems von Wundheilungsstörungen äußerst wichtig. Hierbei schränken die gravierenden Unterschiede zwischen Mensch und Maus, sowohl im Aufbau der Haut, als auch in der epidermalen Wundheilung, erheblich den Nutzen von Erkenntnissen aus Tierexperimenten ein. Die Forschung an menschlicher Haut *in vivo* verbietet sich aus ethischen Gründen weitestgehend. Zudem bringen die Komplexität der Wundheilung und die Vielzahl der beteiligten Zellen Schwierigkeiten bei der Auflösung fundamentaler Vorgänge mit sich. Somit besteht dringender Bedarf an geeigneten humanen *in vitro*-Wundheilungsmodellen.

Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst ein Wundheilungsmodell zu etablieren, welches eine möglichst weitreichende physiologische Relevanz bei gleichzeitig hoher Reproduzierbarkeit bietet. Es soll über eine ausreichend lange Kultivierbarkeit zur umfassenden Darstellung der Reepithelialisierung, sowie zur Generierung von *label-retaining cells* verfügen. Darüber hinaus ist eine möglichst große Ausbeute an Untersuchungsmaterial für diverse analytische Methoden gewünscht.

1. EINLEITUNG

Nach der Etablierung soll das Modell auf die geforderten Eigenschaften überprüft werden. Der Beitrag der LRCs während der Reepithelialisierung soll untersucht werden. Die Regulation der Genexpression während der Wundheilung soll bestimmt werden und die anschließende Analyse der Expressionsdaten soll weitere Aufschlüsse über essenzielle, für Keratinozyten bzw. Fibroblasten spezifische Signalwege geben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die Möglichkeit zur Entschlüsselung weiterer Einzelheiten des komplexen Prozesses der Reepithelialisierung zu schaffen, dabei die Funktion der interfollikulären Stammzellen zu beschreiben und neue Ansatzpunkte für die pharmakologische Therapie von Wundheilungsstörungen zu erschließen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIALIEN

2.1.1. CHEMIKALIEN ZELLKULTUR

Substanz	Konzentration / Hersteller
Adenin	24 mg/ml, Sigma-Aldrich
Aprotinin	10000 I.E./ml, Trasylol, Bayer
Ascorbinsäure	50 mg/ml, Sigma-Aldrich
BAY 117082	2, 10, 50 µM in DMSO, Invivogen
Betaisodona	Mundipharma
bFGF	100 µg/ml, Invitrogen
Casyclean	Schärfe System GmbH
Casyton	Schärfe System GmbH
Choleratoxin	10 ⁻¹⁰ M in FAD-Medium, Sigma-Aldrich
Dexamethason	10 µg/ml in DMSO, Invivogen
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle's Medium, Cambrex, Lonza
DMEM F-12	DMEM Ham's F-12 1:1, Lonza
EDTA	0,05% in PBS ⁻ + 1 µl/ml Phenolrot, Serva
EGF	5 µg/ml, Invitrogen
FCS	Fötale Kälberserum, Gibco
Fibrinogen	8 mg/ml in PBS ⁻ pH 7,0, Baxter
Hank's Puffer	8 g/l NaCl, 400 mg/l KCl, 48 mg/l Na ₂ HPO ₄ , 60 mg/l KH ₂ PO ₄ , 100 mg/l MgSO ₄ -Heptahydrat, 140 mg/l CaCl ₂ , 1 g/l Glukose, 10 mg/l Phenolrot, 350 mg/l NaHCO ₃
Hydrocortison	0,4 µg/mL, Sigma-Aldrich
Insulin	2,94 mg/ml in FAD-Medium, Sigma-Aldrich
LBS-EB	10 µg/ml in PBS, Invivogen
LPS-RS	10 µg/ml in PBS, Invivogen
LTA-SA	1 µg/ml in PBS, Invivogen
NaOH	1 M, Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	10000 U / 10000 µg/ml, Biochrom AG
Phenolrot	0,5% in PBS, Biochrom
Poly(I:C)	5 µg/ml in PBS, Invivogen
TGF-β	2 µg/ml in 4 mM HCl / 1 mg/ml BSA, Invitrogen
Thrombin-S	10 I.E./ml in PBS mit Zugabe von 5,88 mg/ml CaCl ₂ , Baxter
Trypsin	0,1% in PBS ⁻ + 1 µl/ml Phenolrot, Roche

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1.2. MEDIENZUSAMMENSETZUNGEN ZELLKULTUR

Bezeichnung	Zusammensetzung / Hersteller
CDM-Medium	DMEM + DMEM F-12 im Verhältnis 1:1 mit Zugabe von 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 µg/ml L-Ascorbinsäure-Phosphat, 1 ng/ml TGF-β, 2,5 ng/ml EGF, 5 ng/ml bFGF, 5 µg/ml rhInsulin
D10	DMEM mit Zugabe von 10% FCS (Biochrom AG) und 1% Penicillin/Streptomycin
DermaLife K	DermaLife Basal Medium mit 15 ml 6 mM L-Glutamin, 2 ml 0,4% Extract P, je 500 µl 1 µM Epinephrin, 0,5 ng/ml rhTGF-α, 100 ng/ml Hydrocortison, 5 µg/ml rhInsulin, 5µg/ml Apo-Transferrin (LifeLine Cell Technology)
Einfrriermedium	entsprechendes Medium mit Zugabe von 20% FCS und 10% Glycerin
FAD	DMEM + DMEM F-12 im Verhältnis 1:1 mit Zugabe von 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 5 mg Insulin, 1 ml 10 ⁻¹⁰ M Cholera toxin, 1 µg rhEGF, 24 µg Adenin und 0,4 µg/ml Hydrocortison
rFAD	DMEM + DMEM F-12 im Verhältnis 1:1 mit Zugabe von 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,4 µg/ml Hydrocortison, 10 ⁻¹⁰ M Cholera toxin, 50 µg/ml Ascorbinsäure, 500 U/ml Aprotinin

2.1.3. ANTIKÖRPER IMMUNHISTOCHEMIE

2.1.3.1. Primärantikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung	Klon/Best.-Nr.	Hersteller
K10	Maus	1:10	DE-K10	Progen
Inv	Kaninchen	1:100	MS-10288-P	Thermo Fisher Scientific
Flg	Maus	1:250	5002	Harbor BioProducts
TnC	Ratte	1:10	578	RnDSystems
K17	Maus	1:200	Ks17.E3	Progen
Vim	Maus	1:100	3B4	Abcam
Vim	Meerschw.	1:100	GP53	Progen
IdU/BrdU	Maus	1:10	BrdU Pure	BD Pharmingen
Ki67	Kaninchen	1:100	ab15580	Abcam

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1.3.2. Sekundärantikörper

Gegen	Typ	Fluorochrom	Verdünnung	Best.-Nr.	Hersteller
Maus	IgG	Alexa488	1:500	A11029	Invitrogen
Kaninchen	IgG	Cy3	1:1000	111-165-144	Dianova
Ratte	IgG	Alexa597	1:2000	A11007	Invitrogen
Meerschw.	IgG	Cy3	1:1000	706-165-148	Dianova

2.1.4. SONSTIGE CHEMIKALIEN

Substanz / Lösung	Zusammensetzung / Hersteller
PBS ⁻	137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,76 mM KH ₂ PO ₄ , 8,1 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4, Serva
PBS ⁺	PBS ⁻ mit Zugabe von 0,1 g/l CaCl ₂ , 0,1 g/l MgCl ₂ 6H ₂ O
PBS-T	PBS ⁻ mit Zugabe von 0,05% Triton-X100
Blockierlösung	PBS ⁻ mit Zugabe von 5% w/v BSA
BSA	bovines Serumalbumin, Sigma
Citratpuffer	Target Retrieval Solution, Dako
Einbettmittel	Fluorescence Mounting Medium, Dako

2.1.5. GERÄTE

Gerät	Typ / Hersteller
Mikroskop	AX-70, Olympus
Mikroskop	DM RBE, Leica
Mikroskop	BX-51, Olympus
Mikroskop	IX-70, Olympus
Brutschrank	Heraeus
Mikroskopkamera, s/w	F-view, SIS
Mikroskopkamera, Farbe	ColorView, SIS
Zellmühle	FastPrep FP120, Thermo Electron
Kryomikrotom	CM3050 S, Leica
Digitalkamera	NEX-C3, Sony

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1.6. VERBRAUCHSMATERIALIEN

Produkt	Informationen / Hersteller
Deep-Well Platten	6-Well-Format, BD Biosciences
Einbettmittel	Tissue-Tek, O.C.T. Compound, Sakura
Einfrierröhrchen	Kryoröhrchen, Nunc
Fettstift	Super Pap Pen, Beckman Coulter
Membraneinsätze	0,4 µm Porengröße (<i>high pore density</i>), 6-Well-Format, BD Biosciences
Membraneinsätze	3 µm Porengröße, 6-Well-Format, BD Biosciences
<i>scaffold</i> , Gerüststruktur	Sunsorb (Rayon), Berkshire und Bemcot M-3 II (Zellulose), AsahiKASEI
Schraubdeckelröhrchen	15 ml/50 ml, BD Biosciences
Zellkulturschalen	15 cm/10 cm Durchmesser, BD Biosciences

2.1.7. SOFTWARE

Zweck	Bezeichnung / Hersteller
Bildbearbeitung	Photoshop CS5, Adobe
Bildanalyse	ImageJ, open source
mikroskopische Aufnahmen	Cell [^] R, Olympus
mikroskopische Aufnahmen	Cell [^] F, Olympus
Analyse Array-Daten	Chipster, CSC, open source
Analyse Array-Daten	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i> , Qiagen

2.2. METHODEN

2.2.1. ZELLKULTIVIERUNG

2.2.1.1. Isolierung und Kultur von Keratinozyten

Chirurgische Hautexplantate wurden vom Unterhautfettgewebe befreit, für 30 min in Betaisodona Lösung desinfiziert und mit sterilem PBS gewaschen. Die Haut wurde in 5 mm breite Streifen geschnitten und über Nacht bei 4°C in Thermolysin-Lösung inkubiert. Die Epidermis wurde abgezogen, für 5 min mit 0,4% Trypsin behandelt und die entstandene Zellsuspension durch einen *Cell Strainer* filtriert. Die Keratinozyten wurden in einer Dichte von $5 \times 10^3 / \text{cm}^2$ auf Feederkulturen mit FAD-Medium ausgesät. Die Kultur erfolgte bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ (Normoxie).

Zum Ablösen von der Kulturplatte wurden die Zellen für 5-8 min mit 0,5% EDTA behandelt und die Feederzellen ab gespült. Die Keratinozyten wurden 5 min mit 0,4% Trypsin inkubiert, von der Unterlage gewaschen und in FCS-haltiges Medium gegeben.

Bis zur weiteren Verwendung wurden Keratinozyten bei $2 \times 10^6 / \text{ml}$ in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff vorrätig gehalten.

2. MATERIAL UND METHODEN

Zur Expansion wurde 1 ml der Vorratssuspension auf eine 15 cm Zellkulturschale mit Feederzellen und FAD-medium gesät. Alternativ zur Feeder-Kokultur wurde das definierte Kulturmedium *DermaLife* bei gleicher Zelldichte verwendet.

Keratinocyten wurden in Passage 2 für die Herstellung von organotypischen Kokulturen, in Passage 1 für Migrationsassays verwendet.

2.2.1.2. *Isolierung und Kultur von Fibroblasten*

Nach dem Abziehen der Epidermis für die Isolierung von Keratinocyten wurden die verbleibenden Dermisstreifen weiter in etwa 5 mal 5 mm große Stücke zerteilt. Die Dermis wurde auf Zellkulturschalen gelegt, für 30 min angetrocknet und mit DMEM mit 20% FCS (D20) überdeckt. Die Kultur von Fibroblasten erfolgte bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ und 5% O₂ (Hypoxie). Nach etwa 10 Tagen waren die aus der Dermis ausgewachsenen Fibroblasten konfluent.

Trypsiniert wurden Fibroblasten nach waschen mit EDTA-Lösung durch 3-minütige Inkubation mit 0,1% Trypsin. Die Zellen wurden zur Expansion bei einer Zelldichte von $3 \times 10^5 / \text{cm}^2$ ausgesät und in D10 kultiviert. Das Einfrieren zur Bevorratung wurde wie für Keratinocyten beschrieben durchgeführt.

Fibroblasten wurden bis Passage 12 für die Herstellung von organotypischen Kokulturen bzw. als Feederkultur verwendet.

2.2.1.3. *Herstellung von Feederkulturen*

Zur Herstellung von Feederkulturen wurden Fibroblasten wie beschrieben trypsiniert, durch einen *Cell Strainer* gegeben und in Suspension mit 55 bis 70 Gy gammabestrahlt. 5×10^5 bestrahlte Zellen wurden auf eine 15 cm Zellkulturschale mit FAD-Medium gegeben. Vor der Aussaat von Keratinocyten wurde die Feederkultur für mindestens 3 Tage inkubiert.

2.2.1.4. *Kultivierung von HaCaT-Keratinocyten*

HaCaT-Zellen wurden bei einer Zelldichte von $1,5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ausgesät, die Kultivierung erfolgte in D10 bei Normoxie. Die Zellen wurden zum Ablösen von der Kulturplatte mit 0,05% Trypsin für 8 min inkubiert.

2.2.2. *HERSTELLUNG UND VERWUNDUNG ORGANOTYPISCHER KOKULTUREN*

2.2.2.1. *Herstellung von Kollagenkulturen (colOTCs)*

Kollagengele wurden in Membraninserts mit 3 µm Porengröße gegossen, welche zuvor in *deep-well*-Platten platziert worden waren. Zunächst wurde aus Rattenschwänzen gewonnene Kollagenlösung (2 ml pro Kultur) mit HANK's Puffer (250 µl pro Kultur) gemischt. Die Lösungen wurden dabei auf Eis gelagert. Unter stetigem Rühren wurde mit NaOH bis zum Farbumschlag von gelb nach orange titriert.

Je Kultur wurden $2,5 \times 10^5$ Fibroblasten in 250 µl FCS suspendiert und zur Kollagenlösung gegeben. Je 2,5 ml wurden in ein Membraninsert pipettiert und die Platten für 1 h zum Aushärten im Brutschrank inkubiert. Auf die fest gewordenen Gele wurde je ein Glasring mit 22 mm Innendurchmesser gelegt und leicht angedrückt. Nach weiterer Inkubation im Brutschrank für 15 min wurde die aus den Gelen

2. MATERIAL UND METHODEN

ausgetretene Flüssigkeit abgesaugt und rFAD-Medium mit 50 mg / ml Ascorbinsäure zu den Kulturen gegeben. Dabei wurden 10 ml unter das Insert, sowie 4 ml in das Insert gegeben.

Am nächsten Tag wurden Keratinozyten trypsiniert und die Suspension mit rFAD-Medium auf 10^6 / ml eingestellt. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in den Glasring eines Kollagengels pipettiert.

Wiederum einen Tag später erfolgte der *lift*. Hierfür wurden mit dem Medium im Insert nicht angewachsene Keratinozyten abgesaugt, der Glasring vorsichtig entfernt und das Medium unter dem Insert gewechselt.

2.2.2.2. Herstellung von scaffold-Kulturen (*scaOTCs*)

Aus dem *scaffold*-Material (Sunsorb bzw. M3) wurden kreisrunde Stücke mit einem Durchmesser von 22 mm ausgestanzt. Die *scaffolds* wurden zwischen Objektträger eingebettet autoklaviert. Die sterilen *scaffolds* wurden in Membraninserts (0,4 μ m, *high pore density*) gelegt, welche zuvor in 6-*well*-Platten platziert worden waren.

Pro dermale Äquivalent (DE) wurden $7,5 \times 10^5$ Fibroblasten in 375 μ l FCS suspendiert und mit 375 μ l Thrombin S vermischt um Lösung 1 herzustellen. Für Lösung 2 wurden 375 μ l Fibrinogenlösung mit 375 μ l PBS⁺ verdünnt. 750 μ l Lösung 1 wurden mit einer Kolbenhubpipette so über das *scaffold* verteilt, dass dieses vollständig bedeckt war. Dann wurden 750 μ l Lösung 2 zugegeben und die Lösungen durch kreuzweises schütteln der Platte gemischt.

Zur Polymerisation des Fibrins wurden die Platten für 30 min im Brutschrank inkubiert. Zu den DEs wurden jeweils 2 ml Vorkulturmedium in bzw. unter das Membraninsert gegeben. Das Medium wurde am nächsten Tag sowie alle 2-3 Tage gewechselt. Die Vorkultur dauerte 4-7 Tage.

Mindestens 6 h vor der Aussaat der Keratinozyten wurden die DEs auf rFAD-Medium mit 500 U / ml Aprotinin gewechselt (*shift*) und Glasringe mit einem Innendurchmesser von 22 mm aufgesetzt. Die Keratinozytensuspension wurde auf eine Zellzahl von 10^6 / ml eingestellt und je DE 1 ml in den Glasring gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, die Glasringe entfernt und die Membraninserts mit den *colOTCs* in *deep-well*-Platten transferiert. 10 ml rFAD-Medium mit 250 U / ml Aprotinin wurden unter die Inserts gegeben um die *colOTCs* bis zur weiteren Verwendung luftexponiert zu kultivieren (*lift*). Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

2.2.2.3. Herstellung von CDM-Kulturen

Zur Herstellung von organotypischen Kulturen auf Basis einer *cell-derived matrix* (zelleigene Matrix, CDM) wurden Fibroblasten dreischichtig ausgesät. Jeweils 2×10^6 Fibroblasten wurden im Abstand von 3 Tagen in ein Membraninsert (0,4 μ m, *high pore density*) gesät, welche in 6er *deep-well*-Platten platziert worden waren. Die Zellen wurden mit CDM-Medium submers und unter Normoxie kultiviert. Die Vorkulturdauer vor Aussaat der Keratinozyten betrug 4 Wochen.

Einen Tag vor Aussaat der Keratinozyten wurde das Medium auf rFAD gewechselt, wobei dieses Kultursystem keine Zugabe von Aprotinin erfordert. Jeweils 10^6 Keratinozyten wurden auf eine Matrix gesät. Am nächsten Tag erfolgte der *lift* durch absaugen des kompletten Mediums und Zugabe von Medium lediglich unter das Membraninsert.

Während der gesamten Kulturdauer wurde das entsprechende Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.2.2.4. *Verwundung von OTCs*

Für Wundheilungsexperimente wurden je nach Ziel des Experiments 2-8 Wochen alte, d.h. für 2-8 Wochen nach *lift* kultivierte, scaOTCs oder cdmOTCs verwendet. Als Unterlage und Wundbett dienten für 4-7 Tage vorkultivierte DEs bzw. CDMs.

Eine OTC wurde mit einer Dumont-Pinzette aus dem Membraninsert gehoben und auf eine Zellkulturschale gelegt, welche als Schnittunterlage diente. Mit Hilfe zweier aneinander gehaltener Einwegskalpelle wurde ein etwa 5 mm breiter Streifen mittig aus der OTC ausgeschnitten. Die verbliebenen halbkreisförmigen Stücke wurden auf die angetrocknete Oberfläche eines DE gelegt. Die gleichmäßige Breite der Wunde wurde durch einen Platzhalter aus Edelstahl mit einer Breite von 5 mm gewährleistet, der für die Dauer des Platzierens und Ausrichtens der verwundeten Kultur in das Wundbett gelegt wurde. Unverwundete Kontrollen wurden ebenfalls aus dem Membraninsert genommen und auf ein neues DE überführt.

Nach erfolgter Verwundung wurde optional ein Fibrinpfropf in die Wunde eingebracht. Hierfür wurden 500 µl Fibrinogenlösung mit 500 µl PBS⁺, sowie 500 µl FCS mit 500 µl Thrombin S-Lösung in jeweils eine Spritze des *Duploject*-Systems aufgezogen. Durch die Mischvorrichtung des *Duploject* wurden 4-5 Tropfen Fibrin in die Wunde getropft.

Immunmodulatorische Agenzien zur Behandlung des Wundmodells wurden direkt nach der Verwundung in einem Volumen von 100 µl mit einer Kolbenhubpipette auf die Wundfläche getropft (TLR-Liganden) oder direkt in das Kulturmedium gegeben (chemische Inhibitoren). Die Behandlung wurde alle 24 h wiederholt.

2.2.3. *PROZESSIERUNG VON ORGANOTYPISCHEN KULTUREN*

2.2.3.1. *Gewinnung und Behandlung von histologischen Schnitten*

Nach dem Entfernen der OTCs aus dem Membraninsert wurden die OTCs halbiert und eine Hälfte über Nacht in gepufferter Formaldehydlösung fixiert. Auf das Fixieren folgte das Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe durch aufeinander folgende Inkubationen in 70%, 80%, 90%, 96% und 100% Ethanol, sowie in Xylol. Die entwässerten Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet.

Die so gewonnenen Paraffinblöckchen wurden auf Eis gekühlt und zum Schneiden in ein Schlittenmikrotom eingespannt. Es wurden Schnitte mit 5 µm Stärke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

Vor der Anwendung von Färbetechniken wurden die histologischen Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Hierfür wurden die Objektträger mit den Schnitten mit einer absteigenden Alkoholreihe behandelt. Je zweimal wurde für 2 min in Xylol und 100% Ethanol, je einmal in 96%, 90%, 80% und 70% Ethanol inkubiert, sowie abschließend in destilliertem Wasser.

Für indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die Schnitte nach dem Rehydrieren für 20-30 min bei 98°C mit Citratpuffer oder Trispuffer behandelt und bei RT für weitere 20 min im Puffer abgekühlt. Diese sogenannte Epitopdemaskierung dient dazu, Antigene für die Primärantikörper besser zugänglich zu machen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.2.3.2. Gewinnung und Fixierung von Gefrierschnitten

Die verbliebene Hälfte der OTCs wurde in einem *cryomold* mit dem Einbettmittel *TissuTek* rundum bedeckt und über flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die gefrorenen Blöckchen wurden vollständig in Stickstoff getaucht und anschließend bei -80°C gelagert.

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die Blöckchen aus dem *cryomold* entfernt, in der Kammer eines Kryomikrotoms temperiert und auf den Probenhalter aufgefroren. Es wurden Schnitte einer Stärke von 6-8 µm angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

Je nach vorgesehener Färbung wurden Gefrierschnitte unterschiedlich fixiert. Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurde meist für 5 min in 80% Methanol bei 4°C und anschließend für 2 min in 100% Aceton bei -20°C fixiert.

2.2.3.3. Isolierung von RNA aus verwundeten scaOTCs

Aus verwundeten scaOTCs wurde zu verschiedenen Zeitpunkten zunächst der Wundbereich unter Einbeziehung eines etwa 1 mm breiten wundnahen Bereichs ausgeschnitten. Dann wurde das Epithel mit Dumont-Pinzetten mechanisch vom dermalen Anteil der Kultur abgezogen. Beide Teile wurden in je ein Schraubdeckelröhrchen mit 1 ml Trizol gegeben, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut. Das Gewebe wurde mit einer Gewebemühle (*FastPrep*) zerkleinert (2 x 30 s, Stufe 6) und die Gewebetrümmer bei 13.000 g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen übertragen, auf RT gebracht, mit 200 µl Chloroform versetzt und gründlich verschüttelt. Nach 3 min Inkubation wurde für 15 min bei 4°C zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die verbliebene Phase wurde bei -80°C gelagert.

Die RNA wurde aus je 600 µl der wässrigen Phase durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und 10 min Inkubation bei RT gefällt. Nach 10 min Zentrifugieren bei 4°C, waschen mit 75% Ethanol und erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet luftgetrocknet und anschließend in 40 µl RNase-freiem Wasser gelöst. RNA-Konzentration und -reinheit wurden photometrisch mit dem *NanoDrop* gemessen, die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.4. HISTOLOGISCHE ANALYSEN

2.2.4.1. Histologische Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) dient als Übersichtsfärbung dem Erkennen morphologischer Besonderheiten der unterschiedlichen Gewebeproben. Diese Technik wurde an entparaffinierten und rehydrierten histologischen Paraffinschnitten durchgeführt.

Die Schnitte wurden nach Angaben des Herstellers der Färbelösungen gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit Eukitt unter einem Deckglas eingebettet.

2.2.4.2. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

Die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung (IIF) dient der spezifischen Visualisierung von Proteinen und Markermolekülen. Dies geschieht durch einen für das Antigen spezifischen primären Antikörper (Erstantikörper), welcher zunächst das Antigen bindet. In einem zweiten Schritt wird ein sekundärer

2. MATERIAL UND METHODEN

oder Zweitantikörper, welcher an Fluorochrome gekoppelt und für den jeweiligen Erstantikörper spezifisch ist.

Die fixierten bzw. demaskierten Schnitte wurden mit einem Lackstift (PapPen) eingekreist, um die Kontaktfläche der Antikörperlösungen zu begrenzen und unterschiedliche Färbungen auf einem Objektträger vornehmen zu können. Alternativ wurde für zu quantifizierende Färbungen ein Deckglas aufgelegt, welches die verwendeten Lösungen gleichmäßig per Adhäsion über den ganzen Objektträger verteilte.

Die Antikörper wurden in - auch als Blockierlösung verwendetem - 5% BSA in PBS verdünnt. Die Blockierung erfolgte für 15-30 min mit 5% BSA in PBS. Die Erstantikörper wurden typischerweise für 1 h bei 37°C, anschließend nochmals für 1h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden in einer abgedunkelten Feuchtekammer durchgeführt. Die Zweitantikörper verblieben meist für 15-30 min bei 37°C, sowie nochmals für 15-30 min bei RT auf dem Präparat. Zur Lösung mit den Zweitantikörpern wurde zur Gegenfärbung der Zellkerne DAPI in einer Endkonzentration von 10 µg / ml gegeben. Nach den Inkubationsschritten erfolgten jeweils ein Waschschrítte á 5 min in PBS mit 0,05% Triton X-100 und zwei Waschschrítte mit reinem PBS. Die gefärbten Schnitte wurden mit Einbettmittel und Deckglas versiegelt, bei RT getrocknet und bei 4°C gelagert.

Die Färbung von Iodo-desoxy-uridin (IdU) erforderte vor der Behandlung mit dem Erstantikörper eine 3-5-minütige Behandlung mit 2 N HCl und ein anschließendes kurzes Waschen. Dieser Vorgang dient der Denaturierung der DNA, wodurch das Jodatom des IdU für den Antikörper zugänglich wird.

2.2.5. BIOCHEMISCHE ANALYSEN

2.2.5.1. Microarray

Für die Expressionsanalyse wurden je Probe 800-1000 ng RNA an die *Genomics and Proteomics Core Facility* des DKFZ übergeben. Die Analyse wurde dort auf einem *Illumina BeadChip® HumanHT-12 v4*-Array durchgeführt.

2.2.6. BILDANALYSEN

2.2.6.1. Quantifizierung von Proliferation und Stammzellen in scaOTCs

Mikroskopische Bilder von IIF-gefärbten Präparaten dienen zur Quantifizierung. Potenzielle epidermale Stammzellen wurden gegen IdU gefärbt. Als Proliferationsmarker diente Ki67. Durch manuelles Zählen mit der Zählfunktion von *Photoshop* wurden alle Basalen Keratinozyten anhand der DAPI-Färbung gezählt, sowie die IdU- und Ki67-positiven Basalzellen. In verwundeten Kulturen wurden die Zellzahlen für den Wundbereich, einen wundnahen Bereich (bis 1370 µm vom Wundrand) und einen wundfernen, durch die Verwundung weitgehend unbeeinflussten Bereich (1370- 4110 µm vom Wundrand) separat erhoben (Abbildung 13).

2.2.6.2. Mikroskopische Quantifizierung der Epithelialisierung

Digitale mikroskopische Aufnahmen von H&E-gefärbten histologischen Schnitten verwundeter scaOTCS wurden, soweit erforderlich, mithilfe der *Photomerge > Repositionieren*-Funktion von *Photoshop* zusammengesetzt. Die Migrationsstrecke wurde vom Wundrand bis zur Spitze der Epithelzunge in *ImageJ* markiert und die Länge der markierten Linie mit der *measure*-Funktion ermittelt (vgl. Abbildung 3A).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.2.6.3. Makroskopische Quantifizierung der Epithelialisierung

Verwundete Kulturen wurden aus identischem Winkel und Abstand fotografiert. Mit *ImageJ* wurde eine 500 Pixel lange Strecke mittig am Wundrand markiert und die epithelialisierte Fläche senkrecht zur Strecke markiert. Der Flächeninhalt wurde mit der *measure*-Funktion bestimmt. Um eine Verfälschung der Messung durch Randeffekte zu vermeiden wurde lediglich der zentrale Bereich der Wunde vermessen (vgl. Abbildung 3B).

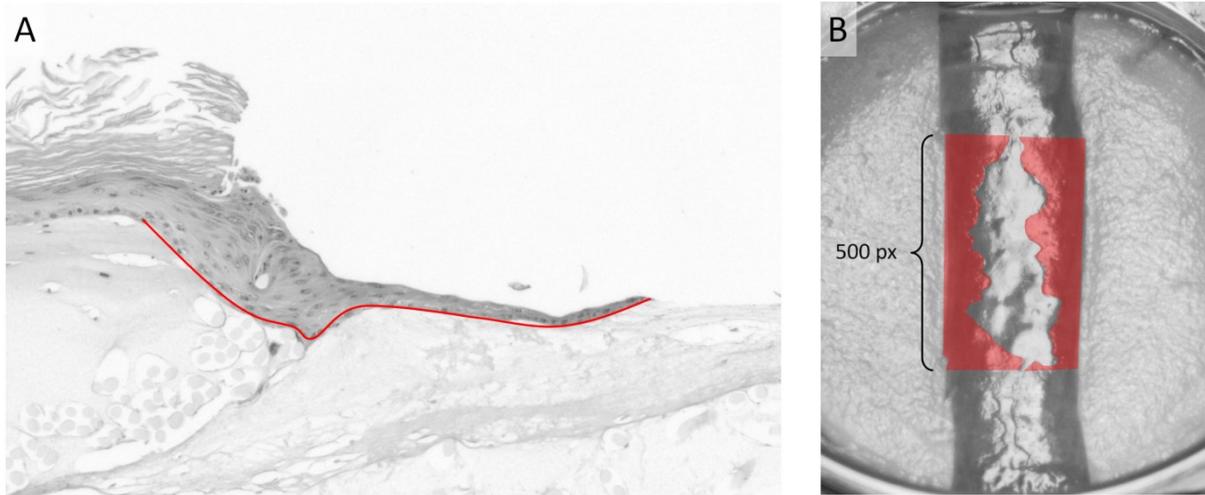


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Quantifizierung der Wundheilung

A: Mikroskopische Vermessung anhand H&E-gefärbter histologischer Schnitte, gemessen wurde die Ausdehnung der Epithelzunge entlang des DE (rote Linie). **B:** Makroskopische Vermessung der epithelialisierten Fläche (rot markiert).

3. ERGEBNISSE

3.1. ETABLIERUNG DES WUNDMODELLS

3.1.1. WUNDMODELL AUF BASIS VON COLOTCS

Für die Etablierung und Optimierung der Vorgehensweise zur Verwundung von organotypischen Kulturen wurde anfangs auf ein kollagenbasiertes Hautmodell, die sogenannte colOTC (*collagen organotypic co-culture*) zurückgegriffen. ColOTCs wurden bereits seit längerem erfolgreich als Wundmodell eingesetzt (Garlick & Taichman 1994; Safferling et al. 2013). Daher sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob dieses Modell reproduziert werden kann, um spätere Optimierungen und Adaptionen vornehmen zu können.

3.1.1.1. Verwundung von Kollagenkulturen

Um die Ausbeute an analysierbarem Material zu erhöhen, wurde im Gegensatz zu einer kreisförmigen Wunde wie im Wundmodell von Garlick und Taichman eine längliche, spaltförmige Wunde angestrebt.

Zur Erzeugung der Wunde wurden die Kulturen mit einem Skalpell vollständig durchtrennt. Hierfür mussten diese aus dem Membraneinsatz gelöst werden. Durch die sehr weiche Konsistenz der Kollagenmatrix war die Handhabung der Kulturen erschwert, was eine reproduzierbare Durchführung von Experimenten in größerem Umfang unmöglich machte.

Um die nötige Manipulation der colOTCs zu minimieren und damit die Reproduzierbarkeit zu erhöhen, wurde vor der Aussaat der Keratinozyten ein Edelstahlstäbchen als Barriere auf die Matrix gelegt. Dies sollte die spätere Wundfläche epithelfrei halten und nach der Entfernung des Stäbchens eine zellfreie Oberfläche als Wundbett freigeben und so die Migration der Keratinozyten ermöglichen. Allerdings wurden die Stäbchen, vermutlich aufgrund mangelnder Adhäsion zwischen Edelstahl und Kollagen teilweise von Keratinozyten unterwandert, so dass kein definierter Wundrand entstehen konnte.

In einem ersten Versuch zur Stabilisierung der Kulturen wurde daraufhin *Whatman*-Filterpapier in die Kollagenmatrix eingegossen. Dies erleichterte zwar die Handhabung, jedoch war die Reepithelialisierung erheblich beeinträchtigt (vgl. Abbildung 4). Die prinzipielle Eignung der colOTCs als Wundmodell unter den etablierten Kulturbedingungen wurde getestet, indem der als promigratorisch bekannte epidermale Wachstumsfaktor (EGF, (Chen et al. 1993)) in einer Konzentration von 10 ng/ml zum rFAD-Medium zugegeben wurde. Für dieses Experiment wurden colOTCs mit integriertem Filterpapier mittig durchtrennt, die Hälften jeweils in einen eigenen Membraneinsatz transferiert und die freie Membranfläche mit fibroblastenhaltigem Kollagen bedeckt. Hierbei wuchsen in den Ansätzen mit EGF-Zusatz eine Woche nach Verwundung Epithelzellen vom Wundrand auf die freie Kollagenoberfläche (Abbildung 4).

3. ERGEBNISSE

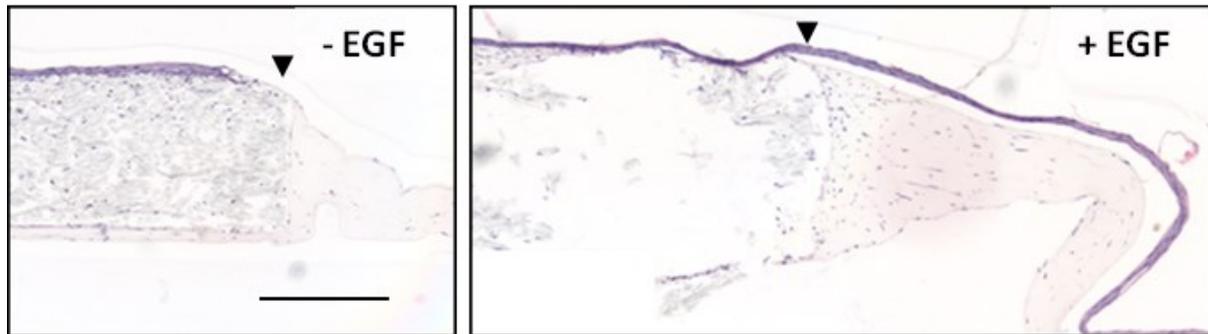


Abbildung 4: Wundheilung in stabilisierten colOTCs

Mit rFAD-Medium konnte keine Reepithelialisierung erfolgen. Zugabe von 10 ng/ml EGF führte zum Auswachsen einer Epithelzunge auf die freie Kollagenfläche. Zeitpunkt 8 Tage nach Verwundung (Pfeilspitzen markieren den Wundrand; Messbalken 500 µm).

Die Adaption eines reproduzierbaren Wundmodells auf Basis von colOTCs konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Dies war sowohl in technischen, als auch in biologisch-funktionalen Problemen begründet.

3.1.2. WUNDMODELL AUF BASIS VON scaOTCs

Nach der nicht zielführenden Adaption des kollagenbasierten Wundmodells wurde erwartet, dass scaOTCs aufgrund der intrinsisch höheren mechanischen Stabilität die vorhandenen Anforderungen an das Wundmodell erfüllen könnten.

Die Verwendung von scaOTCs brachte deutliche Verbesserungen gegenüber Kollagenkulturen bereits bei der Handhabung. Die Hautäquivalente (SEs) konnten mit einer Pinzette aus dem Membraneinsatz genommen werden und waren stabil genug, um weitere Manipulationen schadlos zu überstehen.

Die Reepithelialisierung der etwa 5mm breiten spaltförmigen Wundfläche (siehe 2.2.2.4) erfolgte innerhalb von drei Tagen. Der Verlauf war zwischen biologischen Replikaten, sowie mit unterschiedlichen Medien vergleichbar (Abbildung 5) Dabei betrug die Vorkulturdauer eine Woche (Abbildung 5C, D), bzw. zwei Wochen (Abbildung 5A, B).

Während der Reepithelialisierung wurde die Wundfläche, ausgehend vom Wundrand, von einem zwei bis fünf Zellschichten starken Epithel bedeckt. Das neugebildete Epithel verdickte sich nach Wundschluss weiter. Durch terminale Differenzierung bildete sich eine Hornschicht, analog zu den Prozessen bei der Herstellung der OTCs, die wiederum die natürliche Morphogenese widerspiegeln.

Somit kann das Modell auf Basis von scaOTCs reproduzierbar die vollständige Reepithelialisierung bis zur Ausbildung eines neuen *Stratum corneum* darstellen. Dabei können Wundsetzung, ebenso wie die Wundheilung aufgrund der hervorragenden Eigenschaften des zugrunde liegenden Hautmodells sehr einfach und reproduzierbar erfolgen.

3. ERGEBNISSE

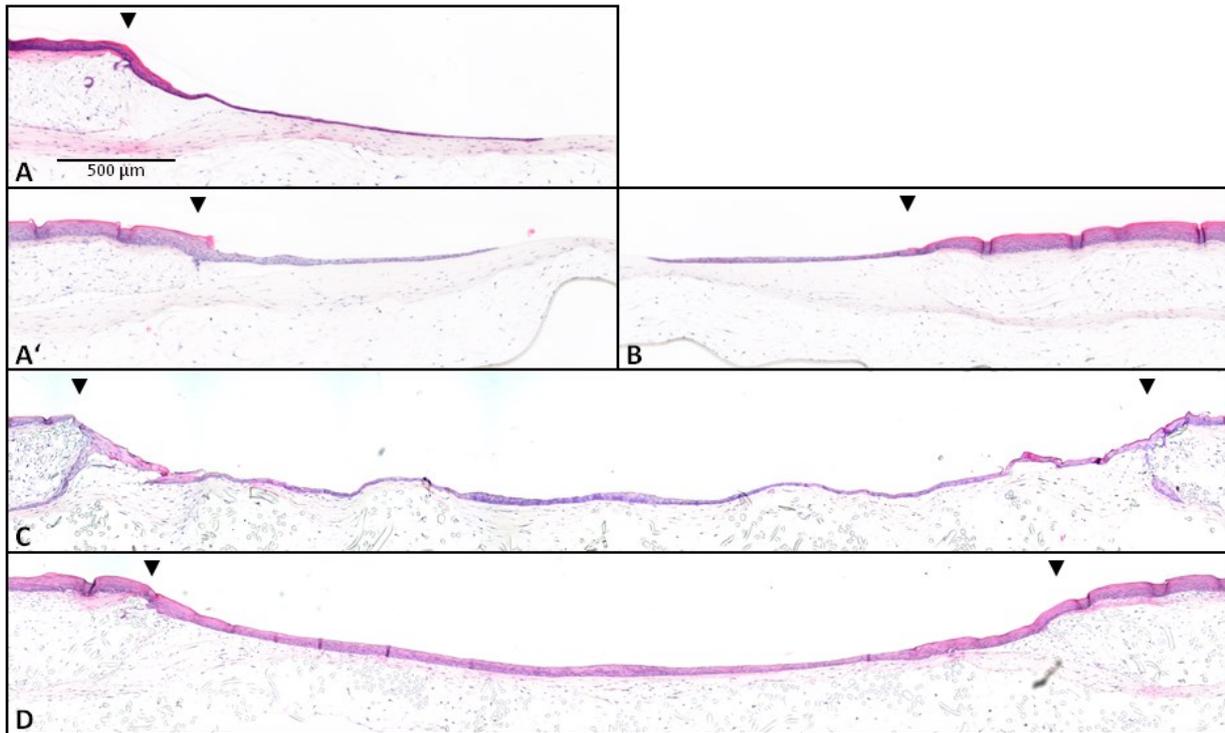


Abbildung 5: H&E-Färbung histologischer Schnitte verwundeter scaOTCs

Die SEs wurden mit rFAD- (A, A', C) bzw. MatTek-Medium (B, D) kultiviert. Gezeigt sind die Zeitpunkte 48 h (A, A', B) und 90 h (C, D) nach Verwundung. Die Wundheilung ist zwischen Duplikaten (A, A') sowie zwischen den verwendeten Medien vergleichbar. Der Wundschluss erfolgte nach etwa drei Tagen. Die Pfeilspitzen markieren den Wundrand.

3.1.3. ZELLEIGENE MATRIX ALS BASIS FÜR DAS WUNDMODELL

Cell-derived matrix (CDM, von Zellen gebildete Matrix) aus Fibroblasten kann als dermaler Anteil bei der Herstellung von Hautäquivalenten genutzt werden. Dabei werden Fibroblasten überkonfluent ausgesät und mit Faktoren kultiviert, welche die Bildung extrazellulärer Matrixbestandteile fördern. Diese Methode wurde kürzlich bedeutend verbessert (Berning et al. 2015), insbesondere in Bezug auf die Matrixdicke. Von Vorteil bei dieser Methode ist das Fehlen exogener Matrixbestandteile wie Fibrin oder Kollagen, welche u. a. die Wundheilung stark beeinflussen können. Die Verwendung von artifiziellen Gerüstfasern ist dabei nicht nötig.

Für die Verwundung wurden die Kulturen für 5 Wochen mit Keratinozyten vorkultiviert, so dass sich ein reifes Epithel entwickeln konnte. Durch das verhornte Epithel waren die Kulturen für die Handhabung bei der Verwundung ausreichend stabilisiert. Die Kulturen wurden analog zu scaOTCs verwundet. Nach 3 Tagen war eine ausgeprägte Epithelzunge auf dem ebenfalls von einer basalen CDM-Lage gebildeten Wundbett vorhanden. Nach 3 Wochen lag hier ein deutlich hyperplastisches Epithel vor. Mittig in diesem Wundepithel war ein Bereich parakeratotischer Differenzierung vorhanden, darüber lagen von normal differenzierten Hornschuppen (Abbildung 6), was andeutet, dass nach der anfänglichen Hyperplasie eine regelrechte terminale Differenzierung noch nicht vollständig erreicht war.

Demnach können auch cdmOTCs für die Untersuchung der Wundheilung nach dem in dieser Arbeit etablierten Modell gleichwertig zu scaOTCs verwendet werden.

3. ERGEBNISSE

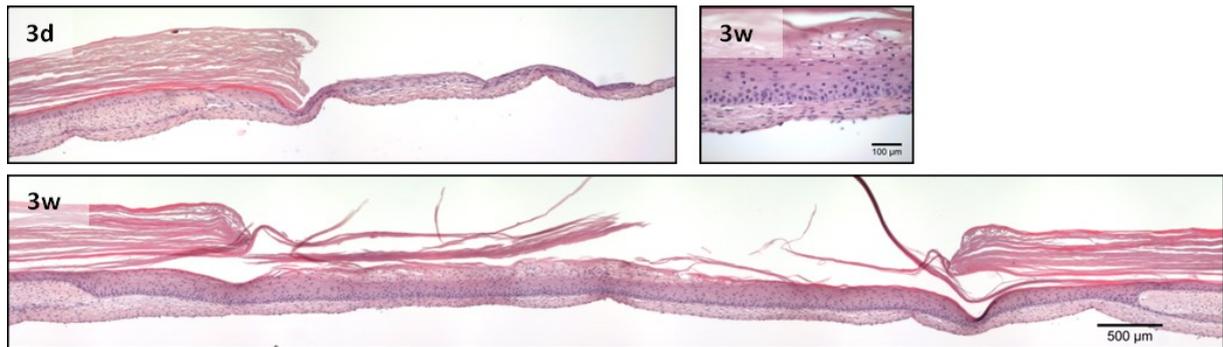


Abbildung 6: Wundheilung in cdmOTCs

3 Tage nach Verwundung erstreckt sich die Epithelzunge in das Wundbett. Nach 3 Wochen ist ein stark verdicktes, hyperplastisches Epithel ausgebildet. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt parakeratotische Differenzierung in der Mitte des Wundepithels.

3.2. CHARAKTERISIERUNG DES WUNDMODELLS

3.2.1. DIFFERENZIERUNGSMARKER

Die Expression von Differenzierungsmarkern ist ein wichtiges Merkmal zur Charakterisierung von Geweben. Anhand der Differenzierungsmarker kann eine erste Aussage über die Ähnlichkeit des Modells mit der Situation *in vivo*, und damit über die physiologische Relevanz des Modells getroffen werden. Der erste Schritt der Charakterisierung des Wundmodells war daher - abgesehen von der Beurteilung der Morphologie anhand H&E-Färbungen - die Immunfluoreszenzfärbung von histologischen Schnitten formaldehydfixierter Kulturen und Kryostatschnitten. Als Differenzierungsmarker wurden solche Proteine gewählt, die in distinkten Gewebeschichten zu finden sind und damit Aufschluss über den Differenzierungsstatus der Zellen bzw. die Reife der extrazellulären Matrix geben.

Keratin 10 (K10) und Involucrin sind Marker für die frühe Differenzierung von Keratinozyten. Sie sind gewöhnlich nur in suprabasalen Schichten der Epidermis vorhanden. In der naszierenden Epithelzunge wurde Involucrin früher als K10 exprimiert, eine Koexpression war 4 Tage nach Verwundung auf die mehrschichtigen Bereiche des Epithels begrenzt (Abbildung 7A). 14 Tage nach Verwundung war das Wundepithel vergleichbar dem Epithel vor Verwundung geschichtet: über der nur K10-positiven suprabasalen Schicht wurde Involucrin zum *Stratum corneum* hin stärker exprimiert.

Während sich einen Tag nach der Verwundung Involucrin- und K10-positive Zellschichten in Richtung Wundbett bewegten, blieben Filaggrin exprimierende Schichten am *Stratum corneum* immobilisiert (Abbildung 7B). Während der migratorischen Phase konnte kein Filaggrin im Wundbereich nachgewiesen werden, erst nach 14 Tagen war es in den obersten Zellen des Wundepithels nachweisbar. Dies bedeutet, dass die Zellen des *Stratum granulosum* aufgrund ihrer starken Verankerung im Gewebe nicht mehr mobilisiert werden können.

Tenascin-C ist ein Bestandteil provisorischer extrazellulärer Matrix *in vivo*, ist jedoch in organotypischen Kulturen dauerhaft vorhanden (Midwood et al. 2004; Boehnke 2008). Es akkumulierte ab 4 Tage nach Verwundung, vom Wundrand beginnend, verstärkt in der Basallamina. Nach 14 Tagen zeigte die Basallamina eine durchgehende Tenascin-C-Färbung (Abbildung 7B).

3. ERGEBNISSE

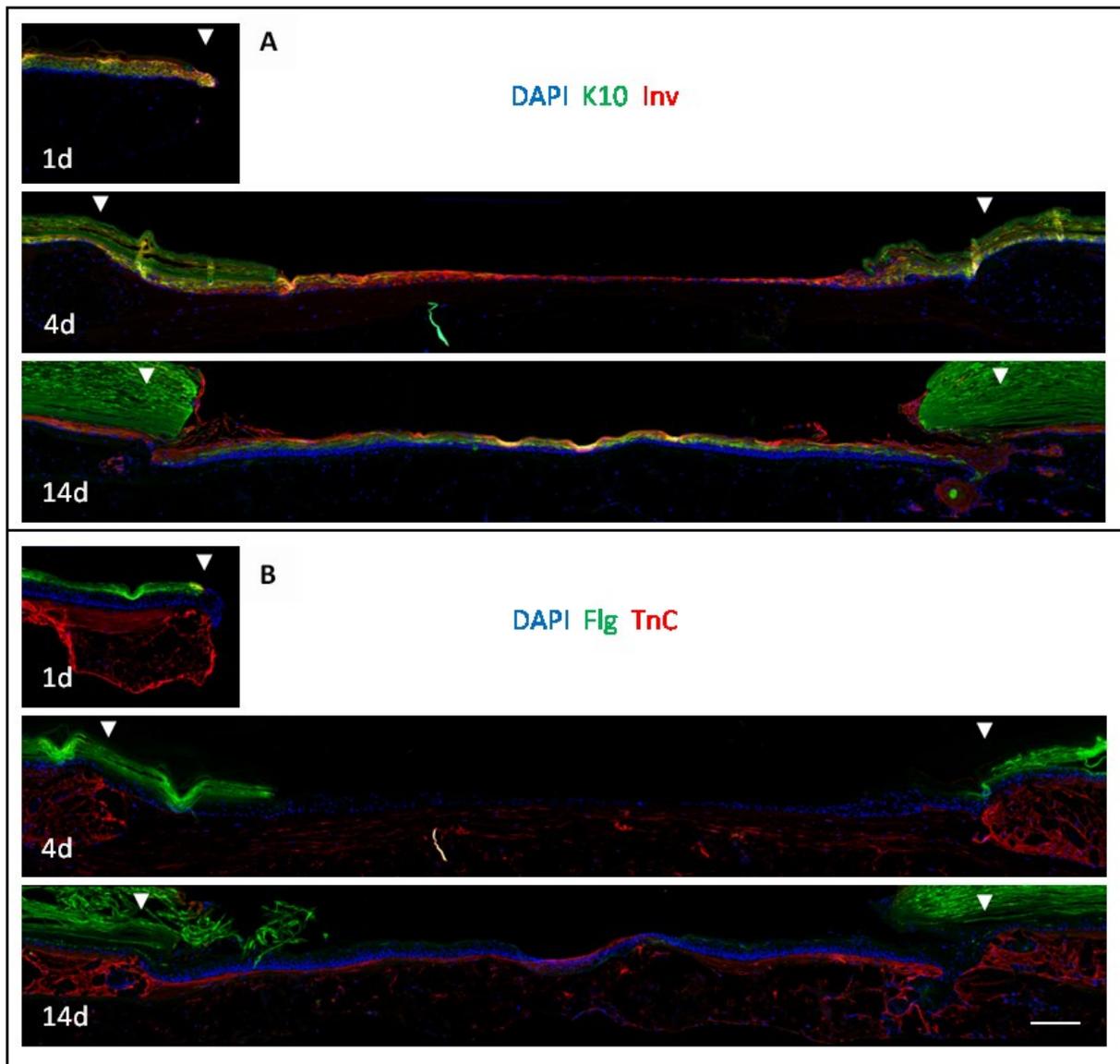


Abbildung 7: Expression von Differenzierungsmarkern im zeitlichen Verlauf

Involucrin wurde nach Verwundung in der noch dünnen naszierenden Epithelzunge exprimiert (A, 4d), Keratin 10 war zu diesem Zeitpunkt erst in den mehrschichtigen Bereichen nachweisbar. Filaggrin blieb auf den Bereich des intakten Epithels beschränkt und war erst 14 Tage n.V. in den obersten Zellschichten des Wundepithels vorhanden (B). Tenascin C begann vom Wundrand aus in der Basallamina des Wundbereichs zu akkumulieren (B, 4d) und war nach 14 Tagen durchgehend nachweisbar. Balken 200 μm .

3.2.2. WUNDHEILUNGSMARKER

Gut etablierte Wundheilungsmarker sind Strukturproteine wie Keratin 17 und Vimentin. Diese werden nach Verwundung verstärkt exprimiert. Zur Beurteilung der physiologischen Relevanz des Wundheilungsmodells wurde überprüft, inwieweit diese bekannten Regulationen im Modell reproduzierbar sind.

Keratin 17 war 2 Tage nach Verwundung am Wundrand, sowie schwächer werdend in Richtung des intakten Epithels, detektierbar (Abbildung 8A). Insbesondere waren alle Zellschichten des naszierenden Epithels K17-positiv. 13 Tage nach Verwundung war das Wundepithel weitgehend K17-negativ (Abbildung 8B). Lediglich in einem Bereich am Wundrand war K17 weiterhin nachweisbar.

3. ERGEBNISSE

Diese Befunde entsprechen weitestgehend Erkenntnissen aus Experimenten *in vivo* (Paladini et al. 1996).

Vimentin wird als typischer Marker mesenchymaler Zellen in der homöostatischen Haut ausschließlich dermal exprimiert. Unter Wundheilungsbedingungen kann Vimentin von Keratinozyten gebildet werden (Yan et al. 2010). Es wurde zwei Tage nach Verwundung Wundnahe von Keratinozyten exprimiert. Anders als K17 war Vimentin jedoch nur in Zellen der Basalschicht nachweisbar (Abbildung 8C). Die Expression blieb eng auf die wachsende Epithelzunge begrenzt. Fünf Tage nach Verwundung war Vimentin in mehrschichtigen Bereichen des Wundepithels nicht mehr nachweisbar. Der zentrale, einschichtige Bereich des Epithels war Vimentin-positiv (Abbildung 8D, D'). Die intensive Vimentinfärbung der Fibroblasten im dermalen Teil des Hautmodells bleibt dagegen permanent vorhanden.

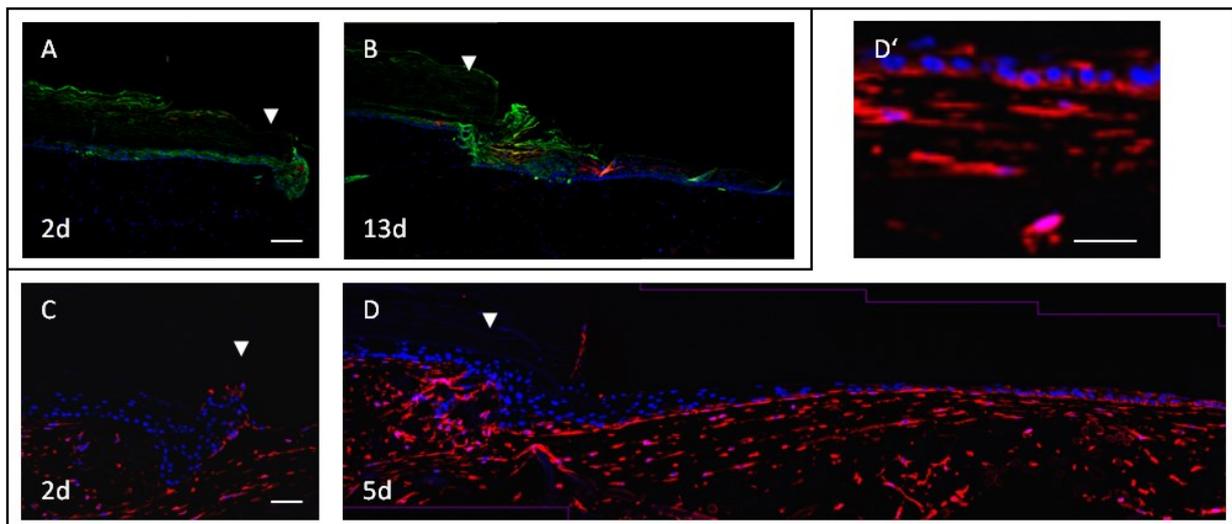


Abbildung 8: Intermediärfilamente als Wundheilungsmarker

Keratin 17 wird in der Epithelzunge und im wundnahen Epithel exprimiert (A). Die Expression ist transient und nimmt nach Wundschluss wieder ab (B, Balken 100µm). Ebenso wird Vimentin nach Verwundung *de novo* gebildet, die Expression ist im Vergleich zu K17 stärker lateral begrenzt (C, D, Balken 50µm) und nur basal vorhanden (D', Balken 25µm).

3.2.3. WUNDHEILUNGSKINETIK

Zur Bestimmung der Kinetik der Reepithelialisierung wurde eine Zeitreihe erstellt. Dafür wurden pro Zeitpunkt zwei Kulturen verwundet und nach 8, 12, 16, 20, 24, 48 und 72 Stunden geerntet. Durch Vermessung von Mikroskopaufnahmen HE-gefärbter histologischer Schnitte wurde die Distanz der migrierenden Epithelzunge vom Wundrand bestimmt (Abbildung 9).

Das Epithel bildete in den ersten 16 h nach Verwundung eine Vorwölbung vom Wundrand in Richtung Wundfläche. Bereits nach 8 h war eine Bewegung von *Stratum basale* und *Stratum spinosum* erkennbar, das *Stratum granulosum* blieb mit dem *Stratum corneum* zurück. Nach 20h war die Morphologie der Epithelzunge spitzer, nach 24 h war die Epithelzunge vorn auf wenige Zellschichten ausgedünnt und gestreckter.

3. ERGEBNISSE

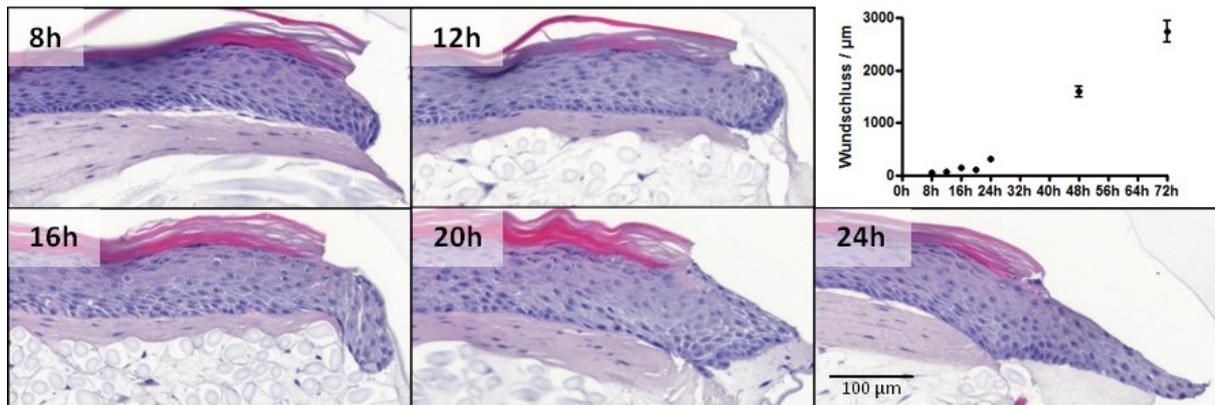


Abbildung 9: Wundschlusskinetik

H&E-Färbungen histologischer Schnitte der frühen Phase der Reepithelialisierung von 8-24 h nach Verwundung; Diagramm der Wundschlusskinetik. Nach Verwundung entstand zunächst eine abgerundete Ausbuchtung des Epithels, ab 20 h n.V. wurde die Epithelzunge spitzer. Zeitgleich war ein Anstieg der Wundheilungsrate auf ein konstantes Niveau ab etwa 20 h n.V. zu beobachten.

Die graphische Darstellung der Wundheilungskinetik zeigt bis 20 h einen flachen Verlauf, also eine niedrige Wundheilungsrate. Ab 20 h wird der Verlauf steiler und besitzt bis zum Wundschluss nach 72 h eine konstante Steigung und damit eine konstante Wundschlussrate von etwa 1,2 mm pro Tag. Bezogen auf den gesamten Zeitraum nach Verwundung ergibt sich eine Wundheilungsrate von etwa 0,9 mm pro Tag.

3.3. FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN AM WUNDMODELL

3.3.1. SERUMGEHALT DES MEDIUMS BEDINGT WUNDHEILUNGSKINETIK

Die in diesem *in vitro*-Modell ermittelte Wundheilungsrate lag mit 1,2 mm pro Tag deutlich über dem physiologischen Literaturwert von 0,5 mm pro Tag (Laplante et al. 2001). Um zu klären, ob diese hohe Wundheilungsrate durch die Supplementation des Kulturmedium mit Serum und den darin enthaltenen Faktoren begründet ist, wurden Versuche mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen durchgeführt. Hierbei wurde die Wundheilung zwei Tage nach Verwundung bei Serumkonzentrationen von 0%, 2%, 5% und 10% gemessen. Eine statistisch signifikante Änderung der Reepithelialisierung wurde (Abbildung 10A) ohne Serumzusatz festgestellt. Hier war die Wundheilungsrate gegenüber dem Standardmedium mit 10% FCS um 57% reduziert.

Um der Frage nach der Lebensdauer von scaOTCs unter serumfreien Bedingungen nachzugehen, wurden scaOTCs für 2 Wochen mit 10% Serum vorkultiviert und anschließend serumfrei kultiviert. Nach 6 Tagen war die Epitheldicke in den serumfrei gehaltenen OTCs gegenüber den Kontroll-OTCs mit 10% Serum deutlich reduziert (Abbildung 10C und D). Nach 12 Tagen war das Epithel ohne FCS-Supplementation schließlich atrophisch und parakeratotisch differenziert, während OTCs mit Standardmedium die zu erwartende Morphologie zeigten (Abbildung 10E und F).

Signifikant unterschieden sich die Proliferationsraten in Abhängigkeit von der Serumkonzentration. Nach 12 Tagen ohne Serum waren weniger als 10% der Basalzellen für den Proliferationsmarker Ki67 positiv, mit 10% Serum waren es 34% (Abbildung 10B).

3. ERGEBNISSE

Die Lebensdauer der OTCs ist ohne FCS ausreichend für die Beobachtung der akuten Phase der Reepithelialisierung. Jedoch zeigt die auftretende Atrophie einen drastischen Verlust der Regenerationsfähigkeit auf, sodass unter diesen Bedingungen eine Langzeitkultur nicht möglich ist.

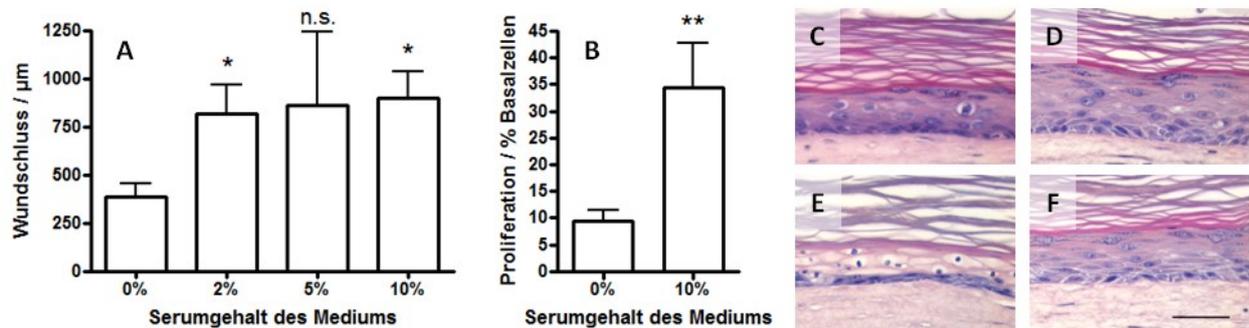


Abbildung 10: Auswirkung des Serumgehalts des Kulturmediums auf Wundheilung und Proliferation

A: Reepithelialisierung 2 Tage nach Verwundung in Abhängigkeit vom Serumgehalt des Mediums. Unterschiede waren signifikant gegenüber 0% Serumgehalt. Hungermedium halbierte die Wundheilungsrate gegenüber Medien mit Serum (* $p < 0,05$, t-Test). **B:** Anteil Ki67-positiver Zellen an den Basalzellen 12 Tage nach Medienaustausch. Hungermedium verursachte eine deutliche Abnahme der Proliferation ($p < 0,01$, t-Test). Nach 6 Tagen war das Epithel ohne FCS (C) gegenüber 10% FCS deutlich (D) ausgedünnt, nach 12 Tagen ohne FCS deutlich atrophisch (E gegenüber F). (Balken 100 µm)

3.3.2. VORKULTURDAUER BEDINGT WUNDHEILUNGSKINETIK

Der Status der organotypischen Kulturen ändert sich im Laufe der Kultivierungszeit erheblich. So reduziert sich der Anteil proliferativer basaler Keratinozyten im Verlauf der Kultivierung deutlich, die Differenzierung schreitet weiter fort und die Integrinverteilung nähert sich zunehmend dem physiologischen Zustand an (Stark et al. 2004). Die Frage, ob die Reife der Hautkulturen im Wundheilungsmodell Einfluss auf die Fähigkeit zur Reepithelialisierung hat, ist daher von zentraler Bedeutung.

Abbildung 11 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen Vorkulturdauer und Reepithelialisierung. Gemessen wurde die Reepithelialisierung als Distanz von Wundrand zur Spitze der Epithelzunge drei Tage nach Verwundung. Bei einer Woche Vorkultur ist die Wundfläche nach drei Tagen bereits vollständig geschlossen, bei zwei Wochen Vorkultur liegt eine Verzögerung der Wundheilung vor. Bei fünf Wochen Vorkultur ist die Wundheilung zum Zeitpunkt drei Tage nach Verwundung um mehr als die Hälfte reduziert, bei zehn Wochen noch weiter verringert. An die ermittelten Datenpunkte lässt sich eine Verlaufskurve mit sigmoidem Verlauf (Boltzmann-, bzw. *dose-response*-Gleichung) anlegen, d.h. die Vorkulturdauer und die Reepithelialisierungsrate verhalten sich zueinander wie Dosis und Wirkung eines pharmakologischen Wirkstoffs. Der V_{50} -Wert lag bei 3,756 Wochen. R^2 betrug 0,9993, was einen weitgehend der errechneten Kurve entsprechenden Verlauf der tatsächlichen Datenpunkte widerspiegelt.

Die Wundheilung war bei langer Vorkulturdauer deutlich verzögert, jedoch konnte auch hier ein vollständiger Verschluss der Wunden erreicht werden.

3. ERGEBNISSE

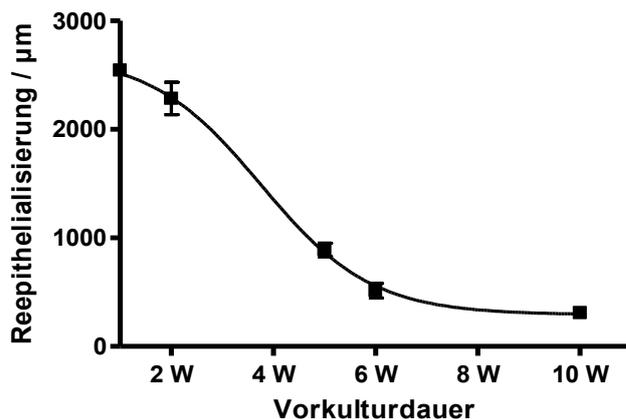


Abbildung 11: Auswirkung der Vorkulturdauer auf die Reepithelialisierungsrate

Der Graph zeigt die Abhängigkeit der Wundheilungsrate vom Alter der Kulturen bei Verwundung. Hierfür wurden je Datenpunkt histologische Schnitte von mindestens zwei scaOTCs in je zwei Schnittebenen 3 Tage n. V. vermessen. Mit zunehmender Vorkulturdauer verringerte sich die Rate der Reepithelialisierung einem sigmoiden Verlauf folgend ($R^2 = 0,9993$). Bei einer Woche Vorkultur waren die Wundbereiche zum untersuchten Zeitpunkt bereits geschlossen, bei 5 Wochen Vorkultur war die Wundheilung deutlich verzögert. Bei 10-wöchiger Vorkultur war die Wundheilung 3 Tage n. V. kaum fortgeschritten. (Fehlerbalken: SEM)

3.3.3. IMMORTALISIERTE ZELLEN IM WUNDHEILUNGSMODELL

Normale humane Keratinozyten, wie sie bisher in diesem Modell verwendet wurden, sind nur schwer genetisch zu manipulieren. Zum einen ist die Transfektionseffizienz relativ gering, zum anderen lassen sich diese Zellen nur für wenige Passagen kultivieren und expandieren. Zelllinien, z. B. HaCaT-Zellen, sind immortal und daher klonal expandierbar.

Für funktionelle Studien über die Auswirkungen von Überexpression bzw. Knockout einzelner Gene wäre die Verwendung von HaCaT-Keratinozyten im Wundheilungsmodell sinnvoll. Um die Kompatibilität des scaOTC-basierten Wundmodells mit HaCaT-Zellen zu untersuchen, wurden diese anstatt normaler humaner Keratinozyten verwendet. Die Vorkulturdauer wurde hierfür auf vier Wochen festgelegt.

2-4 Tage nach Verwundung war die Reepithelialisierung noch wenig fortgeschritten. Die HaCaT-Zellen adhärten und migrierten verstärkt entlang des intakten verhornten Epithels. Diese Migration trägt primär nicht zur Reepithelialisierung der Wundfläche bei (Abbildung 12). In das Wundbett eingebrachtes Fibrin wirkte als Barriere und wurde erst 4 Tage nach Verwundung überwunden.

Zwei Wochen nach Verwundung war das Wundbett vollständig von HaCaT-Zellen bedeckt. Das Epithel war auf mehr als sechs Zellschichten verdickt und zeigte deutliche Kennzeichen von Differenzierung. Terminale Differenzierung war insbesondere am Wundrand vorhanden (Abbildung 12) und dabei HaCaT-typisch parakeratotisch ausgeprägt (Schoop et al. 1999). Die prinzipielle Eignung von HaCaT-Zellen für die Verwendung im Wundmodell konnte somit gezeigt werden, was möglicherweise für künftige mechanistische Studien nützlich sein kann, die aber nicht im Rahmen dieser Arbeit liegen.

3. ERGEBNISSE

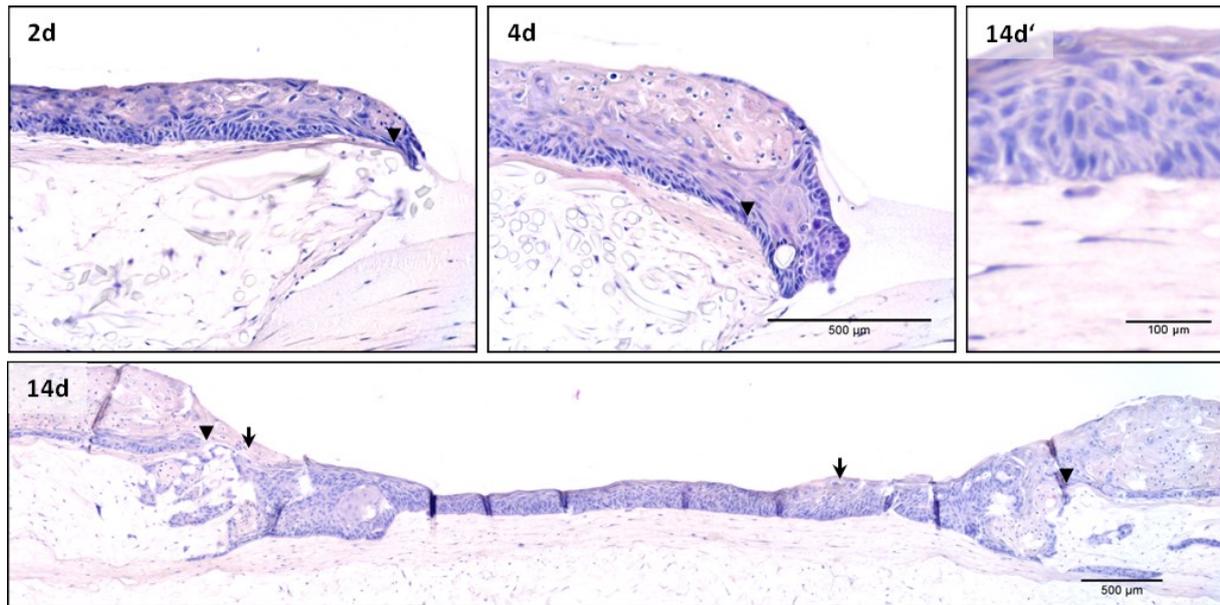


Abbildung 12: Wundheilung in HaCaT-scaOTCs

2 Tage nach Verwundung war die Epithelzunge noch kaum ausgebildet, nach 4 Tagen war der Fibrinpfropf überwunden. Die Zellen bewegten sich zunächst präferenziell entlang des verhornten Epithels. Nach 14 Tagen war die Wunde geschlossen, das Wundepithel mehrschichtig und zunehmend differenziert (schwarze Pfeile, vergrößerter Ausschnitt; Pfeilspitzen markieren den Wundrand).

3.4. ROLLE EPIDERMALER STAMMZELLEN IN DER WUNDHEILUNG

Die Rolle interfollikulärer epidermaler Stammzellen in der Wundheilung ist nicht eindeutig geklärt. Das hier etablierte Modell sollte zur Klärung beitragen, ob diese Stammzellen durch Migration, Proliferation oder beide Vorgänge zur Reepithelialisierung beitragen. Hierzu wurden scaOTC mit IdU-markierten potentiellen epidermalen Stammzellen (Muffler et al. 2008) hergestellt und verwundet.

Kulturen wurden 3, 7 und 13 Tage nach Verwundung untersucht. Um den Anteil IdU-positiver basaler Keratinozyten zu ermitteln, wurden Schnitte von Paraffin-eingebettetem Material mit einem Antikörper für IdU angefärbt und die Zahl der IdU-positiven Zellen ausgezählt. Dabei wurden der Wundbereich, ein wundnaher Bereich und ein wundferner Bereich gesondert untersucht (Abbildung 13).

Im wundfernen Bereich blieb der Anteil der Stammzellen in der Basalschicht über den Untersuchungszeitraum mit etwa 5% konstant, im Wundbereich war die Stammzellendichte deutlich höher. An Tag 7 n. V. war mit über 20% der höchste Anteil an LRCs im Wundbereich vorhanden. In der wundnahen Zone war der Anteil noch vor Wundschluss am höchsten und ging im weiteren Verlauf etwa auf das Niveau des wundfernen Bereichs zurück.

Demnach war eine deutliche Anreicherung von Stammzellen in Wunde und Wundnähe zu verzeichnen. Diese Anreicherung war innerhalb des untersuchten Zeitraums für den wundnahen Bereich transient. Die nach Wundschluss erfolgende Abnahme an Stammzellen (Vgl. Tag 7 zu Tag 13), lässt die Tendenz zur weiteren Konsolidierung der Stammzellverteilung hin zum homöostatischen Zustand wie im wundfernen Bereich erkennen.

3. ERGEBNISSE

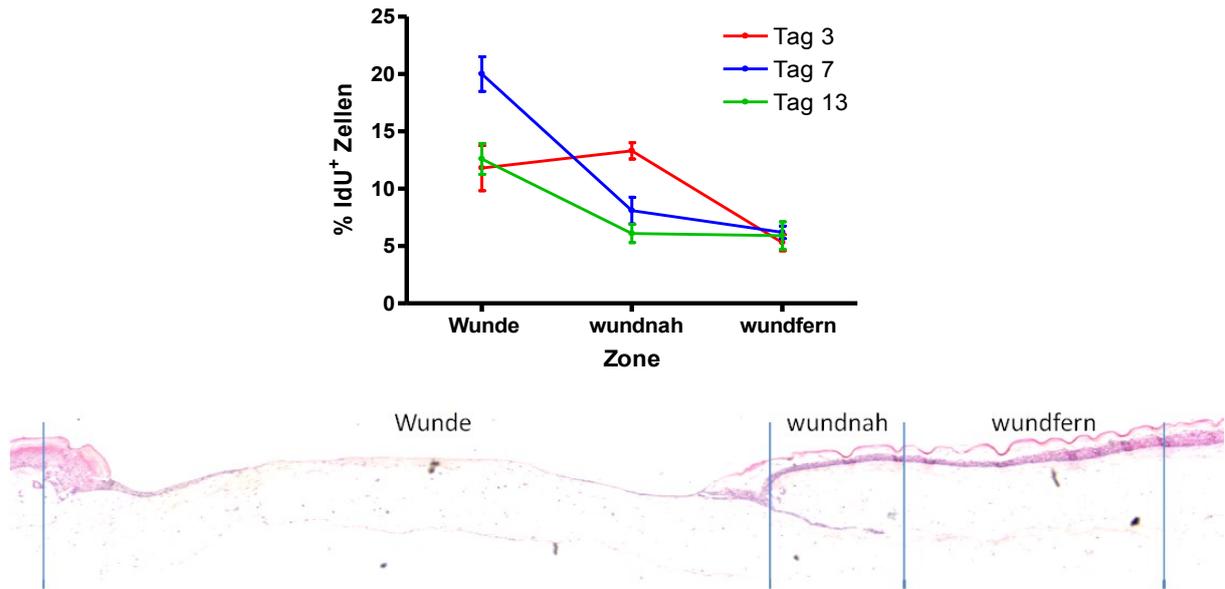


Abbildung 13: Zeitlich aufgelöste laterale Verteilung epidermaler Stammzellen während der Reepithelialisierung

Interfollikuläre epidermale Stammzellen wurden in scaOTCs als IdU-LRCs *pulse-chase*-markiert. 3, 7 und 13 Tage nach Verwundung wurden je Zeitpunkt 5 histologische Schnitte von biologischen Duplikaten immunfluoreszenz-gefärbt. Der Anteil der IdU-positiven Zellen an den Basalzellen wurde für den Wundbereich, eine angrenzende Zone, sowie eine wundferne Zone separat ermittelt (oben). Die höchste LRC-Dichte in der Wunde wurde nach 7 Tagen mit etwa 20% ermittelt. H&E-Färbung einer scaOTC mit Darstellung der separat analysierten Bereiche.

Um zu untersuchen, ob potentielle IFE zur Wundheilung ausschließlich durch Migration, oder auch durch die Erfassung der Proliferation zur Reepithelialisierung beitragen, wurden IdU/Ki67-Doppelfärbungen angefertigt. In der migrierenden Epithelzunge war erhebliche Proliferation nachweisbar (Abbildung 14 A, A'). Es waren sowohl LRCs als auch IdU-negative Zellen proliferativ aktiv.

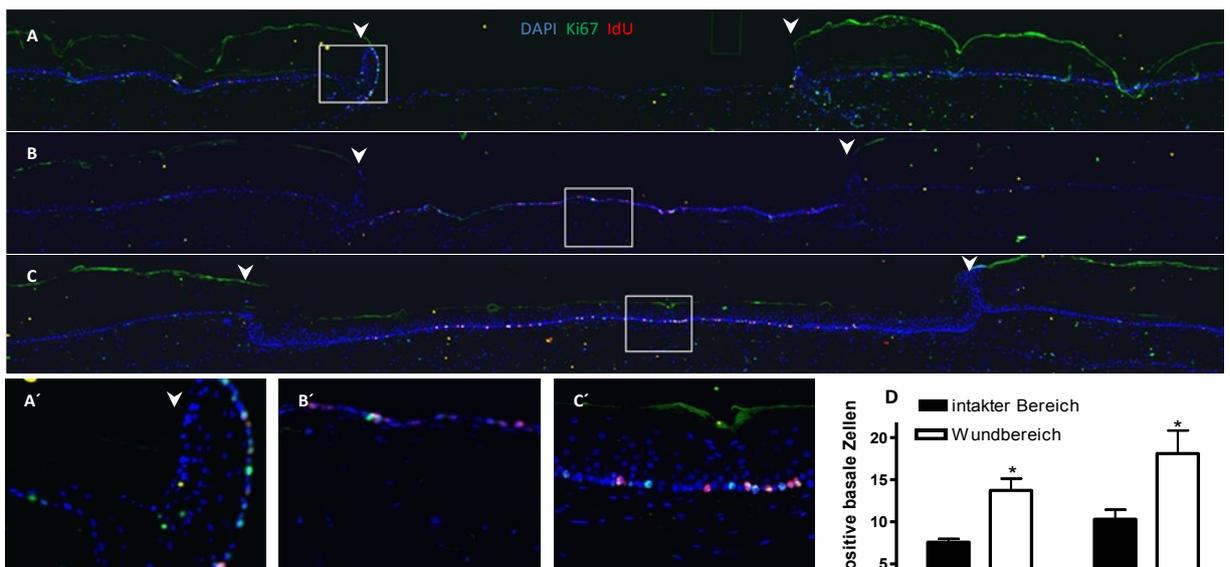


Abbildung 14: label retaining cells und Proliferation in verwundeten scaOTCs

A-C und A'-C': Fluoreszenzaufnahmen von Ki67-IdU-Doppelfärbungen. Paraffinschnitte von Wunden drei Tage (A, A'), eine Woche (B, B') und drei Wochen (C, C') nach Wundsetzung. Weiße Kästchen markieren den jeweils vergrößert dargestellten Bereich, Pfeilspitzen markieren die Wundränder. D: Quantifizierung der Ki67- und IdU-positiven basalen Zellen im Wundbereich (weiße Balken) und im intakten Epithelbereich (schwarze Balken) drei Wochen nach Verwundung (entsprechend C). $p < 0,05$ mit t-Test.

3. ERGEBNISSE

Hohe Proliferation sowie zahlreiche LRCs waren auch beim Wundschluss in der Neoepidermis vorhanden (Abbildung 14 B, B'). Die Hyperproliferation der Neoepidermis, sowie ein signifikant erhöhter Anteil an LRCs im Wundbereich waren auch drei Wochen nach Verwundung noch feststellbar (Abbildung 14 C, C', D). Es waren auch zu diesem Zeitpunkt zahlreiche Ki67-positive LRCs nachweisbar, was die Reaktivierung vormals sehr langsam proliferierender Zellen veranschaulicht.

3.5. GENEXPRESSIONSANALYSE

Der Frage der Regulation von Signalprozessen und funktionellen Prozessen während der Reepithelialisierung sollte durch eine globale Genexpressionsanalyse nachgegangen werden. Dies sollte für das Epithel und den dermalen Anteil separat geschehen um ein umfassendes, differenziertes Bild der Regulation in den beiden Kompartimenten zu erlangen. Durch die Untersuchung und den Vergleich von drei Zeitpunkten wurden verschiedene Phasen der Reepithelialisierung erfasst. Dies waren die frühe Initiationsphase, die migratorische Phase und die hyperproliferative Phase.

3.5.1. RNA-ISOLIERUNG

Der erste Schritt bei der Genexpressionsanalyse ist die Aufreinigung der mRNA aus dem Gewebe. Trotz der geringen Gewebemenge war die Ausbeute der RNA-Isolierung für die Kontrollproben und für die Zeitpunkte 5 und 13 Tage ausreichend und die Reinheit den Anforderungen der *Genomics and Proteomics Core Facility* entsprechend. Der Zeitpunkt 2 Tage konnte aufgrund zu geringer RNA-Menge nicht analysiert werden, weshalb das Material von weiteren acht Kulturen einer neuen Charge gesammelt wurde. Hierfür war auch die erneute Isolierung und Analyse von RNA aus Kontrollkulturen dieser Charge nötig.

Die Ausbeute an RNA war mit einem Bereich von 59,2-216,8 ng/µl bei 20 µl Gesamtvolumen aus den verwundeten Kulturen sehr unterschiedlich. Die erhaltenen Mengen aus den Kontrollkulturen waren aufgrund der größeren Menge an Gewebematerial mit 524,5-2489,1 ng/µl höher.

3.5.2. DNA-MICROARRAY

Die reverse Transkription und die anschließende Expressionsanalyse auf der Illumina-Plattform wurden von der *Genomics and Proteomics Core Facility* des DKFZ durchgeführt.

Die Rohdaten wurden anschließend mit der Software *Chipster* weiterverarbeitet. Dabei wurden die im Folgenden dargestellten Expressionsprofile ermittelt.

3.5.2.1. Genregulation in der Epidermis während der Reepithelialisierung

Die Daten für die verwundete Epidermis an Tag 2 ergaben 755 hochregulierte und 593 herunterregulierte Gene mit $p < 0,05$ in Bezug auf die unverwundete Kontrolle derselben Kulturcharge. An Tag 5 waren 666 bzw. 531 Gene hoch- bzw. herunterreguliert, an Tag 13 waren es 308 bzw. 512 Gene.

Abbildung 15 zeigt den Expressionsverlauf wichtiger Gruppen von Genen anhand der Daten aus dem *microarray*. Die wundheilungsassoziierten Keratine 6, 16 und 17 stiegen in der migratorischen Phase an und normalisierten sich (K16 und K17), oder wurden unter den Ursprungswert herunterreguliert. Für die Keratine 6 und 16 konnte mittels Immunfluoreszenz keine Hochregulation nachgewiesen werden, da diese auch in unverwundeten Kulturen dauerhaft exprimiert waren. Der auf RNA-Ebene ermittelte Expressionsverlauf gibt die aufgrund vorhandener Literatur zu erwartenden Muster wieder

3. ERGEBNISSE

(Paladini et al. 1996). Laminine sind Bestandteile der extrazellulären Matrix, die bedeutenden Einfluss auf die Adhäsion und Migration der basalen Epithelzellen ausüben. Die Lamininketten α_3 , β_3 und γ_2 sind auf den Genen LAMA3, LAMB3 und LAMC2 codiert. Sie bilden das früher als Laminin 5, heute als Laminin 332 bezeichnete Trimer. Dieses wird von aktivierten Keratinozyten in die Basalmembran eingelagert und fördert Polarisation und Migration (Frank & Carter 2004). Im untersuchten Wundmodell wurden die Gene für Laminin 332 mit einem nahezu identischen Verlauf reguliert: einem Anstieg den Faktor 4,8-6,3 zu Beginn der Migration folgte ein leichter Abfall bis kurz vor Wundschluss, sowie ein Rückgang nahe an den Ausgangswert nach Wundschluss.

Das Integrindimer $\alpha_5\beta_1$ bildet den Fibronectinrezeptor und ist wichtig für die Migration von Keratinozyten auf einer Fibronectinmatrix (Kiwanuka et al. 2013). Beide Untereinheiten wurden im Wundmodell während der Migration hochreguliert, die ITGA5-Expression fiel auf den Referenzwert zurück. Einen ähnlichen Verlauf zeigte das integrinassoziierte Protein Kindlin-1 (FERMT1), welches für die Dynamik von β_1 -Integrin vermittelten Fokalkontakten, Keratinozytenpolarität und -Migration mitverantwortlich ist (Margadant et al. 2013; Herz et al. 2006). Auch die *focal adhesion kinase* (FAK, PTK2) wurde zum Zeitpunkt 2 Tage hochreguliert. Diese ist essentiell für die Bildung von Fokalkontakten (Schlaepfer et al. 2004).

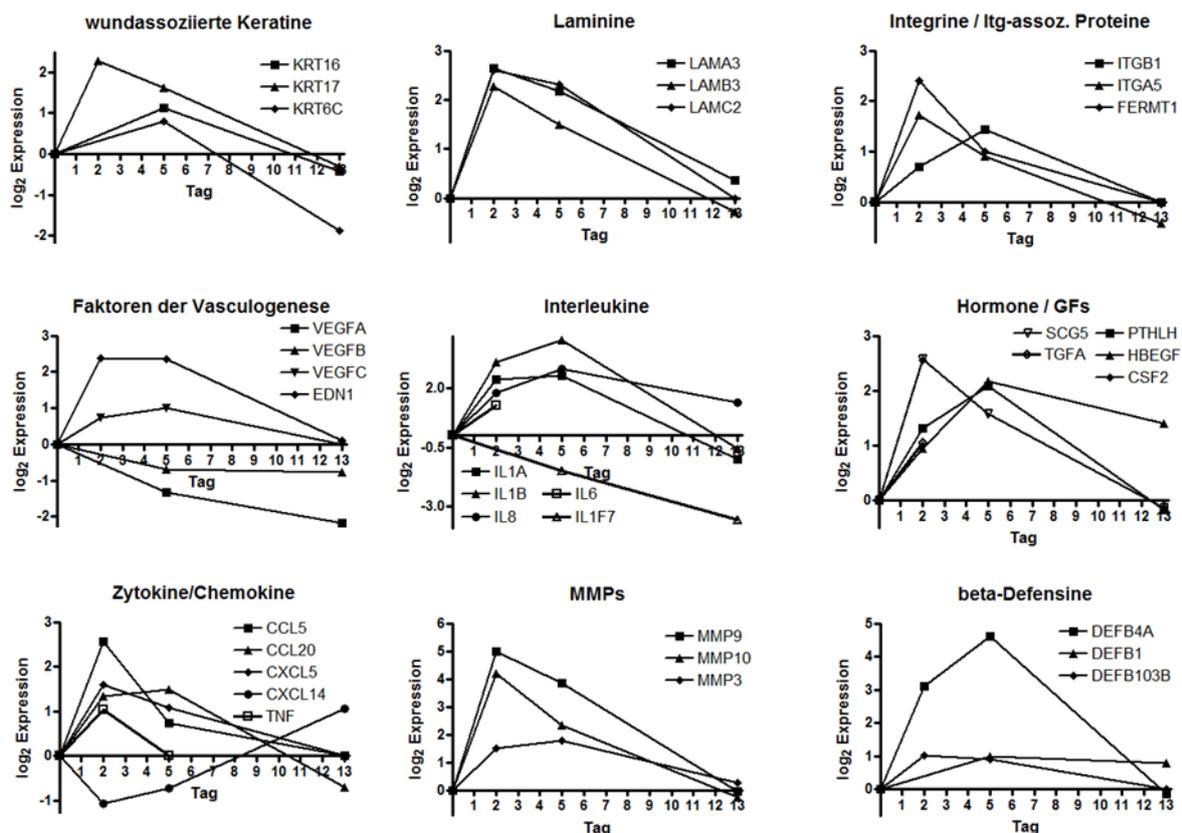


Abbildung 15: zeitlicher Verlauf der mRNA-Expression ausgewählter Gene aus dem *microarray*

Viele für die Wundheilung wichtige Gene zeigen einen Anstieg zu den Zeitpunkten 2 und 5 Tage mit anschließender Normalisierung nach Wundschluss. Bei fehlenden Datenpunkten war die Differenz zwischen Referenz und Probe, bzw. zwischen den Werten für 5 und 13 Tage nicht signifikant.

Während der Wundheilung im Modell wurden in Keratinozyten Gene reguliert, deren Produkte insbesondere auf Endothelzellen wirken. So wurden *vascular endothelial growth factor* (VEGF) A und B herunterreguliert. Diese wirken vasodilatierend und proangiogenetisch (Huang et al. 2012; Yuan et

3. ERGEBNISSE

al. 2014). Das stark vasokonstriktorische Endothelin 1 (EDN1) hingegen wurde transient hochreguliert (Yanagisawa et al. 1988).

Interleukine sind Chemokine, welche ihrem Namen nach vor allem von weißen Blutzellen gebildet werden und auf diese wirken. Aber auch in Zellen der Haut sind Interleukine von großer regulatorischer Bedeutung. Im Wundmodell waren insbesondere proinflammatorische und promigratorische Interleukine wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 transient hochreguliert (Chen et al. 1995; Kroeze et al. 2012; Imanishi et al. 2000), während das antiinflammatorische IL-37 (IL1F7) herunterreguliert war (Nold et al. 2010).

Transient hochreguliert waren Wachstumsfaktoren aus der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF), wie der transformierende Wachstumsfaktor α (TGFA) und der heparinbindende epidermale Wachstumsfaktor (HBEGF). Diese wirken promigratorisch und proliferativ auf Keratinozyten und sind förderlich für die Wundheilung *in vitro* und *in vivo* (Marikovsky et al. 1996; Li et al. 2006). Der *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (CSF2) wirkt sich positiv auf die Wundheilung aus (Mann et al. 2001) und war nach 2 Tagen hochreguliert. PTHLH oder parathyroidhormon-ähnliches Hormon war transient hochreguliert, mit einem Maximum bei 5 Tagen. PTHLH ist ein Inhibitor des Zellwachstums in Keratinozyten (Kaiser et al. 1992) und wird selbst durch Proteine der EGF-Familie induziert (Cho et al. 2004). PTHLH liegt an Keratine, vermutlich vor allem Keratin 16 gebunden vor (Seidel et al. 2002). Letzteres ist in Wunden und auch im Wundmodell verstärkt exprimiert.

Weiterhin wurden Chemokine der CCL- und CXCL-Familien differenziell reguliert. Die Wirkung von CCL5 (RANTES) war zunächst als chemotaktisch für Leukozyten bekannt (Appay & Rowland-Jones 2001). CCL5 kann jedoch auch autokrin auf Keratinozyten wirken und deren Proliferation anregen (Petering et al. 2001). CCL5-mRNA war nach 2 Tagen etwa 5-fach erhöht und fiel bis zum Ende der Untersuchung wieder auf den Ursprungswert zurück. CCL20 (MIP3 α) spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Psoriasis (Mabuchi et al. 2012) und ist bedeutend für die Chemotaxis von dendritischen Zellen in der Haut (Dieu-Nosjean et al. 2000). CCL20 wies eine Expressionsspitze bei 5 Tagen mit 2,8-facher Regulation auf. CXCL5 spielt in der Haut eine Rolle bei der Entstehung von Schmerz in Verbindung mit Entzündungsreaktionen (Dawes et al. 2011). 2 Tage nach Verwundung wurde die höchste Expression von CXCL5 mit 3,1-facher Regulation ermittelt. CXCL14 ist ein in der humanen Epidermis von Keratinozyten konstitutiv exprimiertes Chemokin, das selektiv auf dendritische Vorläuferzellen wirkt und vermutlich der Erhaltung der dendritischen Zellpopulation in der Haut dient (Meuter & Moser 2008). CXCL14 war bis 5 Tage nach Verwundung herunterreguliert, nach 13 Tagen 2-fach hochreguliert.

TNF ist ein zentraler Entzündungsmediator, nicht nur in der Haut. TNF wirkt parakrin auf dermale Fibroblasten, auf Immunzellen, sowie autokrin auf Keratinozyten. TNF moduliert direkt die Migration von Keratinozyten *in vivo* in Mäusen, sowie *in vitro* (Scott et al. 2004), beeinflusst den Umbau der EZM (Han et al. 2001) und spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Allergien (Incorvaia et al. 2008), sowie der Pathogenese und Behandlung von Psoriasis (Kivelevitch et al. 2014). TNF war nach 2 Tagen 2-fach hochreguliert, zu späteren Zeitpunkten wurde keine signifikante Regulation mehr gemessen.

Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sind für den Umbau der extrazellulären Matrix und für die Prozessierung extrazellulärer und membrangebundener Signalmoleküle verantwortlich. Die in diesem Wundmodell hochregulierten MMPs 3, 9 und 10 sind in akuten Wunden wichtige Mediatoren

3. ERGEBNISSE

der Wundheilung, sind jedoch in chronischen Wunden stark erhöht (Xue et al. 2006). Die Mechanismen der Regulation durch MMPs sind dabei unterschiedlich. So kann MMP9 vorhandenes TGF β aktivieren, sowie dessen Expression in Epithelzellen induzieren (Kobayashi et al. 2014). MMP3 und MMP10 sind für die Migration von Keratinozyten bei der Wundheilung wichtig (Xue et al. 2006).

Beta-Defensine sind antimikrobielle Peptide (AMPs) und damit Teil der angeborenen Immunabwehr. Sie werden durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) induziert und können die Wundheilung begünstigen (Lai & Gallo 2009). Am stärksten reguliert war beta-Defensin 2 (hBD2, DEFB4A), mit bis zu 24,4-facher Regulation das am stärksten regulierte Gen nach 5 Tagen. Nach Wundschluss ging die Expression auf den Ausgangswert zurück. Die Defensine hBD1 (DEFB1) und hBD3 (DEFB103B) waren nur etwa 2-fach reguliert, hBD1 blieb auch nach Wundschluss leicht erhöht.

Die Regulation von IL1B und MMP9 wurde durch quantitative *real-time*-PCR (qRT-PCR) validiert.

Zusammen zeigen die Expressionsdaten eindrucksvoll die umfassende Genregulation in epidermalen Keratinozyten, die nach Verwundung im Modellsystem stattfand. Proteine mit unterschiedlichen Funktionen wurden konzertiert reguliert. Dies bedeutet hier, dass die dargestellten Gene transient reguliert waren und nach Abschluss der Reepithelialisierung eine Konsolidierung der Genexpression zum homöostatischen Zustand vor Verwundung stattfand.

3.5.3. SIGNALWEGANALYSE DER GENREGULATION IN DER EPIDERMIS

Die über die Software *Chipster* gefilterten Daten wurden mit *QIAGEN's Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®)*, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity) weiter analysiert. Diese Software gibt durch den Vergleich der eingegebenen Expressionsdaten mit einer Datenbank Wahrscheinlichkeiten für die potenzielle Aktivierung von kanonischen Signalwegen, vorgeschalteten Regulatoren sowie biologischen Funktionen und Funktionsstörungen. Sie erstellt außerdem Netzwerke aus interagierenden Proteinen.

Regulation biologischer Funktionen

Die Aktivierung oder Deaktivierung von Funktionen ist in Abbildung 16 als *heatmap* dargestellt. Auch ohne einzelne Funktionen genauer zu betrachten, gibt die Darstellung einen Überblick über den Verlauf der Genexpression während der Reepithelialisierung. Während der frühen Zeitpunkte, in denen die Wunde noch nicht geschlossen ist und Zellbewegungen stattfinden, überwiegen aktivierte Funktionen (orange Felder). Insgesamt sind mehr Gene reguliert und mehr Gene können regulierten Funktionen zugeordnet werden (größere Felder). Die dunklere Färbung der Felder bei 5 Tagen gegenüber 2 Tagen spiegelt einen höheren Grad der Aktivierung wider. Während der Reepithelialisierung sind deutlich mehr aktivierte (orange) als deaktiviertere (blau) Funktionen vorhanden. Dies ändert sich jedoch nach Wundschluss, indem sich das Verhältnis zwischen aktivierten und deaktivierten Funktionen etwa ausgleicht.

3. ERGEBNISSE

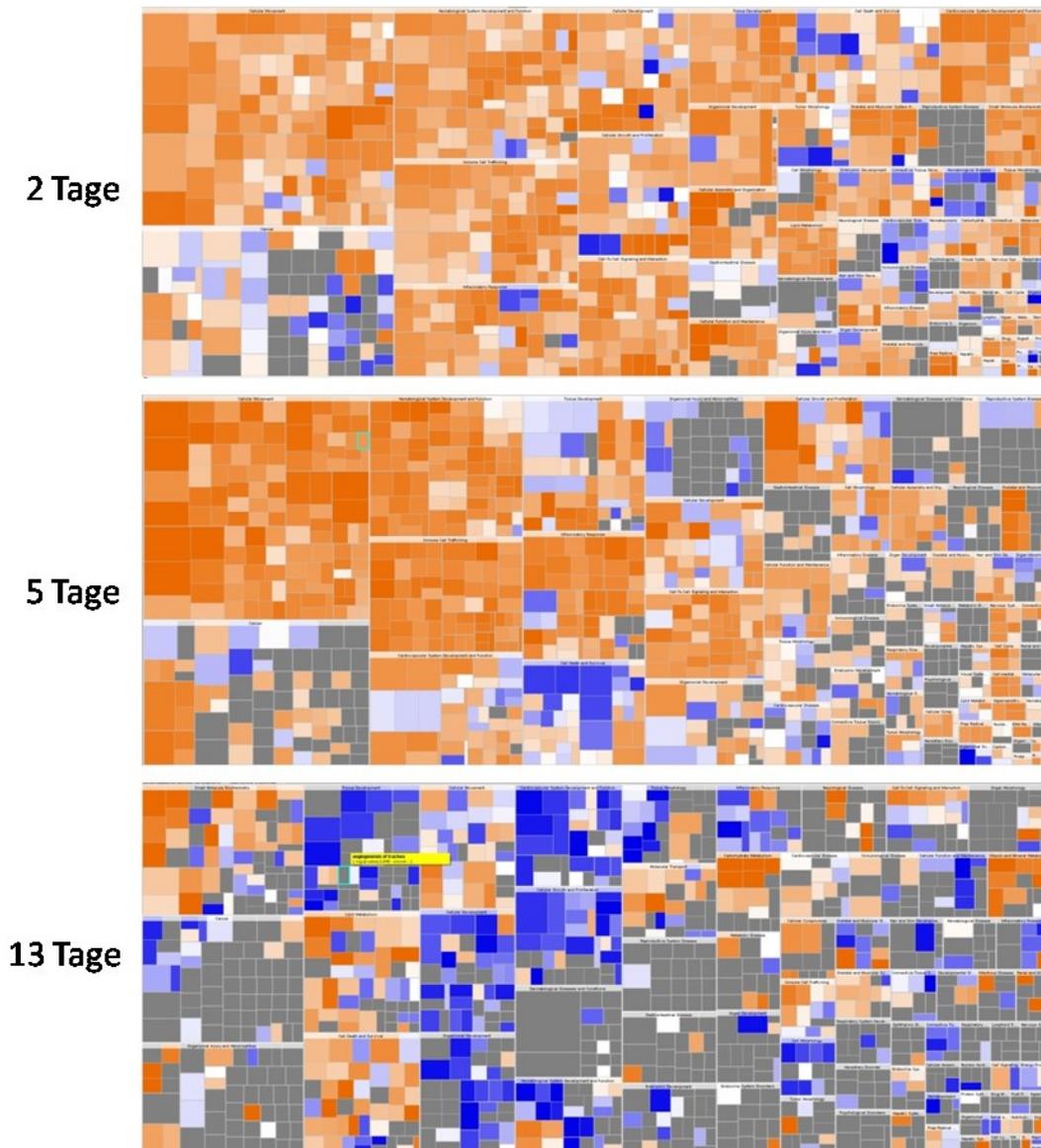


Abbildung 16: Heatmap regulierter biologischer Funktionen laut IPA®

Die Farbe gibt den Aktivierungszustand (blau = deaktiviert, orange = aktiviert, den Grad der Aktivierung bzw. Deaktivierung (dunkler = stärker reguliert) und die Anzahl der beteiligten Gene (Größe des Feldes) wieder. Auch ohne Kenntnis der einzelnen Funktionen sind Unterschiede zwischen den Zeitpunkten während der Reepithelialisierung (2 und 5 Tage) und nach Wundschluss (13 Tage) deutlich. Zu den frühen Zeitpunkten überwiegen aktivierte Funktionen, 13 Tage n.V. sind aktivierte und deaktiverte Funktionen etwa ausgeglichen. Für grau hinterlegte Felder liegt aufgrund nicht ausreichender Informationen kein Z-Wert vor.

Abbildung 17 zeigt die von IPA® berechneten Wahrscheinlichkeiten ($-\log(p\text{-Wert})$) für die Aktivierung einer biologischen Funktion oder Störung, aufgeschlüsselt nach den untersuchten Zeitpunkten nach Verwundung. *Cellular Movement* oder Zellbewegung ist mit einem Wert von über 40 nach der Verwundung der Kulturen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit aktiviert. Dies rührt daher, dass Gene, die die Zellbewegung beeinflussen, in den Expressionsdaten überrepräsentiert sind. Dabei sind Zellbewegung positiv beeinflussende Gene überwiegend hochreguliert, negativ wirkende Gene überwiegend herunterreguliert. Bereits zum Zeitpunkt 5 Tage nach Verwundung sinkt der $-\log$ -Wert etwa auf die Hälfte ab, nach Wundschluss um ein weiteres Drittel. Dies spiegelt für die Reepithelialisierung nötige Regulationsmuster wieder, indem Keratinozyten zunächst nach

3. ERGEBNISSE

Verwundung mobilisiert werden, um die Wunde zu schließen. Hierfür erfolgte Änderungen der Genexpression werden nach Wundschluss rückgängig gemacht.

Die Wahrscheinlichkeiten für die Aktivierung biologischer Funktionen nahmen tendenziell mit der Zeit nach Verwundung ab. Für die Funktion *Dermatological Diseases and Conditions* war dieser Trend gering ausgeprägt, was auf eine langsamere Normalisierung der Expression von Genen aus diesem funktionellen Cluster hinweist. Die Regulation von Zellbewegung, Zellwachstum und Zellüberleben, Onkogenese, Immunreaktionen und Inflammation werden dagegen nach Wundschluss rasch wieder auf das homöostatische Niveau abgesenkt, also normalisiert.

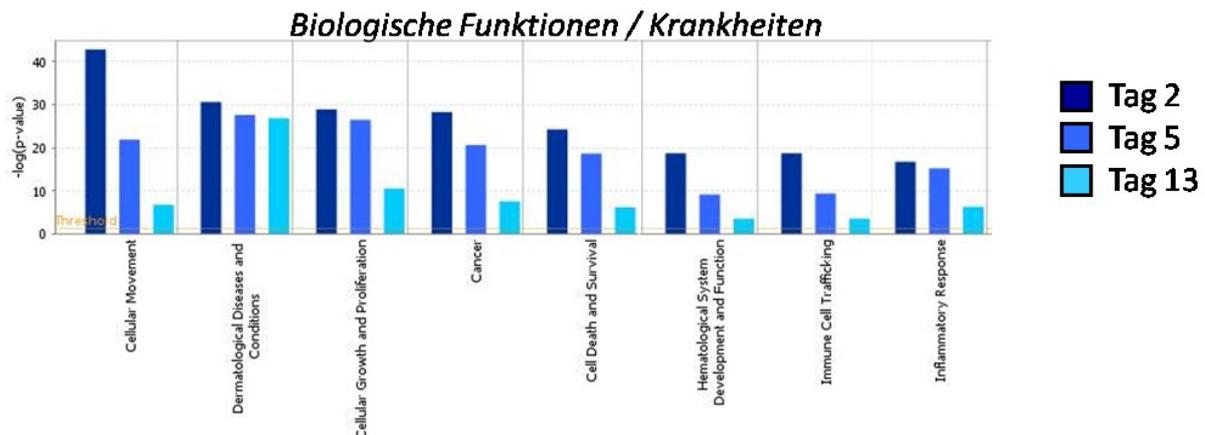


Abbildung 17: Mit IPA® aus den Expressionsdaten erstellte Vorhersagen über aktivierte biologische Funktionen

Die Daten sind aufgeschlüsselt nach den untersuchten Zeitpunkten nach Verwundung. Die Balkenhöhe gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der die jeweilige Funktion reguliert ist. Die Aussagekraft der Vorhersagen nimmt über die Zeit nach Verwundung ab. Einige biologische Funktionen sind als für die Wundheilung relevant bekannt.

Tabelle 1 zeigt je Zeitpunkt die 30 am stärksten aktivierten und inhibierten Funktionen. Der angegebene Z-Wert ist dabei das von der Analysesoftware IPA® angegebene Maß für die Regulation. Positive Z-Werte deuten auf eine Aktivierung der Funktion hin, negative Werte auf eine Deaktivierung oder Inhibition, wobei ein Betrag des Wertes von mindestens 2,0 gemäß Angabe des Herstellers der Software als signifikant eingestuft werden kann. Auffällig sind die schon für Abbildung 16 beschriebene Überlappung der Analyseergebnisse für Tag 2 und Tag 5 einerseits, sowie die stark abweichenden Ergebnisse für Tag 13 andererseits. Die vor Wundschluss stark aktivierten Funktionen sind nach Wundschluss kaum mehr reguliert (z. B. Invasion und Migration von Tumorzelllinien) oder inhibiert (z. B. Angiogenese und Entwicklung des kardiovaskulären Systems), während nach 13 Tagen aktivierte Funktionen in den Ergebnissen der früheren Zeitpunkte deutlich weniger vertreten sind. Nach 2 Tagen aktivierte Funktionen betreffen hauptsächlich Zellmigration und Zellreorganisation, Immunzellinfiltration und das Bindegewebe. Die Z-Werte reichen von 3,88–2,58. Nach 5 Tagen sind neben der Zellmigration auch Proliferation und tumorassoziierte Funktionen mit Z-Werten zwischen 4,75 und 3,17 aktiviert. Nach 13 Tagen stehen verschiedene metabolische Funktionen, Zelltod und degenerative Erkrankungen im Vordergrund, wobei hier die Z-Werte mit 2,45–1,47 geringer ausfallen als vor Wundschluss. Vor Wundschluss waren lediglich drei (2 Tage n.V.) bzw. zwei (5 Tage n.V.) signifikant deaktiviert Funktionen zu finden. Funktionen mit negativem Z-Wert waren an Tag 2 mit Krebs, Zelltod und Inflammation assoziiert, an Tag 5 vor allem mit Zelltod und Apoptose. An Tag 13 waren 18 Funktionen deaktiviert, darunter Proliferation, Immunzellzahl und Gefäßbildung.

3. ERGEBNISSE

Zusammengefasst verdeutlichen die Analysen der Expressionsdaten im Hinblick auf funktionelle Zusammenhänge, dass dieses Wundheilungsmodell biologisch relevante Daten liefert, die den Prozess der Wundheilung von der akuten Phase der Reepithelialisierung bis hin zur Wiedereinstellung eines annähernd homöostatischen Zustands verlässlich abbilden.

3.5.3.1. Regulation kanonischer Signalwege

Das untere Balkendiagramm in Abbildung 17 zeigt, analog zur Darstellung regulierter Funktionen im oberen Diagramm, die Wahrscheinlichkeit für die Vorhersage über die Regulation kanonischer Signalwege. Ähnlich zu den Ergebnissen für regulierte biologische Funktionen waren auch zahlreiche kanonische Signalwege an Tag 2 am deutlichsten reguliert. Deren regulatorische Aktivität nahm über die Zeit ab. Der Signalweg mit dem höchsten $-\log(\text{p-Wert})$ war „Leberfibrose / Aktivierung von Ito-Zellen (*hepatic stellate cells*, HSC)“. Diese Zellen werden beispielsweise durch Infektionen aktiviert und spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von fibrotischen Erkrankungen der Leber (Wang et al. 2013). Dabei spielt die NF- κ B-vermittelte Expression von Zytokinen eine entscheidende Rolle. Außerdem wurde von IPA® die Regulation von Signalwegen für die Adhäsion und Diapedese von Leukozyten vorhergesagt. Diese Vorgänge dienen nach einer Gewebsverletzung der Infiltration des Wundbereichs mit Zellen der Immunabwehr und können so frühzeitig eine mögliche Infektion verhindern.

Weiterhin für die Wundheilung bedeutend sind die Signalwege für Umbau und Signalleitung epidermaler desmosomale Zell-Zell-Verbindungen. Nur über die Reorganisation von Zell-Zell-Verbindungen kann Gewebe umgebaut werden und Reepithelialisierung stattfinden. Auch Signalwege für den Stoffwechsel von Entzündungsregulatoren waren mit signifikanter Wahrscheinlichkeit reguliert. Inflammatorische Prozesse spielen bei der Wundheilung bekanntermaßen eine wichtige Rolle und müssen streng reguliert sein (Zgheib et al. 2014).

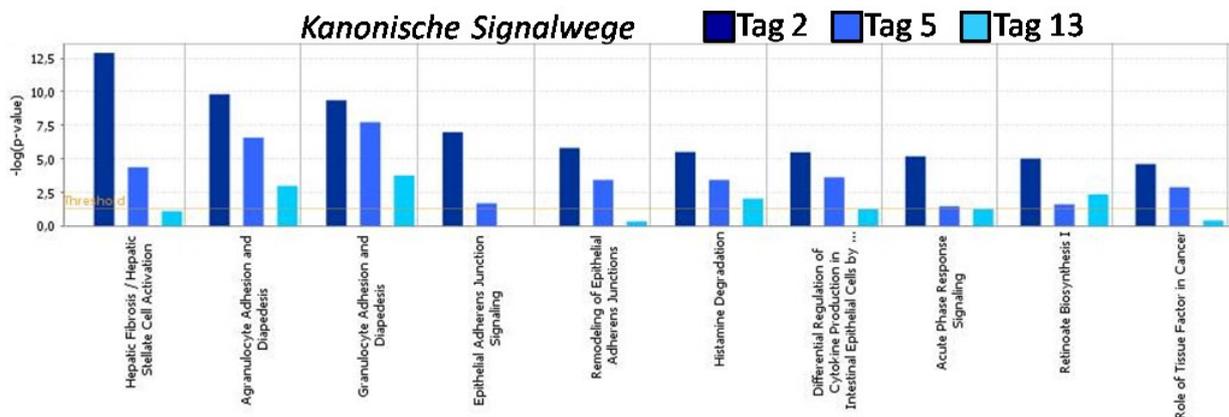


Abbildung 18: Mit IPA® aus den Expressionsdaten erstellte Vorhersagen über aktivierte kanonische Signalwege

Die Daten sind aufgeschlüsselt nach den untersuchten Zeitpunkten nach Verwundung (siehe Abbildung 17). Die Balkenhöhe gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der der jeweilige Signalweg reguliert ist. Einige der dargestellten Signalwege haben bekannte Funktionen in Wundsituationen anderer Organe.

3. ERGEBNISSE

3.5.3.2. *Vorgeschaltete Regulatoren*

Analog zur Darstellung regulierter Funktionen in Tabelle 1 zeigt Tabelle 2 die von der Software ermittelten vorgeschalteten Regulationselemente (*upstream regulators*). IPA® prognostiziert anhand der eingespeisten Expressionsdaten mittels einer umfassenden Datenbank, welche Regulationselemente (Proteine, pharmakologische Substanzen oder Mikro-RNAs) die im Experiment ermittelten Expressionsmuster verursachen. Diese Prognosen werden mit dem Z-Wert angegeben, welcher ein Maß für die Korrelation darstellt.

Für die beiden Zeitpunkte vor Wundschluss waren die Z-Werte vergleichbar, während sie nach Wundschluss stark von den Vorgenannten abwichen. Die Maximalen Z-Werte waren 6,90, 5,99 und 3,72 für 2, 5 bzw. 13 Tage n.V., die minimalen Z-Werte -3,61, -4,79 bzw. -3,20. An Tag 2 war damit die deutlichste Aktivierung vorhanden, an Tag 13 die geringste. Die Minimalwerte unterschieden sich weniger.

An Tag 2 waren Wachstumsfaktoren wie TGFβ, GM-CSF und EGF, proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF und in geringerem Maße Interferone aktiviert. Entsprechend waren auch an der Signaltransduktion dieser Faktoren beteiligten Proteine und Komplexe, wie ERK, JNK, AP1 und Ras aktiviert. Auf der Rezeptorseite war die wahrscheinliche Beteiligung verschiedener TLRs auffällig. An Tag 5 zeigte sich ein ähnliches Bild, mit einer weiter betonten Aktivierung NF-κB-vermittelter proinflammatorischer Signalwege. An Tag 13 war eine Verschiebung der Regulation von einer TNF/Interleukin- zu einer Interferon-dominierten Entzündungssituation zu verzeichnen.

Zusammenfassend verdeutlicht die Signalweganalyse die im vorangegangenen Kapitel anhand ausgewählter Gene beschriebene Aktivierung des Epithels nach Verwundung, die während der Migration anhaltende inflammatorische Reaktion, sowie die nach Wundschluss erfolgende Konsolidierung des Epithels in Richtung Ausgangszustand.

3. ERGEBNISSE

Funktion sortiert nach Tag2	Tag 2	Tag 5	Tag 13	Funktion sortiert nach Tag5	Tag 2	Tag 5	Tag 13	Funktion sortiert nach Tag 13	Tag 2	Tag 5	Tag 13
invasion of cells	3.88	4.75	0.99	invasion of cells	3.88	4.75	0.99	neuromuscular disease	0.00	0.00	2.45
organization of cytoplasm	3.76	1.74		migration of tumor cell lines	2.92	4.61	-0.21	cell death of tumor cells	-0.95	-0.65	2.24
organization of cytoskeleton	3.76	1.74		invasion of tumor cell lines	2.89	4.50	0.75	progressive motor neuropathy		0.00	2.24
stimulation of cells	3.37			cell movement of breast cancer cell lines	2.45	4.37		relapsing-remitting multiple sclerosis			2.24
microtubule dynamics	3.35	1.04		migration of breast cancer cell lines	2.77	4.36		cell death of myeloid cells			2.21
degradation of connective tissue	3.33			cell movement	1.71	4.36	0.88	damage of genitourinary system			2.20
recruitment of neutrophils	3.31		1.51	cell movement of tumor cell lines	2.19	4.22	-0.43	metabolism of terpenoid	2.03	-0.02	2.19
production of reactive oxygen species	3.30	1.82		migration of phagocytes	0.92	4.01		mass of liver			2.14
formation of cells	3.21	1.65		proliferation of cells	1.29	3.99	-1.70	metabolism of carbohydrate	0.77		2.12
induction of cells	3.01			migration of cells	1.37	3.95	0.64	apoptosis of myeloid cells			2.06
synthesis of DNA	2.99	2.44		proliferation of smooth muscle cells	1.23	3.94	0.62	damage of kidney			2.00
synthesis of nitric oxide	2.99	1.95	0.79	cell movement of myeloid cells	2.08	3.92	0.36	concentration of cholesterol			2.00
induction of leukocytes	2.97			proliferation of muscle cells	1.05	3.77	0.39	cell death of phagocytes			1.99
migration of tumor cell lines	2.92	4.61	-0.21	chemotaxis	2.13	3.70		metabolism of monosaccharide	1.00		1.98
invasion of tumor cell lines	2.89	4.50	0.75	cell movement of phagocytes	1.76	3.63	-0.33	metabolism of D-glucose	1.00		1.98
synthesis of reactive oxygen species	2.83	1.98	-0.17	chemotaxis of cells	2.02	3.62		metabolism of D-hexose	1.00		1.98
quantity of carbohydrate	2.82	1.17	0.72	homing	2.15	3.52		metabolism of cholesterol			1.98
damage of connective tissue	2.78			homing of cells	2.04	3.45		metabolism of hexose			1.98
migration of breast cancer cell lines	2.77	4.36		influx of leukocytes		3.39		glomerulosclerosis			1.98
induction of blood cells	2.74			cell movement of connective tissue cells	1.31	3.37		infection of mammalia		0.99	1.74
shape change of tumor cell lines	2.74	1.16		accumulation of phagocytes	2.45	3.37		synthesis of terpenoid			1.72
differentiation of tumor cell lines	2.72	2.98		cell movement of smooth muscle cells	2.48	3.34		insulin resistance			1.62
differentiation of osteoclasts	2.72			cell movement of brain cancer cell lines	0.35	3.29		organismal death	-2.65	-3.85	1.56
angiogenesis	2.67	2.66	-1.85	cell movement of monocytes	1.42	3.27		Movement Disorders	0.90	1.17	1.56
migration of keratinocytes	2.67			influx of phagocytes		3.24		quantity of apoptotic cells			1.56
proliferation of neuroglia	2.65	2.10		migration of antigen presenting cells		3.24		recruitment of neutrophils	3.31		1.51
activation of antigen presenting cells	2.64		-0.78	cell movement of granulocytes	2.02	3.22		damage of liver		-0.19	1.50
development of cardiovascular system	2.64	2.04	-2.30	growth of tumor	1.84	3.20	0.32	metabolism of retinoid			1.48
differentiation of keratinocytes	2.59			migration of smooth muscle cells	2.41	3.18	0.76	metabolism of vitamin			1.48
differentiation of epithelial cells	2.58		-0.99	adhesion of blood cells	1.46	3.17		stress response of tumor cell lines		1.24	1.47

Tabelle 1: Regulierte biologische Funktionen und Krankheiten laut IPA®

Die Werte wurden aus den gefilterten Expressionsdaten des epidermalen Anteils des Wundmodells berechnet. Gezeigt sind je Zeitpunkt die 30 Funktionen mit dem höchsten bzw. niedrigsten (diese bzw. nächste Seite) Z-Wert (rot = hoher Z-Wert, aktiviert; blau = niedriger Z-Wert, deaktiviert/inhibiert). Der Z-Wert stellt ein Maß für die Regulation der Funktion dar. Die Schwellenwerte für eine signifikante Regulation werden von IPA® mit 2,0 bzw. -2,0 angegeben.

Die Analyse zeigt eine deutliche Überlappung der Regulation an Tag 2 und Tag 5. Zu diesen Zeitpunkten regulierte Funktionen waren an Tag 13 kaum oder gegensätzlich beeinflusst. Vor Wundschluss waren Zellmigration und Zellreorganisation, Bindegewebsumbau, Immunzellinfiltration und Onkogenese aktiviert.

Funktion sortiert nach Tag2	Tag2	Tag5	Tag13	Funktion sortiert nach Tag5	Tag2	Tag5	Tag13	Funktion sortiert nach Tag13	Tag2	Tag5	Tag13
organismal death	-2.65	-3.65	1.56	organismal death	-2.65	-3.85	1.56	proliferation of hematopoietic progenitor cells	-0.31		-3.08
Heart Disease	-2.21	-2.43	-0.39	Heart Disease	-2.21	-2.43	-0.39	quantity of blood cells	1.41	0.29	-3.03
differentiation of adipocytes	-2.11		-0.75	apoptosis of breast cancer cell lines		-1.99	0.57	quantity of leukocytes	0.72	0.07	-2.70
morphology of skin	-1.83	-0.65		blister		-1.97		cellular homeostasis	1.78	-0.48	-2.51
proliferation of carcinoma cell lines	-1.64			cell death of tumor cell lines	0.31	-1.86	-0.64	quantity of subcutaneous fat			-2.43
synthesis of cartilage matrix	-1.63			interstitial fibrosis		-1.79		generation of lymphocytes			-2.40
cell death of cancer cells	-1.57	-0.35		cell death	0.99	-1.76	0.63	vasculogenesis	2.38	1.24	-2.35
adenoma	-1.50	-0.20		apoptosis	1.55	-1.68	1.27	quantity of phagocytes	0.48	0.34	-2.34
colony formation	-1.46	-0.86	-0.51	squamous-cell carcinoma		-1.67	0.00	differentiation of connective tissue cells	0.04	-0.49	-2.32
Edema	-1.41		-1.03	apoptosis of tumor cell lines	0.55	-1.62	-0.24	development of cardiovascular system	2.64	2.04	-2.30
eukemia	-1.35			perinatal death		-1.52		cell survival	0.72	2.02	-2.23
colony formation of cells	-1.28	-0.44	-0.62	cell death of prostate cancer cell lines	-0.62	-1.47		skin development	-0.71	-1.15	-2.20
inflammation of respiratory system component	-1.13	-0.38	-0.42	vascularization of connective tissue		-1.39		concentration of cyclic AMP			-2.19
lymphoproliferative disorder	-1.13			Fibrosis	-0.42	-1.33	-0.18	generation of T lymphocytes			-2.18
lymphatic node tumor	-1.11			cell death of breast cancer cell lines		-1.33	0.98	tubulation of vascular endothelial cells		-0.25	-2.06
non-Hodgkin's disease	-1.11			colony formation of tumor cell lines		-1.30	0.78	development of blood vessel	2.46	2.16	-2.06
lymphohematopoietic cancer	-1.10	1.11		fibrosis of tissue		-1.28		differentiation of cells	2.19	1.59	-2.04
inflammation of organ	-1.09	-1.17	-1.44	permeability of cells		-1.22		cell proliferation of tumor cell lines		1.56	-2.02
infection by Picornaviridae	-1.09			apoptosis of prostate cancer cell lines	-0.35	-1.21		quantity of granulocytes	0.44		-1.97
cell viability of cancer cells	-1.04			inflammation of organ	-1.09	-1.17	-1.44	development of epithelial tissue	1.24	-0.29	-1.95
aggregation of blood platelets	-1.03			skin development	-0.71	-1.15	-2.20	rheumatic disease of joint			-1.94
cell death of tumor cells	-0.95	-0.65	2.24	atherogenesis		-1.13		cell viability	0.57	1.89	-1.92
hematological neoplasia	-0.93	1.11		necrosis	0.58	-1.09	0.43	neoplasia of tumor cell lines	0.59	1.77	-1.88
stenosis	-0.92			dilation of heart chamber		-1.01		tumorigenesis of cells			-1.88
apoptosis of connective tissue cells	-0.89			Lesion Formation	0.13	-1.01	0.69	angiogenesis	2.67	2.66	-1.85
Thrombosis	-0.82	-0.95	0.04	Encephalitis		-0.99		generation of leukocytes			-1.82
immediate hypersensitivity	-0.82	0.00	0.45	Thrombosis	-0.82	-0.95	0.04	fibrogenesis	2.08	1.40	-1.81
squamous cell tumor	-0.75			injury of lung	-0.23	-0.89		growth of epithelial tissue		-0.41	-1.79
hematologic cancer	-0.75	1.32		quantity of focal adhesions		-0.86		transmembrane potential			-1.76
proliferation of fibroblast cell lines	-0.74			colony formation	-1.46	-0.86	-0.51	transmembrane potential of mitochondria			-1.76

Tabelle 1 (Fortsetzung): Regulierte biologische Funktionen und Krankheiten laut IPA®

3. ERGEBNISSE

Regulator nach Tag 2	Tag 2	Tag 5	Tag 13	Regulator nach Tag 5	Tag 2	Tag 5	Tag 13	Regulator nach Tag 13	Tag 2	Tag 5	Tag 13
TNF	6,90	5,99	0,09	TNF	6,90	5,99	0,09	IFNA2	0,22	1,21	3,72
TGFB1	5,54	4,73	-0,19	IL1A	4,23	4,92	-1,24	IFNG	3,42	2,81	3,71
OSM	5,31	1,88		Nfkb (complex)	4,29	4,82	1,44	IFN1	1,23	1,94	3,42
IL1B	4,36	3,58	-1,93	TGFB1	5,54	4,73	-0,19	IFNar	-0,19	1,40	3,11
IL5	4,66	2,17	-2,15	ERK	3,07	4,57	-0,29	STAT1	1,88	2,38	2,65
CSF2	4,63	2,23	-0,36	CCL5	2,56	4,07	0,45	IFNA1/IFNA13	-0,38		2,57
F2	4,43	1,95		MYD88	1,88	3,78	-1,15	IFIH1	1,66	0,22	2,40
RAFI1	4,36	0,88		TICAM1	2,19	3,77	0,93	RF7	1,35	1,99	2,36
PDGF BB	4,35	3,13	-1,66	TREM1	3,90	3,75	-0,38	IF3	1,26	2,19	2,32
Nfkb (complex)	4,29	4,82	1,44	RELA	2,59	3,68	0,25	IAK1	2,18	2,22	2,24
IL1A	4,23	4,92	-1,24	EGF	3,72	3,60	0,31	WNT5A	1,70	0,10	2,24
NUPR1	4,13	2,07	-1,47	IL1B	4,36	3,58	-1,93	miR-146a-5p	0,65	0,38	2,24
TLR3	4,09	3,34	-0,37	TLR4	2,74	3,50	1,42	ZD9		1,43	2,22
TLR5	4,00	2,82	-1,29	P3B MAPK	2,80	3,42	0,50	SPARC	-0,35		2,12
TREM1	3,90	3,75	-0,38	Mek	2,93	3,38		IFNAR1	1,03	0,62	2,03
FGF2	3,77	2,16	-0,20	TLR3	4,09	3,34	-0,37	IL27	-0,40	0,67	2,01
EGF	3,72	3,60	0,31	JUN	0,87	3,33		RF1	0,98	2,57	2,00
Pkc(s)	3,70	2,40		TNFSF12	2,57	3,23		CF3	-1,18		2,00
PPRC1	3,63	2,89	-1,69	IL17A	2,87	3,22		ATP7B		1,63	2,00
Vegf	3,62	0,71		SAMS1	1,94	3,16	1,67	Interferonalpha	1,82		2,00
Tlr	3,53	1,00	-1,15	PDGF BB	4,35	3,13	-1,66	IPF2	0,28	-0,90	1,98
HGF	3,52	0,09	0,00	RET	2,38	3,13		MAP2K6	0,82		1,97
IL1	3,47	2,61		Jnk	3,08	3,11		BCL6	-0,27	1,97	1,96
IFNG	3,42	2,81	3,71	Cc	0,78	3,03	-1,16	miR-31-5p	-3,11	-1,91	1,96
TLR2	3,39	2,77	-1,98	EGR1	1,80	3,02		FADD	1,17		1,95
KRAS	3,31	2,65		SVV1	-0,36	3,01	1,41	FGF21	-0,22		1,95
HRAS	3,29	1,99		AGER	0,37	2,98		NR1H3	-2,05	-1,25	1,95
Ap1	3,29	2,65	0,00	IGF1R	1,43	2,90		RF5	2,56	1,97	1,94
ERK1/2	3,24	1,82	-3,06	IL1B	2,65	2,90		MAVS	1,93	1,70	1,94
TLR7	3,22	2,43		PPRC1	3,63	2,89	-1,69	DDX58	-1,49	1,55	1,91
Ras	3,11	0,00		F7	2,51	2,88		PDLIM2		0,90	1,90
SMAD2	3,10			DOCK8	1,90	2,83	1,63	NFATC2	2,80	2,75	1,89
Jnk	3,08	3,11		SASH1	1,51	2,83	1,89	SASH1	1,51	2,83	1,89
ERK	3,07	4,57	-0,29	TLR9	4,00	2,82	-1,29	COMM1D1		0,82	1,89
MAP	3,05	2,19		IFNG	3,42	2,81	3,71	IFN1	0,01	0,16	1,74
MAP3K1	3,01	2,20		ICN2	1,96	2,77		VHL	0,23	0,44	1,72
NOD2	2,99	2,41		TLR2	3,39	2,77	-1,98	LDLR	-1,60		1,71
FN1	2,96	1,96		MKL1	1,75	2,76		SAMS1	1,94	3,16	1,67
CD14	2,96	2,18		Pka	1,12	2,76	-0,51	DOCK8	1,90	2,83	1,63

Regulator nach Tag 2	Tag 2	Tag 5	Tag 13	Regulator nach Tag 5	Tag 2	Tag 5	Tag 13	Regulator nach Tag 13	Tag 2	Tag 5	Tag 13
MYCN	3,60			Alpha catenin	0,53	-4,78		IFI1A	0,67	-0,37	-3,20
SB203580	3,57			KIAA1524	-2,13	-3,05	-1,41	ERK1/2	3,24	1,82	-3,06
IL1RN	3,28	-2,58	-2,85	estrogen receptor	-2,78	-2,90	1,32	TRIM24	-0,58	1,94	-2,90
SP600125	3,24			SPDEF	0,21	-2,71		IL1RN	-2,28	-2,58	-2,85
Nr1h	-2,96	-2,33		SILC13A1		-2,65	0,00	ACKR2		1,89	-2,83
Bay 11-7082	-2,83			ALDH2		-2,63		EPAS1	-0,74	-1,01	-2,76
estrogen receptor	-2,78	-2,90	1,32	CFTR	-0,18	-2,62	-2,43	CD3B	-2,52	1,67	-2,76
miR-21	-2,69	-2,35	-0,71	COL18A1	-2,08	-2,60		USP1B			-2,59
NTSE	-2,65			TRIB3		-2,60		CEBPA	1,55	0,03	-2,53
LYN	-2,58			IL1RN	-3,29	-2,58	-2,85	CREB1	0,34	-0,81	-2,43
IL3	-2,57	-1,10	-0,31	IL10	-2,36	-2,57	0,84	CFTR	-0,18	-2,62	-2,43
dexamethasone	-2,56			ZNF217	-0,63	-2,53	0,82	CSF1	1,80	1,16	-2,41
SIRT1	-2,55			IRGM	-0,63	-2,45		ZF1	-0,25	0,54	-2,39
TNFAIP3	-2,54			ABCB4	0,48	-2,44		MAPK1	1,51	-1,41	-2,32
KLF2	-2,48	-1,50	0,00	FRN1	-0,87	-2,43		NEDD9	-0,33	1,67	-2,31
NR3C1	-2,47	-1,31	-0,66	FOXA1	-2,14	-2,35	0,75	CREM	-0,48	-1,41	-2,24
EPHB6	-2,45			miR-21	-2,69	-2,35	-0,71	AMPK	-0,71	-1,84	-2,21
ADAMTS12	-2,43	-1,34	0,00	TAB1	-1,21	-2,33	0,00	EGFR	2,03	1,50	-2,19
IL37	-2,42			Nr1h	-2,96	-2,30		IL5	4,66	2,17	-2,15
TNC	-2,41			FBXO32	-1,27	-2,24		ESRRG			-2,05
CAV1	-2,40	-0,90	-1,98	ITGB2	-0,20	-2,24		IL4	0,31	0,44	-2,04
ZFP36	-2,39			SCD	-0,90	-2,16	-0,28	STAT1	0,00	0,00	-2,00
TAF4	-2,38	-1,10	0,24	WSP2	-1,71	-2,14	0,45	FOS	1,01	2,14	-2,00
IL10	-2,36	-2,57	0,84	S100A6	-1,34	-2,12		TLR2	3,39	2,77	-1,98
RORA	-2,36	0,00	0,00	DUSP1	-1,74	-2,12		Map4ct			-1,98
CD28	-2,32			GNE		-2,00		CAV1	-2,40	-0,90	-1,98
SOCS3	-2,31		1,52	NANOG		-2,00		MAP3KB	1,87	-0,01	-1,98
CDKN1A	-2,30	-1,98		STK40	0,00	-1,99		ELAVL1	1,08		-1,97
FASN	-2,24			ATG7	-2,00	-1,98		FABP5	-0,81	1,75	-1,97
ESR1	-2,23	0,89	0,73	SPTLC2	0,00	-1,98		AHR	1,28	-0,65	-1,94
CORT	-2,22			ZEB2	0,07	-1,98		IL1B	4,36	3,58	-1,93
SIRPA	-2,21			NRSA2		-1,98		ADORA2A	-1,21	1,00	-1,91
SLPI	-2,20			PDCC4		-1,98		STAT6	0,35	1,05	-1,85
MEDX2	-2,20			miR-146	-1,75	-1,98		GAPDH	0,13	0,06	-1,82
SOD2	-2,18	0,00		HMP7	0,33	-1,98		IL2	2,91	-0,45	-1,78
IL1R2	-2,18	0,00		MMP9	-1,61	-1,98		SOCS1	-1,13	1,74	-1,78
GRIP1	-2,17			ACOX1	-0,35	-1,96	0,00	PI3K (complex)	0,76	1,25	-1,75
MST1	-2,17			LGM		-1,96	0,00	IGF1	2,55	1,47	-1,74
FOXA1	-2,14	-2,35	0,75	PROC	-1,24	-1,96		PPRC1	3,63	2,89	-1,69

Tabelle 2: Vorgesaltete Regulationselemente laut IPA[®]

Die Tabelle zeigt die von IPA[®] als aktiviert bzw. deaktiviert vorhergesagten Regulationselemente, sortiert nach den jeweils angegebenen Zeitpunkten. Die angegebenen Zahlen sind die Z-Werte, welche ein Maß für die Regulation sind. Z-Werte über 2,0 bzw. unter -2,0 werden als signifikante Regulation angesehen. Rot bzw. blau hinterlegte Regulatoren sind im Experiment hoch- bzw. herunterreguliert. Grau hinterlegte Regulatoren sind an der angeborenen Immunantwort beteiligt und können die Wundheilung beeinflussen.

Analog zu den Ergebnissen der Signalwege und Funktionen werden die höchsten Z-Werte bei 2 und 5 Tagen erreicht. Dabei überlappen die Ergebnisse der beiden frühen Zeitpunkte deutlich, während das Regulationsmuster nach 13 Tagen differiert.

3. ERGEBNISSE

3.5.3.3. Dermis

Die Analyse der RNA aus dem fibroblastenhaltigen dermalen Anteil der untersuchten scaOTCs ergab, dass insgesamt weniger Gene differenziell reguliert waren, als dies für die epidermalen Proben der Fall war. Es wurden je Zeitpunkt zwischen 220 und 608 regulierte Gene ermittelt. Unter diesen war eine große Zahl an keratinozytenspezifischen Genen, insbesondere Keratine und *small proline-rich repeat*-Proteine (SPRRs) zu verzeichnen. Allein diese beiden Gruppen machten bis zu 4,1% der regulierten Gene aus. Dies lässt auf eine nicht zu vernachlässigende Kontamination der dermalen RNA mit epidermaler RNA schließen. Daher wurden diese Daten als nicht verlässlich eingestuft und schließlich nicht weitergehend untersucht.

3.6. BEDEUTUNG VON TLRs UND NF-κB IN DER WUNDHEILUNG

Die Signalweganalyse deutete auf eine Aktivierung von Signalwegen der angeborenen Immunabwehr während der Wundheilung hin. Unter den möglichen vorgeschalteten Regulatoren waren TLRs und an deren Signalleitung beteiligte Moleküle wie NF-κB (vgl. Tabelle 2). Dies warf die Frage nach möglichen Effekten von Agonisten und Antagonisten dieser Regulatoren auf die Reepithelialisierung auf. Zur Beantwortung dieser Frage wurden verwundete scaOTCs mit BAY 117082, Dexamethason, LTA, Poly(I:C), LPS-EB und LPS-RS behandelt und der Fortschritt der Reepithelialisierung 4 Tage nach Verwundung durch Vermessung der epithelbedeckten Wundfläche oder der Vermessung von Schnitten Paraffin-eingebetteten Materials bestimmt (vgl. 2.2.6).

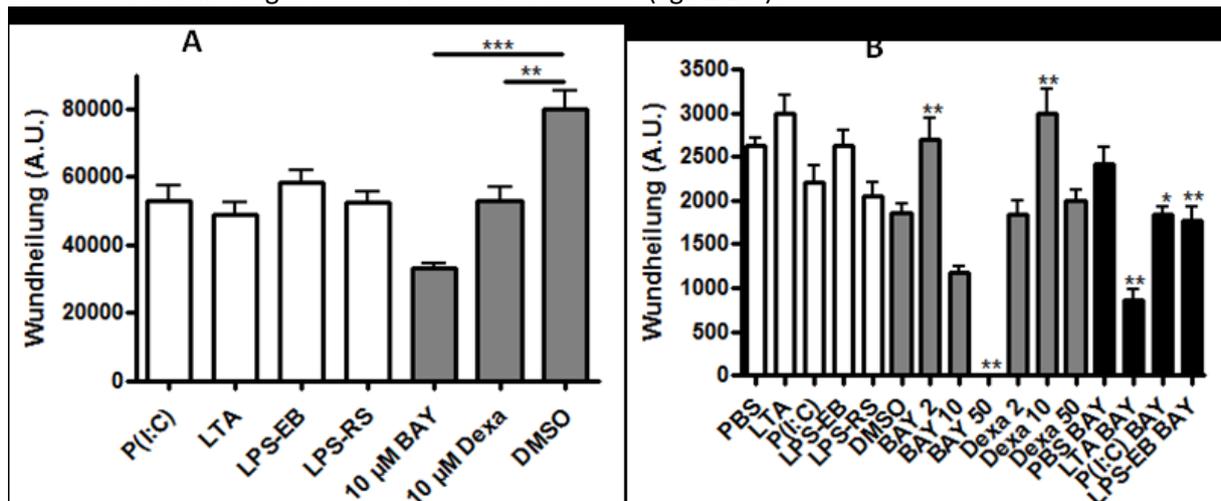


Abbildung 19: Effekt immunmodulatorischer Agenzien auf die Reepithelialisierung

Die Diagramme zeigen jeweils die Reepithelialisierung an Tag 4. Die Werte wurden durch Vermessung der Fläche (A) bzw. der Strecke (B) ermittelt. Durch Behandlung verwundeter OTCs mit TLR-Liganden konnten keine reproduzierbaren Effekte auf die Wundheilung erzielt werden. Reproduzierbar war die Hemmung der Wundheilung nach Inhibition von NF-κB durch BAY 117082. Eingesetzte Konzentrationen (A und B): Poly(I:C) 5 µg/ml, LTA 1 µg/ml, LPS 10 µg/ml, jeweils 100 µl /24 h appliziert; BAY 117082 und Dexamethason Endkonzentration im Medium; B: BAY 117082 in Kombination mit TLR-Liganden 10µM. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, one-way ANOVA, Dunnet's Test, 3 biologische Replikate; Analyse jeweils innerhalb der Gruppen (weiß/grau/schwarz).

Exemplarisch zeigt Abbildung 19 die Ergebnisse zweier Wundheilungsexperimente unter Behandlung mit TLR-Liganden und antiinflammatorischen Agenzien. In mehreren Ansätzen konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. Mit TLR-Liganden behandelte Kulturen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Wundheilungsrate im Vergleich zur Kontrollbehandlung.

Ein reproduzierbarer Effekt auf die Reepithelialisierung konnte jedoch für den NF-κB-Inhibitor BAY 117082 nachgewiesen werden. Zugabe von 10 µM BAY 117082 zum Kulturmedium reduzierte den Wundschluss an Tag 4 im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle, 50 µM verhinderten die Wundheilung vollständig.

4. DISKUSSION

In den letzten Jahrzehnten wurden unterschiedliche *in vitro*-Wundmodelle entwickelt. Angefangen beim einfachen *scratch assay*, wurden komplexere Hautmodelle, wie eine nachgebildete Epidermis auf einer entzellularisierten Dermis (DCD) (Kroeze et al. 2012), *ex-vivo*-Haut (Xu et al. 2012) oder kollagenbasierte organotypische Kokulturen (Garlick & Taichman 1994) zur Untersuchung der Wundheilung der Haut verwendet. Die Ähnlichkeiten dieser Modelle mit der Haut *in vivo* sind jedoch recht begrenzt. Eine Einzelschicht an Zellen, wie im *scratch assay* verwendet wird, kann nicht die Interaktionen zwischen Zellen eines mehrschichtigen Gewebes erfassen. Die bisher verwendeten organotypischen Modelle, vor allem DCD und colOTCs konnten helfen, viele offene Fragen zu beantworten. Alle genannten Systeme sind jedoch mit einer maximalen Kultivierungszeit von etwa drei Wochen sehr kurzlebig. Bis zur Einstellung eines weitgehend homöostatischen Zustands der Epidermis ist eine deutlich längere Zeit nötig, zumal die zu untersuchende Phase der Wundheilung zur Vorkulturdauer hinzukommt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein *in vitro*-Modell mit der Möglichkeit zu deutlich längeren Kultivierungsdauern zu etablieren. Dadurch sollte erreicht werden, dass der Prozess der Reepithelialisierung und die dafür nötigen regulatorischen Prozesse weitreichender als bisher untersucht werden können. Außerdem sollte die Beteiligung epidermaler interfollikulärer Stammzellen (IES) an der Reepithelialisierung untersucht werden. Für beide Ziele war eine Verlängerung der Kultivierungsdauer bisheriger Modelle unerlässlich. Ein weitgehend homöostatischer Status von organotypischen Kulturen ist nach den bisher üblichen ein bis zwei Wochen Vorkultur noch nicht erreicht. Die Reifung des neu gebildeten Epithels dauert vier bis sechs Wochen und damit deutlich länger (Stark et al. 2004). Für die Detektion von IES als *label-retaining cells* (LRCs) ist eine Vorkulturdauer von etwa sechs Wochen zur *pulse-chase*-Markierung nötig, bevor die Wunde gesetzt werden kann.

4.1. ETABLIERUNG DES WUNDMODELLS

Zunächst wurde angestrebt, das von Garlick beschriebene kollagenbasierte Modell zu modifizieren und die so gesammelten Erfahrungen und spezifischen Anpassungen auf das scaOTC Modell, das sich als Langzeitmodell für die normalen epidermalen Keratinozyten als äußerst erfolgreich erwiesen hatte (Stark et al. 2004; Stark et al. 2006; Muffler et al. 2008), zu übertragen. Für die Etablierungsphase wurden colOTCs nach dem über lange Zeit reproduzierbar angewendeten Protokoll hergestellt (Stark et al. 1999). Es wurden verschiedene Techniken der Wundsetzung angewendet. In jedem Fall zeigten sich die colOTCs aber als hoch problematisch in der Handhabung und die Reepithelialisierung war bei den verwendeten Mediumbedingungen äußerst mangelhaft. Ob die aufgetretenen Defizite in der Wundheilungskapazität durch das Fehlen der bei Garlick zusätzlich verwendeten Supplemente, Transferrin und Triiodthyronin (T3), verursacht war, muss derzeit offen bleiben. Der Transferrin-Rezeptor wird aber während der Reepithelialisierung von den basalen humanen Keratinozyten in der Epithelzunge exprimiert (Fransson & Hammar 1992), was auf eine positive Wirkung von Transferrin auf die Wundheilung hindeutet. T3 beeinflusst die Differenzierung und die Expression von Plasminogenaktivator (PA) in humanen Keratinozyten (Isseroff et al. 1989) und hat somit potenziell Einfluss auf die Funktion von Keratinozyten während der Wundheilung. Ein entscheidender weiterer Unterschied zwischen dem Modell von Garlick und Taichman und unserem colOTC Modell war aber auch der Ursprung der Zellen. Während Garlick und Taichman sowohl Keratinozyten als auch Fibroblasten aus juveniler Vorhaut verwendeten, wurden in unserem Modell ausschließlich Zellen

4. DISKUSSION

aus adulter Körperhaut verwendet. Juvenile Vorhautzellen zeigen gegenüber adulten Körperhautzellen ein erhöhtes Proliferations- und Differenzierungspotential *in vitro* (Mcheik et al. 2014) und dies könnte die Reepithelialisierung auch auf einer weniger förderlichen Kollagenmatrix ermöglichen.

Auf Basis der scaOTCs konnte aber unter Verwendung der gleichen Zellen und Medien ein reproduzierbares Wundmodell etabliert werden. Zwei Faktoren könnten hierbei entscheidend gewesen sein: erstens die Fibroblastendichte und zweitens die Art der Matrix (nämlich Fibrinogen bzw. Fibrin). Für colOTCs wurde gezeigt, dass die Fibroblastendichte einen Einfluss auf die Expression der Keratine 6, 16 und 17 hat und dass sich mit zunehmender Fibroblastendichte auch der Proliferationsindex der Keratinozyten erhöhte (el-Ghalbzouri et al. 2002). Dabei wurden maximal 2×10^5 Fibroblasten pro ml Kollagen eingesetzt. Bei unseren colOTCs wurden wegen zu starker Kontraktion der Kollagenmatrix bei hoher Fibroblastendichte nur $7,5 \times 10^4$ Fibroblasten pro ml Kollagen verwendet. Im scaOTC-Modell wird die Matrixkontraktion dagegen durch das Zellulosegerüst verhindert, wodurch die Fibroblastendichte auf $2,5 \times 10^5$ erhöht werden konnte. Zudem werden die Fibroblasten nicht in Kollagen sondern als Fibrinklot vorgegeben. Es wurde schon früher gezeigt, dass Fibrin die Migration von Keratinozyten in einem DED-Modell mit Schnittwunde (Geer et al. 2002) und in einem Wundmodell rekonstruierter Haut mit zelleigener Fibroblastenmatrix als dermaler Anteil (Laplante et al. 2001) unterstützte. Entsprechend ist davon auszugehen, dass das bei der Herstellung der scaOTCs verwendete Fibringel die Migration der Keratinozyten unterstützte und in Verbindung mit der erhöhten Fibroblastenzahl die verbesserten Eigenschaften in Bezug auf eine stabile Reepithelialisierung bedingten.

4.2. CHARAKTERISIERUNG DES WUNDMODELLS

4.2.1. MARKEREXPRESSION

An den im ersten Schritt etablierten Wundmodellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenzfärbungen die Expression von Markerproteinen untersucht (Abbildung 7). Hierbei wurden die klassischen Differenzierungsmarker Keratin 10, Filaggrin und Involucrin, und Tenascin-C als Marker der extrazellulären Matrix erfasst.

In einem DCD-basierten Wundmodell war im neugebildeten Epithel bis zu 4 Tage nach Verwundung kein Keratin 10 nachweisbar, während Involucrin bereits in der migrierenden Epithelzone vorhanden war (Geer et al. 2002). Dies konnte auch in unserem Wundmodell gezeigt werden.

Nach einer Verletzung der Barrierefunktion der Haut wird Involucrin verstärkt in tieferen Zellschichten der Epidermis exprimiert, wie Experimente *in vivo* an humaner Haut (Törmä et al. 2008) und Untersuchungen an Haut von Neurodermitispatienten (Jensen et al. 2004) zeigten. Eine Verschiebung der Involucrin-Expression nach Verwundung wurde auch in diesem Modell gezeigt. Hier wurde Involucrin bereits in der migrierenden Epithelzone nachgewiesen, während sich die Expression nach der Konsolidierung des Epithels wieder normalisierte. Die verfrühte Expression von Involucrin könnte eine äußerst wichtige kompensatorische Reaktion der Haut auf die verlorene Barriere sein, indem bereits früh mit der Wiederherstellung der schützenden Hornschicht begonnen wird.

Filaggrin ist in der homöostatischen Haut, wie in scaOTCs zunehmend ab dem *Stratum granulosum* der Epidermis vorhanden (Stark et al. 1999). Eine transiente Überexpression von Filaggrin verursacht

4. DISKUSSION

den Zusammenbruch des Keratinnetzwerks und des Zellkerns (Dale et al. 1997), wodurch die Mitwirkung eines Keratinozyten an der Reepithelialisierung nicht mehr möglich ist. Wie bereits früher beschrieben (Laplante et al. 2001), blieben auch in diesem Wundmodell Filaggrin-positive Zellschichten mit dem *Stratum corneum* verbunden. Jedoch wurde bei Laplante Filaggrin bereits vor dem Wundschluss nahe der Wundkante in mehrschichtigen Zonen der Neoepidermis beschrieben. In scaOTCs konnte Filaggrin 14 Tage nach Verwundung und damit etwa 10 Tage nach Wundschluss wieder detektiert werden, was bestätigt, dass im Wundmodell nach der Heilung wieder ein vollständiger Ablauf der Differenzierung hergestellt wird.

Tenascin-C stellt einerseits einen Wundmarker dar, da es in der Haut am Wundrand, sowie im Stroma von Tumoren verstärkt exprimiert wird (Mackie & Tucker 1999). Andererseits ist es in der extrazellulären Matrix in organotypischen Hautkulturen dauerhaft vorhanden. Für die Expression von Tenascin-C ist dabei die Interaktion von Keratinozyten und Fibroblasten nötig und es kann vermutlich von beiden Zelltypen gebildet werden (Stark et al. 2004). Die Untersuchungen am Wundmodell bestätigen diese Befunde, indem Tenascin-C mit dem Voranschreiten der Reepithelialisierung vermehrt in die extrazelluläre Matrix, insbesondere nahe der Basallamina eingebaut wurde. Tenascin-C scheint dabei nicht nur wichtig für die Bildung der Matrix zu sein, sondern zumindest regulatorische Funktionen für die Wundheilung zu besitzen, wie Studien an Tenascin-C-KO-Mäusen nahe legen (Forsberg et al. 1996).

K17 ist in der sich entwickelnden fötalen Haut noch vorhanden, aber in der gesunden interfollikulären adulten humanen Epidermis nicht mehr nachweisbar (Coolen et al. 2010). In pathologischen Situationen konnte K17 auch in der adulten Haut nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um entzündungsassoziierte Erkrankungen wie Psoriasis und Dermatitis, die durch erhöhte Interferon- γ -Konzentrationen gekennzeichnet sind (Komine et al. 1996), sowie Hauttumore (Chen et al. 2014). K17 könnte aufgrund des Auftretens in wenig differenzierten Tumoren zusammen mit Vimentin und weiteren Proteinen ein EMT-Marker sein (Lan et al. 2013). Bei der Wundheilung kommt K17 eine wichtige Bedeutung zu. Es wird in humanen Hautwunden *in vivo* nach etwa 18 h exprimiert und ermöglicht zusammen mit seinem Bindungspartner K16 Änderungen in der Zellmorphologie, welche eine Voraussetzung für die Motilität von Keratinozyten sind (Paladini et al. 1996; McGowan & Coulombe 1998). Zu Beginn der migratorischen Phase war K17 am Wundrand, und schwächer werdend im intakten Gewebe vorhanden, wie dies *in vivo* von Paladini gezeigt wurde (Abbildung 8). Die Expression war transient und klang nach Wundschluss und Wiederherstellung der normalen Hautschichtung ab. Lediglich an den Wundkanten war auch zwei Wochen nach Verwundung noch K17 in suprabasalen und granulären Schichten nachweisbar, was auf eine lokal begrenzte Deregulation von Entzündungssignalen oder aber einen verlangsamten Turnover der langlebigen Keratine in diesem Bereich hindeutet.

Vimentin, das charakteristische Intermediärfilamentprotein der dermalen Fibroblasten, Melanozyten und Langerhans-Zellen wird unter homöostatischen Bedingungen nicht von den Keratinozyten gebildet. Wie auch K17 kann Vimentin in Wundsituationen auch von den Keratinozyten gebildet werden, wie z.B. Untersuchungen an Brandwunden *in vivo* gezeigt haben, wobei wird Vimentin durch Inflammationsmediatoren wie TNF und TGF β induziert wird (Yan et al. 2010). In unserem Wundmodell war die Expression von Vimentin im Vergleich zu K17 enger begrenzt. Vimentin war zwei Tage nach Verwundung in den basalen Keratinozyten nahe dem Wundrand und in der beginnenden Epithelzunge detektierbar. Fünf Tage n. V. war Vimentin dann aber auf die migrierende Epithelzunge beschränkt und mit zunehmender Stratifizierung der Neoepidermis nicht

4. DISKUSSION

mehr nachweisbar. Diese zeitlich und örtlich streng begrenzte Regulation von Vimentin demonstriert die hervorragend funktionierende Selbstbegrenzung der Epithelaktivierung nach Wundschluss in diesem Modell.

Die Befunde aus den Immunfärbungen des Wundmodells lassen auf eine weitreichende autokrine Regulation der Keratinozyten, oder eine parakrine Kreuzregulation mit Fibroblasten im Verlauf des Prozesses der Reepithelialisierung schließen, da diese die einzigen im Modell vorhandenen Zellpopulationen sind. So sind für die Regulation des Übergangs der Keratinozyten aus dem Vimentin- und Keratin 17-negativen Zustand zum aktivierten Wundheilungszustand und zurück zum Ausgangszustand keine Lymphozyten nötig. Auf mögliche Regulationsmechanismen und involvierte Signalwege soll im Kapitel 0 weiter eingegangen werden.

4.2.2. WUNDHEILUNGSKINETIK

Die Zeitreihe für die Erfassung der Wundheilungskinetik wurde mit scaOTCs erstellt, die für zwei Wochen unter Luftexposition vorkultiviert waren. Die Untersuchung histologischer Schnitte zeigte, dass sich an der Schnittseite innerhalb des ersten Tages eine runde Auswölbung aus basalen und suprabasalen Zellschichten bildete (Abbildung 9). Hierbei könnte es sich zunächst um ein passives Herausquellen der Zellen aus dem Gewebeverband handeln. Nach 20 bis 24 h begann dann die aktive Migration mit einer Migrationsrate von 1,2 mm/Tag.

Eine initiale Verzögerung der Migration von 18 bis 24 h wurde auch für die Situation *in vivo* beschrieben (Coulombe 1997). Die Migrationsrate von 1,2 mm/Tag, liegt über dem für menschliche Haut ermittelten physiologischen Wert von etwa 0,3 mm/Tag (Laplante et al. 2001). Beinhaltet, wie in der Arbeit von Laplante, beschrieben, die Wundheilung auch die Verzögerungsphase, so ergibt sich für unser Modell eine Migrationsrate von 0,9 mm/Tag. Bei Verwendung eines auf colOTC-basierenden Wundmodells, in dem zusätzlich noch Fibrin zugegeben wurde, ermittelte Laplante eine Migrationsrate von 0,8 mm/Tag, also einen Wert der dem unseren sehr nahe kommt und ebenfalls auf einer Fibrinmatrix basiert. Bekanntermaßen fördert Fibrin die Migration von Keratinozyten und beruht auf einer spezifischen Wirkung der bei der Prozessierung von Fibrinogen durch Thrombin entstehenden Fibrinopeptide (Ronfard & Barrandon 2001). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass die große Menge an Fibrin für die hohe Wundheilungsrate in unserem Modell mitverantwortlich war.

4.3. SERUMGEHALT DES MEDIUMS

Ein zweiter Faktor der wesentlich die Wundheilung beeinflusst, ist sicherlich das Serum. In unserem Modell wurde grundsätzlich Serum-haltiges Medium verwendet. Fötale Kälberserum (FCS) trägt maßgeblich zur Versorgung kultivierter Zellen mit essenziellen Wachstumsfaktoren bei. Diese sorgen zwar in erster Linie für Überleben und Proliferation der Zellen, beeinflussen aber auch die Migration von Keratinozyten. So wurde in *scratch-assays* gezeigt, dass eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren migrationsfördernd auf humane Keratinozyten wirken (Li et al. 2006). Um die Rolle von FCS in der Wundheilung zu untersuchen, wurden die Wundmodelle mit unterschiedlichem Serumgehalt supplementiert. Interessanterweise kam es bei den untersuchten FCS-Konzentrationen nur zu signifikanten Unterschieden, wenn überhaupt kein Serum zugesetzt wurde. Unterschiede zwischen den Ansätzen mit 2%, 5% und 10% FCS waren nicht nachweisbar. Mit serumfreiem Medium sank dagegen die Wundheilungsrate (48h n.v.) auf die Hälfte. Die nahezu identischen Wundheilungsraten mit den verschiedenen FCS-Konzentrationen lassen den Schluss zu, dass für die Reepithelialisierung geringere Konzentrationen an Serumfaktoren bereits ausreichen.

4. DISKUSSION

Da die Kulturen grundsätzlich mit 10% FCS vorkultiviert und erst 2 Tage vor der Verwundung auf die jeweilige Serumkonzentration gesetzt worden waren, und dem Fakt, dass auch ohne jegliche FCS-Supplementation die Reepithelialisierung, wenn auch verzögert, ablaufen konnte, lässt eine weitere Hypothese zu. Es ist nicht auszuschließen, dass es während der Vorkultivierung zu einem „Vorrat“ an Matrix-gebundenen Faktoren kam. So ist beispielsweise für TGF β bekannt, dass es in inaktiver Form, als sog. latenter Komplex, sezerniert wird und in dieser Form im Medium vorliegen, oder aber an die ECM gebunden sein kann (Annes et al. 2003). Für Letzteres sprechen in der Tat Versuche, in denen die scaOTCs nach der Vorkultivierung in 10% FCS-haltigem Medium für bis zu 12 Tage ohne Serum gehalten wurden. Bereits nach sechs Tagen waren Unterschiede in der Zahl der Zellschichten im Vergleich zu den Kontrollkulturen deutlich. Nach 12 Tagen waren die Kulturen ohne Serum weitgehend atrophisch, was durch den signifikant niedrigeren Anteil an Ki67-positiven Zellen verdeutlicht wurde. Daher scheint eine Untersuchung der Wundheilung ohne Serumversorgung nur für die akute Phase der Reepithelialisierung möglich. Jedoch könnte gerade dieser Umstand der Erforschung einer sequenziellen, definierten Supplementierung dienen, die für die Reepithelialisierung sowie die anschließende Regeneration und Erhaltung der Epidermis erforderlich ist. Die Möglichkeit, die Wundheilungsrate durch die Versorgung mit Supplementen in Form von Serum maßgeblich zu beeinflussen, belegt weiterhin, dass dieses *in vivo*-ähnliche Wundheilungsmodell dafür geeignet ist, die Effekte pharmakologischer Faktoren auf die Reepithelialisierung unmittelbar zu testen.

4.4. VORKULTURDAUER

Während der Morphogenese organotypischer Kulturen kommt es nach anfänglicher Hyperproliferation allmählich zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Proliferation und Differenzierung, zur Homöostase. Für colOTCs wurde gezeigt, dass der Anteil proliferativer basaler Keratinozyten (*BrdU-labeling index*) während der ersten 14 Tage luftexponierter Kultivierung von knapp 50% auf etwa 10% sinkt (Stark et al. 1999). In scaOTCs vollzieht sich dieser Prozess etwas langsamer, dafür wird nach sechs Wochen ein Index von etwa 5% erreicht (Stark et al. 2004). Diese verringerte Proliferation ist vermutlich ein Faktor, der die Wundheilungsrate mit zunehmender Reifung des Epithels sinken lässt.

Im Laufe der Morphogenese der Epidermis und Einstellung der Homöostase findet ein Umbau der extrazellulären Matrix, insbesondere der Basalmembran (Breitkreutz et al. 1998), zusammen mit einer Normalisierung der Integrinexpression und Integrinverteilung (Breitkreutz et al. 1997) statt. Die Fähigkeit zur Migration von Zellen ist wesentlich von Integrinen abhängig (Martins-Green 2013). Daher ist zu vermuten, dass die verzögerte Wundheilung gereifter scaOTCs in Zusammenhang mit einer geänderten Integrinausstattung steht.

Die erläuterte Abhängigkeit zwischen Vorkulturdauer und Wundheilung zeigt einen sigmoiden Verlauf. Die größte Steigung weist die Kurve zwischen zwei und fünf Wochen, genauer bei 3,75 Wochen auf und flacht zum spätesten untersuchten Zeitpunkt zehn Wochen ab. Dies lässt darauf schließen, dass im Zeitraum zwischen zwei und fünf Wochen nach Luftexposition gravierende Änderungen im Epithel stattfinden, welche Einfluss auf den „Aktivierungsgrad“ der Keratinozyten haben. Diese konzertierten Prozesse beinhalten vermutlich Änderungen der Proliferationsrate, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen, sowie des Zytokin- und Wachstumsfaktorexpression.

Der dargestellte Zusammenhang zwischen Vorkulturdauer und Wundheilungsrate demonstriert deutlich, dass die Verwendung von lange kultivierbaren scaOTCs es ermöglicht, (i) den Prozess der

4. DISKUSSION

Keratinocyten-Aktivierung nach Verwundung *in vitro* darzustellen, (ii) daher den Wundheilungsprozess umfänglicher zu untersuchen, als dies mit bisherigen Modellen möglich war und (iii) eindrucksvoll die enorme Plastizität und das hohe regulatorische und regenerative Potenzial von Keratinocyten abzubilden.

4.5. MODIFIKATION DES WUNDMODELLS

4.5.1. VERWENDUNG VON HACAT-ZELLEN

Die humanen HaCaT-Keratinocyten sind eine intensiv genutzte Zelllinie, die noch wesentliche Differenzierungsmerkmale normaler Keratinocyten besitzt (Boukamp et al. 1988). So sind allein für das Jahr 2014 in PubMed unter dem Suchbegriff HaCaT 353 Artikel zu finden. HaCaT-Zellen können lange passagiert und genetisch modifiziert werden (Boukamp et al. 1988; Fusenig et al. 1990; Falkowska-Hansen et al. 2010). Damit sind diese Zellen für funktionelle Studien bestens geeignet und wurden bisher auch häufig für z.B. Migrationsexperimente genutzt. In einem gut reproduzierbaren, dreidimensionalen Wundmodell könnten darüber hinaus genetisch modifizierte Zellen äußerst gewinnbringend für das Verständnis der Vorgänge bei der Wundheilung sein. Daher wurden HaCaT-Zellen in dem hier etablierten Wundheilungsmodell untersucht.

Auch durch die HaCaT-Zellen kam es in unserem scaOTC-basierten Wundmodell zur Reepithelialisierung des Wundbereichs innerhalb weniger Tage, wenn auch gegenüber normalen Keratinocyten tendenziell verzögert. Auffällig war bis 4 Tage nach Verwundung das vorrangig entlang der Fibrinmatrix und der Hornschicht des Wundrandes stattfindende Wachstum der Epithelzunge. Unterschiede zwischen normalen Keratinocyten und HaCaT-Zellen in Genexpression und Genregulation und daraus resultierend in der Epithelmorphogenese sind bekannt. So produzieren die HaCaT-Zellen z.B. bedeutend weniger TGF α . Dieser Faktor ist speziell für HaCaT-Zellen der Initiator der auto- und parakrinen Regulation bei der Geweberegeneration in der organotypischen Kokultur (Maas-Szabowski et al. 2003). So sezernieren HaCaT-Zellen durch das TGF α -Defizit weniger Interleukin-1, welches sowohl autokrin (Chen et al. 1995) als auch parakrin über GM-CSF (Mann et al. 2001) und KGF (Madlener et al. 1996) die Wundheilung begünstigt. Nach Madlener et al. ist KGF in HaCaT-Zellen für die Induktion von MMP10 verantwortlich, welches die Wundheilung begünstigt. Gerade das Fehlen einer zentralen Protease könnte erklären, warum HaCaT-Zellen um den Fibrinpfropf herum migrieren anstatt ihn zu modifizieren. Von den genannten Proteinen sind IL-1 α , IL-1 β , GM-CSF und MMP10 in der Genexpressionsanalyse mit den normalen Keratinocyten (Kapitel 3.5.2.1) stark hochreguliert, was deren Bedeutung für die Wundheilung unterstreicht.

Zwei Wochen nach Verwundung war auch in den HaCaT-Kulturen ein ausgeprägtes hyperplastisches Epithel zu erkennen. Die Differenzierung blieb im Vergleich zu normalen humanen Keratinocyten unvollständig, was jedoch für die HaCaT Zellen nicht ungewöhnlich ist (Schoop et al. 1999). Somit zeigen diese Ergebnisse, dass HaCaT-Zellen für Untersuchungen in diesem Wundmodell prinzipiell geeignet sind, wenn auch die Besonderheiten der HaCaT-Zellen berücksichtigt werden müssen. Prinzipiell bilden diese Ergebnisse aber eine gute Grundlage zur weiteren funktionellen Untersuchung der Reepithelialisierung im dreidimensionalen Gewebekontext mit Hilfe genetisch modifizierbarer bzw. genetisch veränderter Zelllinien.

4. DISKUSSION

4.5.2. VERWENDUNG VON CDM-KULTUREN

Organotypische Hautmodelle mit von Fibroblasten gebildeter extrazellulärer Matrix (*cell-derived matrix*, CDM) als dermales Äquivalent wurden bereits vor über zehn Jahren als *in vitro*-Wundmodelle verwendet (Laplanche et al. 2001). Die Herstellung der CDM nach dem von Laplanche verwendeten Verfahren (Michel et al. 1999) ist arbeitsintensiv und durch die nötigen Manipulationen - es werden einzelne Fibroblastenlagen aufeinander gestapelt - anfällig für hohe Variabilität und Infektion. Vermutlich wurden daher, trotz der Vorteile einer reinen von Fibroblasten synthetisierten, also authentischen dermalen Matrix, weiterhin viele Studien an anderen Modelltypen durchgeführt. Besonders kommerzielle, auf Kollagen basierende Modelle (Apligraf®, MatTek EpiDerm™) und Modelle auf Basis entzellularisierter Dermis (Ojeh & Navsaria 2014; Xie et al. 2010) fanden und finden Verwendung.

Vorteile von CDM-Kulturen sind, dass keine artfremden Matrixbestandteile wie Ratten- oder Rinderkollagen nötig sind, dadurch keine vorzeitige Selbstdegradation induziert wird und keine Vorkontraktion nötig wird, und auch keine inerten oder biologisch abbaubaren Gerüstfasern nötig sind. Damit wird die Matrix lichtdurchlässig und eignet sich sogar für konfokale Mikroskopie *in situ*. Diese Eigenschaften können in Zukunft, dank der Weiterentwicklung, Optimierung und Vereinfachung des Herstellungsprozesses (Berning et al. 2015), in größerem Maße für Wundheilungsstudien genutzt werden.

Ziel des Wundheilungsexperiments in dieser Arbeit war es, die Eignung von CDM-Kulturen für die Anwendung als Wundmodell zu untersuchen. In diesem Ansatz wurde primär ein Fibroblasten-basiertes dermales Äquivalent erstellt, indem sich durch 4 Wochen „Reifung“ eine geeignete Matrixdicke entwickelt hatte. Die Kokultur mit Keratinozyten wurde von 2 Wochen (Laplanche et al. 2001) auf 5 Wochen verlängert. Diese verlängerte Kokultivierungsphase erlaubte eine weitere Reifung des Epithels, um so dem physiologischen Zustand der homöostatischen Epidermis näherzukommen (vgl. Kapitel 3.3.2). Erst dann kam es zur eigentlichen Verwundung der Kultur. Drei Tage nach Verwundung hatte sich vergleichbar den scaOTC-Wundkulturen auch in diesem Modell eine wenig geschichtete Epithelzunge gebildet. Nach Wundschluss lag auch hier ein hyperplastisches Wundepithel vor. Zwar war in der Wundmitte atypische parakeratotische Differenzierung erkennbar, die darüber liegenden regulären Hornschichten (Orthokeratose) weisen jedoch auf eine zunächst regulär verlaufene Differenzierung hin. Eine solche fehlerhafte Differenzierung zu diesem späten Zeitpunkt trat vereinzelt auch in Wundexperimenten mit scaOTCs auf und gibt somit die biologische Variabilität bei der Verwendung von Hautzellisolaten wieder. Diese Deutung bestätigte sich in einer Vielzahl weiterer Experimente. Prinzipiell hat sich jedoch gezeigt, dass auch das cdmOTC-Modell für Wundheilungsstudien verwendet werden kann. In Verbindung mit der bereits genannten Lichtdurchlässigkeit eröffnen sich, im Unterschied zu anderen Modellen, Möglichkeiten zur Echtzeitbeobachtung der Reepithelialisierung durch Lebendzellmikroskopie. Eine zusätzliche erweiterte Nutzenanwendung könnte sich durch eine Lebendzellmarkierung von LRCs ergeben, welche für scaOTCs mit HaCaT-Zellen bereits beschrieben wurde (Falkowska-Hansen et al. 2010).

4.6. LABEL-RETAINING CELLS

Über epidermale Stammzellen in der Wundheilung ist bereits umfangreiches Wissen vorhanden, wie die zahlreichen Reviews der letzten Jahre zeigen (Gurtner et al. 2008; Lau et al. 2009; Plikus et al. 2012; Staniszewska et al. 2011; Arwert et al. 2012). Dabei wurden aber nahezu ausschließlich die Stammzellen des Haarfollikels in der Maus untersucht. Dies ist verständlich, da es bei der Wundheilung behaarter Maushaut primär zu einer starken Kontraktion kommt durch die die verbleibenden Haarfollikel wieder dicht aneinander gebracht werden. Es wurde deshalb lange vermutet, dass in der Maus prinzipiell die Haarfollikelstammzellen für die Wundheilung verantwortlich sind. Erst durch Wundexperimente an unbehaarter Schwanzhaut wurde gezeigt, dass auch die Stammzellen der interfollikuläre Epidermis (IES) für die Wundheilung ausreichend sind (Langton et al. 2008). Die Eigenschaften von IES in der Homöostase sind äußerst umstritten.

Insbesondere die Rolle humaner IES während der Wundheilung ist noch weitgehend unbekannt. Ein Grund hierfür ist, dass es für die humanen IES keine wirklichen Marker gibt, die es erlauben, diese Zellen im Gewebeverband eindeutig zu identifizieren (Boehnke et al. 2012). Ein generell anerkanntes Kriterium für die epidermalen Stammzellen ist, dass sie sich im Gegensatz zu den Zellen, die für die Regeneration der Epidermis verantwortlich sind, nur sehr selten teilen. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um zunächst in Mäusen und später auch in OTCs mit menschlichen Keratinozyten die IES als sog. *label-retaining cells* (LRCs) zu markieren (Bickenbach 1981; Muffler et al. 2008). Um eine solche Markierung zu gewährleisten, ist jedoch eine Zeitspanne von 8 Wochen erforderlich und entsprechend war die Verfügbarkeit eines Wundheilungsmodells mit langer Kultivierungsdauer eine grundlegende Voraussetzung. Da mit den scaOTCs sowohl die Langzeitkultivierung als auch die Markierung der Stammzellen als LRCs möglich war, konnte in diesem Modell die Frage nach der Rolle der Stammzellen in der Wundheilung erstmals angegangen werden.

Die Analyse der LRC-Dichte in drei verschiedenen Zonen - wundfern, wundnah, migrierendes Wundepithel - zeigte eine ausgeprägte Dynamik des Stammzellreservoirs. Die durchweg konstante LRC-Dichte in der wundfernen Zone legt nahe, dass dieser Bereich durch die Verwundung weitgehend unbeeinflusst blieb. Damit konnte der LRC-Anteil von etwa 6% in dieser Zone als Basiswert des homöostatischen Epithels angesehen werden. Der 1,3 mm breite wundnahe Bereich wies nach drei Tagen einen Anteil von 13% LRCs auf. Nach 5 und 13 Tagen verringerte sich die Zahl jedoch wieder deutlich und näherte sich dem Basiswert des wundfernen Bereichs an. Der Wundbereich selbst wies die höchste Dichte an LRCs auf. In der migrierenden Epithelzunge konnten ca. 13% LRCs detektiert werden, zum Wundschluss nach fünf Tagen waren es 20% und nach 13 Tagen und zunehmender Konsolidierung des Epithels wieder 13%.

Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass es früh nach der Verwundung zu einer Anreicherung von Stammzellen im wundnahen Bereich kommt und dass diese Stammzellen bevorzugt für die Wundepithelialisierung verantwortlich sind. Im Wundbereich kam es dagegen zu massiver Proliferation der LRCs, was den Anstieg auf 20% erklären kann. Mit anhaltender Proliferation, die für die Etablierung des schließlich hyperplastischen Wundepithels nötig ist, wird das Label in den markierten Zellen jedoch zunehmend verdünnt und ist, wie nach der ersten *chase*-Periode, schließlich nicht mehr nachweisbar. Hieraus leitet sich auch die Abnahme der Zahl von LRCs nach 13 Tagen ab. Interessanterweise war aber eine LRC-Fraktion von ca. 13% auch noch nach 13 Tagen nachweisbar. Dies spricht dafür, dass in der Tat eine hohe Fraktion potentieller Stammzellen in den Wundbereich einwandert und sich dort auch etabliert, d.h. dort verbleibt.

4. DISKUSSION

Diese großen Änderungen im Stammzellpool können durch verschiedene Mechanismen erklärt werden: mit Vermehrung der LRCs in der wundnahen Zone und im Wundbereich durch verstärkte Proliferation, mit gerichteter Migration von LRCs in Richtung Wunde (Mascré et al. 2012), oder indem LRCs in der Basalschicht verbleiben, während nicht markierte TA-Zellen durch den Differenzierungsprozess aus der Basalschicht entfernt werden (Safferling et al. 2013).

Unabhängig vom Mechanismus der Stammzellenanreicherung, zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente erstmals auch für die humane Wundregeneration, dass potenzielle Stammzellen, die LRCs, mit der Migration der Epithelzunge in der gesamten Wunde angereichert werden und dort an der Reepithelialisierung beteiligt sind.

4.7. GENEXPRESSIONSANALYSE

Die Genexpressionsanalyse ist eine wesentliche Methode, um komplexe regulatorische Zusammenhänge in biologischen funktionellen Prozessen darzustellen. In der Vergangenheit wurden bereits Studien zur Untersuchung der Genexpression in der Haut durchgeführt. So wurden die Expressionsmuster von humaner Haut, rekonstituierter Epidermis und Keratinozyten in Monokultur verglichen (Gazel et al. 2003), die Auswirkungen von Verwundung auf die Expression von ausgewählten Genen in Apligraf® untersucht (Falanga et al. 2002), oder das Expressionsprofil von Keratinozyten nach Behandlung mit Faktoren wie z. B. TNF α erstellt (Banno et al. 2005). Diese Studien haben dazu beigetragen, einzelne Aspekte des überaus komplexen Prozesses der Wundheilung zu beleuchten. Eine globale Expressionsanalyse der beiden Hauptzellarten der Haut, wie sie in dieser Arbeit angestrebt wurde, wurde, soweit bekannt, bisher jedoch noch nicht erstellt. Somit sollte die hier beschriebene Analyse einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Genregulation (in der Epidermis) während der Wundheilung leisten und die physiologische Relevanz und regulatorische Komplexität des etablierten Langzeit-Wundmodells belegen.

4.7.1. DNA-MICROARRAY

4.7.1.1. Epidermis

Ausgewählte Gene wurden nach ihren Funktionen gruppiert. Es wurde eine differentielle Expression von Genen ermittelt, die für die Reepithelialisierung an sich, sowie für weitere wundassoziierte Prozesse bedeutend sind. Dadurch sollte die Aussagekraft der Expressionsanalyse, sowie weitergehend die Güte des Wundmodells als Ersatz für Versuche *in vivo* beurteilt werden. So kam es z.B. zur Expression von wundassoziierten Keratinen. Die Genexpressionsdaten belegten, dass die Keratine 17, sowie 6 und 16 im Modell nach Verwundung transient induziert werden, was die Situation in humaner Haut *in vivo* widerspiegelt (Paladini et al. 1996). Für Keratin 17 konnte die *de novo*-Induktion auch durch den Immunfluoreszenz-optischen Nachweis des Proteins geführt werden. Ebenso wurde die Expression aller Untereinheiten von Laminin 332, die für die Migration der Keratinozyten essenziell sind (Zhang & Kramer 1996), induziert. Auch Integringene und Gene integrinassoziiierter Proteine, die für die Migration, Dynamik von Kontaktstrukturen und Zelladhäsion bedeutsam sind, wiesen eine ausgeprägte Dynamik auf. So waren ITGA5, ITGAV, ITGB1, FERMT1 (Kindlin-1) und PTK2 (FAK) (Kiwanuka et al. 2013; Margadant et al. 2013 Herz et al. 2006; Schlaepfer et al. 2004) im Langzeit-Wundmodell transient reguliert.

Zusätzlich zu den Genen, die für die Motilität der Keratinozyten verantwortlich sind, wiesen auch Gene für extrazelluläre Signalmoleküle wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Interleukine eine ausgeprägte Regulation auf. So wurde z.B. nach Verwundung die RNA der VEGFs sowie des ebenfalls

4. DISKUSSION

auf Blutgefäße wirkenden Endothelin-1 (EDN1) hoch-reguliert. Dies spricht dafür, dass während der Reepithelialisierung von den Keratinozyten im Wundbereich vasokonstriktorisch wirksame Signale ausgesendet werden, was nach Verwundung eine sinnvolle Reaktion darstellt, um Blutverlust und Kontamination der Blutbahn entgegen zu wirken. EDN1 ist außerdem ein Wachstumsfaktor für Melanozyten, welche für die Pigmentierung der regenerierten Epidermis verantwortlich sind (Yohn et al. 1993). Weitere konzentriert regulierte Wachstumsfaktoren waren TGFA, HBEGF und GM-CSF, die autokrin auf Keratinozyten wirken und deren Proliferation und Differenzierung unterstützen (Maas-Szabowski et al. 2001).

Die Induktion verschiedener Chemokine und proinflammatorischer Interleukine kann als „Alarmsignal“ der verwundeten Keratinozyten gedeutet werden. Die Neoexpression dieser Faktoren kann zu einer beträchtlichen Entzündungsreaktion mit Rekrutierung von verschiedenen Immunzelltypen führen und stellt eine essenzielle Maßnahme zur Verhinderung einer drohenden Infektion nach Verletzung der Barrierefunktion der Haut dar. Die Keratinozyten sorgen durch eine Leukozyten-unabhängige angeborene Immunantwort aber auch selbst für die Abwehr von Pathogenen. Hierfür wird die Expression von β -Defensinen, insbesondere hBD-2 induziert. Eine zusätzliche Unterstützung der Wundheilung beruht auf der verstärkten Expression von MMPs. Die Proteasen sind für den Umbau der extrazellulären Matrix verantwortlich, um im Wundgewebe zerstörtes Material abzubauen, die Migration von Keratinozyten, aber auch Fibroblasten zu unterstützen und Wachstumsfaktoren zu aktivieren und freizusetzen.

Solche dynamischen Expressionsprofile wurden bereits in unterschiedlichen Studien zur Wundheilung beschrieben. Neu ist jedoch, dass das Verhalten der Keratinozyten über die akute Phase der Wundheilung hinaus im dreidimensionalen Kontext analysiert wurde und dass diese Analysen spezifisch für die Keratinozyten waren. D.h. Kontamination durch RNA von anderen Zelltypen, hier speziell den dermalen Fibroblasten kann weitgehend ausgeschlossen werden. Damit wurde hier nicht nur eine neue umfangreiche Datenbasis für zukünftige weitere Analysen und Experimente geschaffen. Vielmehr zeigen diese Analysen auch erstmals—dass die Keratinozyten während des Wundheilungsprozesses Faktoren exprimieren, die bisher weitgehend anderen Zellarten zugeschriebene wurden und so Funktionen wie z.B. die Entzündungsreaktion, die Modulation der Angiogenese, den Umbau der EZM oder die Abwehr von Pathogenen wenigstens partiell mit regulieren.

4.7.1.2. *Signalweganalyse Epidermis*

Die durchgeführte genomweite Genexpressionsanalyse sollte einen weitreichenden Überblick über die Regulation der Reepithelialisierung während eines Zeitraumes von zwei Wochen geben. Die dabei ermittelte große Zahl an differenziell regulierten Genen verschiedenster funktioneller Gruppen erforderte die Verwendung einer Software zur Offenlegung regulatorischer Zusammenhänge und zur Bewertung funktioneller Auswirkungen komplexer Regulationsmuster. Die kommerzielle Software *QIAGEN's Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®)* greift auf eine umfassende Sammlung publizierter Daten zur Wechselwirkung verschiedener biologischer und pharmakologischer Moleküle und deren Auswirkungen auf biologische Prozesse zurück. Durch Abgleich der gefilterten Expressionsdaten mit der Datenbank berechnet *IPA®* Wahrscheinlichkeit und Umfang der Aktivierung oder Deaktivierung definierter biologischer Funktionen, Signalwege und vorgeschalteter Regulationselemente. Dies umgesetzt für die Genregulation während der Wundheilung ergab folgende Zusammenhänge: (i) während der migratorischen Phase (Zeitpunkte zwei und fünf Tage n. V.) fanden die intensivsten

4. DISKUSSION

Änderungen der Genexpression statt. (ii) Zu diesen Zeitpunkten kam es zu einer großen, jedoch nicht vollständigen Überlappung der Regulationsmuster. (iii) Nach Wundschluss veränderte sich das Expressionsmuster signifikant, es kam zu einer Wiederannäherung an den Ausgangszustand.

Durch die Signalweganalyse wurden funktionelle Gruppen von Genen ermittelt, die z.B. für die Reepithelialisierung essenziell sind, wie die Zellbewegung und Zytoskelett-Reorganisation, die für die Immunzellaktivierung stehen, sowie Funktionseinheiten, die für die Krebsentstehung von Bedeutung sind aber gleichermaßen auch bei der Wundheilung aktiviert werden (Pedersen et al. 2003, Schäfer & Werner 2008). Dabei war ausschlaggebend, dass das hier verwendete Wundmodell nicht nur die frühe, akute Phase der Wundheilung darstellt, wie dies in bisherigen Studien häufig der Fall war (Pedersen et al. 2003; Roy et al. 2008). Vielmehr konnte auch die Konsolidierung der durch Verwundung hervorgerufenen Aktivierung und Inflammation zum Ausgangszustand abgebildet werden.

Interessant war in diesem Zusammenhang war auch Regulation inflammatorischer Gene. So kam es im zeitlichen Verlauf zu einer Verschiebung der Inflammation von einer IL-1-/TNF-dominierten (früh) zu einer Interferon-dominierten Reaktion (spät). Dies ist wesentlich, da ja in den Kulturen keine inflammatorischen Zellen vorliegen. D.h. um eine Entzündungsreaktion mit Expression verschiedener Zytokine und Interleukine hervorzurufen sind keine „klassischen“ inflammatorischen Zellen nötig. Dies steht im Widerspruch zu Experimenten mit PU.1-Null-Mäusen, die durch das Fehlen von Makrophagen und Neutrophilen stark reduzierte Inflammation zeigen und nach Verwundung keine entzündungsrelevanten Änderungen der Genexpression aufweisen (Cooper et al. 2005). Diese, wie auch weitere Expressionsanalysen untersuchten lediglich frühe Zeitpunkte (bis 24 h) nach Verwundung (Fitsialos et al. 2007; Cole et al. 2001), was den Unterschied zu den Befunden in dieser Arbeit möglicherweise erklären könnte.

Beim Vergleich der Expressionsdaten mit von IPA vorgeschlagenen vorgeschalteten Regulatoren fiel auf, dass TGF β 1 in der migratorischen Phase mit einem Z-Wert (softwareseitiges Maß für die Regulation) von etwa 5 deutlich als aktiviert prognostiziert war, obwohl das TGF β 1 Gen selbst in der Expressionsanalyse nicht signifikant reguliert war. TGF β wird eine wichtige Rolle in der Wundheilung zugeschrieben. Es wird in akuten kutanen Wunden von Leukozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Keratinozyten produziert, seine Effekte auf die Reepithelialisierung erscheinen jedoch widersprüchlich (Werner & Grose 2003). Latentes, EZM-gebundenes TGF β kann durch MMP9, welches zwei Tage nach Verwundung 32-fach induziert war, aktiviert werden. Dadurch ist eine massive Freisetzung von TGF β möglich, die eine plausible Erklärung für die Induktion von TGF β -abhängigen Genen auch ohne erhöhte TGF β -Expression liefern könnte. Ähnliches gilt für bFGF (*basic fibroblast growth factor*, FGF2), das als förderlich für die Wundheilung *in vitro* und *in vivo* gilt (Sogabe et al. 2006). bFGF wird in der dermalen Matrix an Heparansulfat gebunden und kann durch Umbau der Matrix wieder freigesetzt werden (Rifkin & Moscatelli 1989).

Durch die Signalweganalyse konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Genregulation während der Wundheilung wesentlich durch die bereits oben genannten entzündlichen Prozesse bestimmt wird. Da hier die Rekrutierung von Immunzellen oder parakrine Interaktion mit Melanozyten und Langerhanszellen keine Rolle spielen kann, wäre auch ein autokriner Einfluss auf die Keratinozyten z.B. für die Reepithelialisierung nicht auszuschließen. NF- κ B-vermittelte Signale können von TNF α , Interleukinen, Chemokinen oder *toll-like*-Rezeptoren stammen und eine Vielzahl von Effekten auf Genexpression und Zellfunktionen ausüben (Banno et al. 2004; Freedberg et al. 2001; Kroeze et al.

4. DISKUSSION

2012; Miller 2008). So kann z.B. TNF α in den normalen Keratinozyten BMP2 (*bone morphogenetic protein*) induzieren - beide Gene waren im Wundmodell zwei Tage n. V. hochreguliert. BMP2 kann wiederum Prozesse der epidermalen-mesenchymalen Transition (EMT) in den Keratinozyten auslösen (Yan et al. 2010). Hierbei kommt es u. a. zum Verlust von E-Cadherin und zur Neo-Expression von Vimentin. Gerade Letzteres ist ein Charakteristikum des Wundepithels auch in dem hier verwendeten Wundmodell. Hierdurch werden der zelluläre Zusammenhalt (Schwächung der Zell-Zell-Verbindungen) und die Rigidität des Zytoskeletts geschwächt, was wiederum die Migration unterstützt. Weitere NF- κ B-vermittelte Modifikationen des Zytoskeletts sind die Induktion des Wundheilungsmarkers Keratin 6 sowie die Repression der basalen Keratine K5 und K14 (Ma et al. 1997). NF- κ B-vermittelte EMT findet auch bei der Metastasierung von Tumoren statt (Huber et al. 2004).

Während EMT-Prozesse in Tumorzellen jedoch dysreguliert sind, laufen sie in gesunden Hautkeratinozyten während der Wundheilung zeitlich begrenzt und strikt reguliert ab. Daher sollte während der Wundheilung eher von einer phänotypischen Plastizität, als von einer regelrechten EMT ausgegangen werden.

Die Rolle der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs wird unterstützt durch Studien, in denen Kornea-Keratinozyten in *Scratch Assays* (in vitro Wundheilungsmodell) untersucht wurden. Hier wurde gezeigt, dass die I κ B-Kinase (IKK β) entscheidend für die Expression von Inflammationsmediatoren und für die Migration war (Chen et al. 2011). NF- κ B kann in Keratinozyten nicht nur durch TNF α oder IL-1 aktiviert werden, denkbar ist auch eine Induktion über TLRs. Die mRNA für TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10 werden von den Keratinozyten konstitutiv exprimiert (Mempel et al. 2003; Lebre et al. 2007). Ihre Rolle bei der Aktivierung des verwundeten Epithels und der Reepithelialisierung wurde aber erst in den letzten zehn Jahren intensiver untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung verschiedener TLRs durch ihre spezifischen Liganden Einfluss auf die Reepithelialisierung, die Sekretion von Entzündungssignalen und die Migration *in vitro* haben (Suga et al. 2014; Lin et al. 2012; Chen et al. 2013; Okamura et al. 2001; Dasu & Rivkah Isseroff 2012; Köllisch et al. 2005; Deonaraine et al. 2007). Dabei gab es auch Hinweise auf eine positive Wirkung auf die Wundheilung *in vivo*. Diese wurde aber weitgehend auf eine veränderte Infiltration der Wunde mit Makrophagen und Neutrophilen zurückgeführt. Dagegen zeigte sich bei *in vitro* Stimulationsversuchen, dass die Migration von Keratinozyten durch Lipopolysaccharide (LPS) gesteigert werden konnte und dass in TLR4-KO-Mäusen die Expression von promigratorischem IL-6 gehemmt war (Chen et al. 2013). Nachgewiesen wurde auch, dass durch die Aktivierung von TLRs die Expression von MMP1 und MMP9 induziert wurde (Lee et al. 2010). MMP1 ist ein Migrations- und EMT-Marker in den Keratinozyten (Stoll et al. 2012), während MMP9 in Wunden induziert wird und die Reepithelialisierung beeinflusst (Roy et al. 2008; Mohan et al. 2002).

Die Erkenntnisse aus den Expressionsanalysen sprechen dafür, dass insbesondere den unterschätzten und häufig unter ungeeigneten Bedingungen untersuchten Keratinozyten-assoziierten TLRs eine wichtige Rolle in der Wundheilung zuzuschreiben ist. Weitergehende Untersuchungen zu Effekten von Keratinozyten-assoziierten TLRs auf die Wundheilung scheinen daher ein vielversprechender Ansatz für funktionelle Experimente im Wundmodell. Die Ergebnisse hierzu werden in Kapitel 0 diskutiert.

4. DISKUSSION

4.7.1.3. *Dermis*

Die Daten zur Expressionsanalyse der dermalen Anteile des Wundmodells sollten Aufschluss geben über die Genregulation in den Fibroblasten während der unterschiedlichen Phasen der Reepithelialisierung und speziell auch über das Expressionsprofil von Faktoren, die für den Prozess der parakrinen Interaktion mit den Keratinozyten während der Wundheilung eine Rolle spielen. Leider konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die dermale RNA mit epidermaler RNA verunreinigt war. Darauf deutet die relativ große Zahl an Keratinozyten-spezifischen Genen hin, welche im dermalen Datensatz eine signifikante Dynamik zeigten. Dies waren beispielsweise Gene für Keratine, SPRRs und desmosomale Proteine. Weitere Analysen und Interpretationen der vorhandenen dermalen Daten erschienen daher wenig aussagekräftig und verlässlich. Zwar wurde beschrieben, dass durch mesenchymal-epitheliale Transition (MET), dem gegenläufigen Vorgang der erwähnten EMT, die Induktion epithelspezifischer Gene in Fibroblasten erfolgen kann (Shi et al. 2013), die vorliegenden Daten sprachen jedoch nicht für MET-ähnliche Vorgänge und stimmten nicht mit den von Shi et al. beschriebenen Expressionsänderungen überein.

Die beschriebene Kontamination ist durch die mechanische Trennung von Epithel und dermalen Äquivalent erklärbar. Beim Abziehen des Epithels ist die Zerstörung von basalen epidermalen Zellen und damit einer Freisetzung von RNA nicht auszuschließen. Eine relevante Kontamination von Dermis zu Epidermis ist dagegen weniger wahrscheinlich. Zudem übersteigt die Zahl an Keratinozyten insbesondere zu den Zeitpunkten fünf und 13 Tage nach Verwundung bei weitem die Zahl an Fibroblasten. Entsprechend würde sich eine geringe Verunreinigung mit Fibroblasten RNA nicht bemerkbar machen.

Eine Möglichkeit, die beschriebenen Probleme in zukünftigen Experimenten zu verhindern, wäre z.B. eine enzymatische Trennung (Dispase Behandlung) der beiden Kompartimente. Hierbei ist jedoch nicht auszuschließen, dass die hierfür benötigte Zeit Auswirkungen auf die Genexpression haben könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre die Trennung der Kompartimente durch eine poröse Membran, wie sie als Membraneinsätzen zur Kultivierung der OTCs Verwendung findet. Eine solche Trennschicht kann die Separation erleichtern und gleichzeitig die Diffusion nötiger Nähr- und Signalmoleküle erlauben, wobei jedoch Interaktionen, die nicht durch diffusible Faktoren gesteuert werden, beeinflusst werden können. Die Verwendung von cdmOTCs könnte eine weitere Möglichkeit darstellen da hier der Anteil an Fibroblasten wesentlich höher ist und sich damit ein mögliches Kontaminationsproblem deutlich vermindern würde.

4.8. FUNKTIONELLE ASPEKTE DES NF- κ B-SIGNALWEGS BEI DER WUNDHEILUNG

Wie bereits in Kapitel 0 erläutert, sprechen Daten aus der hier durchgeführten Genexpressionsanalyse, sowie Literaturbelege für eine essentielle Funktion von TLR-NF- κ B-vermittelten Signalen in der Reepithelialisierung. Diesem Umstand wurde in Wundheilungsexperimenten mit Behandlung der Kulturen mit TLR-Liganden und NF- κ B-Inhibitoren nachgegangen. Aus Literaturdaten wurden Liganden ausgewählt, für die eine Wirkung auf die Wundheilung der Haut nachgewiesen war. Zudem wurde das unspezifisch antiinflammatorisch wirksame Dexamethason, sowie der irreversible Inhibitor der I κ B- α -Phosphorylierung BAY 117082 untersucht. Nach Anwendung der in die Wunde eingebrachten TLR-Liganden konnte jedoch kein Effekt auf die Wundheilungsrate nachgewiesen werden, die Ergebnisse unabhängiger Experimente waren nicht konsistent.

4. DISKUSSION

Das Ausbleiben erwarteter Effekte kann vielerlei Ursachen haben, deren ausführliche Ergründung nicht Ziel der vorliegenden Arbeit war. Spekuliert werden kann jedoch über maskierende Effekte der FCS-Supplementation. Zwar wurde der Serumgehalt für die Stimulationsversuche auf 2% abgesenkt, was jedoch nicht unbedingt ausreichend war. Im verwendeten System könnten einerseits die Auswirkungen der TLR-vermittelten Signale zu gering sein, um über biologisch und methodisch bedingte Schwankungen hinaus messbar zu sein. Andererseits ist auch denkbar, dass zelleigene Bestandteile bereits für eine weitgehende Aktivierung verfügbarer TLRs verantwortlich sind und dadurch eine zusätzliche Aktivierung maskiert wird.

Für verschiedene Experimente wurden unterschiedliche Methoden zur Quantifizierung der Wundheilung verwendet. Aus statistischer Sicht ist die Vermessung der epithelialisierten Fläche (makroskopische Methode) der Vermessung weniger histologischer Schnitte (mikroskopische Methode) vorzuziehen. Die makroskopische Flächenvermessung konnte aus biologisch-technischen Gründen nicht in allen Experimenten angewendet werden. Dies erschwert die Vergleichbarkeit der Daten und beeinträchtigt zudem die Zuverlässigkeit der gewonnenen Daten erheblich.

Die Bedeutung des NF- κ B-Signalwegs für die die Wundheilung muriner Kornea, aber auch für die Migration von humanen Kornea-Keratinocyten und HaCaT-Keratinocyten wurden durch Experimente mit dem IKK α -Inhibitor TPCA-1 gezeigt (Chen et al. 2011). Dass dies auch für das Wundmodell gilt, zeigt der Effekt von BAY 117082. 10 μ M BAY 117082 zeigten, wenn auch nicht in allen Experimenten signifikant, eine reproduzierbare Wirkung. 50 μ M BAY 117082 verhinderten die Reepithelialisierung im Betrachtungszeitraum fast vollständig. Hier sind jedoch weiterführende Arbeiten nötig, um den Wirkmechanismus zu bestätigen und toxische Effekte auszuschließen.

4.9. FAZIT UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit konnte ein verbessertes humanes Wundheilungsmodell erfolgreich etabliert und seine Relevanz für die experimentelle Charakterisierung der Abläufe bei der Wundheilung dargestellt werden.

Das hier beschriebene Protokoll ist einfach durchführbar und gut reproduzierbar. Das Modell auf Basis von gerüstverstärkten organotypischen Kokulturen (scaOTCs) weist im Vergleich zu bisherigen Modellen wie entzellularisierter Dermis, kollagenbasierten organotypischen Kulturen und *ex vivo*-Haut eine deutlich längere Lebensspanne auf. Wunden können zu einer Zeit gesetzt werden, in dem die Epidermis nicht mehr aktiviert (hyperplastisch) ist, sondern sich bereits in einem homöostatischen regenerativen Zyklus befindet. D.h. selbst für 10 Wochen alten Kulturen konnte eine vollständige Reepithelialisierung der gesetzten Wunden dokumentiert werden. Da die Wundheilung zudem über die Phase der Reepithelialisierung hinaus beobachtet werden kann, sind auch Untersuchungen der Konsolidierungsphase nach Wundschluss, die mit dem Abklingen der Inflammation einhergeht, möglich. Nicht zuletzt erlaubt uns die Langzeitstabilität des scaOTC Modells, die epidermalen Stammzellen als *label-retaining cells* (LRCs) darzustellen und so erstmals die Rolle der Stammzellen während der Reepithelialisierung der gesetzten Wunden zu untersuchen. Durch Experimente mit LRCs konnte die Bedeutung interfollikulärer Stammzellen belegt werden. So konnte erstmals gezeigt werden, dass sich LRCs sehr schnell während der Reepithelialisierung in der migrierenden Epithelzunge anreichern und sich wieder als LRCs über den gesamten Wundbereich etablieren.

4. DISKUSSION

Da die Wundheilung auch nach Einführung verschiedener Modifikationen und mit unterschiedlichen Zellen mit vergleichbarer Dynamik stattfand, besteht nun die Möglichkeit, das Modell an unterschiedliche Fragestellungen anzupassen. So könnten genetisch modifizierte HaCaT-Zellen für funktionelle Studien, cdmOTCs für verbesserte Bildgebungseigenschaften und pharmakologische Moleküle oder biologische Supplemente zur Intervention bzw. Verbesserung der Wundheilung Verwendung finden.

Mit Hilfe von DNA-Microarrays wurden Genexpressionsprofile der epithelialen Keratinozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung erstellt. Die Analyse der dermalen Fibroblasten erschien durch die wahrscheinliche Kontamination mit epithelialer RNA nicht erfolgreich. Die Analyse der epithelialen Daten konnte die Qualität des Wundmodells aufzeigen, indem eine Vielzahl an bekanntermaßen in der Wundheilung relevanter Gene transient reguliert war. Auf RNA-Ebene regulierte Gene konnten auch immunhistologisch validiert werden. Die *in silico*-Signalweganalyse erlaubte zunächst Rückschlüsse auf funktionelle Zusammenhänge, welche nicht nur zur weiteren Validierung der Daten beitragen konnten, sondern auch die starke inflammatorische und selbstregulatorische Kapazität der Keratinozyten aufzeigen konnte. Dabei erschloss sich die bisher oft unterschätzte Bedeutung des NF- κ B-Signalwegs für die Regulation der Reepithelialisierung. Nicht zuletzt demonstrierten diese Ergebnisse auch die erhebliche intrinsische Plastizität der epidermalen Keratinozyten, die es ihnen ermöglicht, bei Verletzung des Gewebeverbandes autonom Mechanismen der *innate immunity* zu aktivieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wundheilung ist eine essentielle Fähigkeit der menschlichen Haut. Reepithelialisierung ist der Teilprozess der Wundheilung, bei dem die Barrierefunktion nach einer Verletzung wieder hergestellt wird. Hierbei spielen infollikuläre Epidermale Stammzellen (IES) eine entscheidende, aber wenig untersuchte Rolle. Pathologische Störungen der Wundheilung beeinträchtigen Millionen Menschen allein in Deutschland. Daher ist ein großer Bedarf für verbesserte Therapiemöglichkeiten vorhanden. Grundlage für die Entwicklung von therapeutischen Strategien ist ein vertieftes Verständnis der Regulationsvorgänge des Reepithelialisierungsprozesses. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, auf Basis gerüstverstärkter organotypischer Kokulturen (scaOTCs) ein verbessertes *in vitro*-Modell der menschlichen Reepithelialisierung zu etablieren, welches die Analyse der Genexpression und die Darstellung der IES während der Reepithelialisierung erlaubt.

Die physiologische Relevanz des Wundheilungsmodells mit deutlich verlängerter Kultivierbarkeit wurde zunächst anhand der Expression bekannter Wundheilungsmarker untersucht und bestätigt. Immunhistochemisch wurde die transiente und räumlich begrenzte Expression von u. a. Keratin 17 und Vimentin in Übereinstimmung mit der Wundsituation *in vivo* gezeigt. Die Auswirkungen grundlegender Parameter der Kulturbedingungen wurden untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass eine längere Kultivierungszeit vor Verwundung die Wundheilungsrate senkt, bzw. die Zeitspanne bis zum Einsetzen der Reepithelialisierung erhöht. Dies ist vermutlich durch den mit zunehmender Reife des Epithels sinkenden Aktivierungsgrad bedingt. Daneben wirkt sich die Verfügbarkeit von Signalmolekülen in Form von Serum-Supplementation drastisch auf die Lebensdauer und die Heilungsfähigkeit verwundeter OTCs aus.

IES können aufgrund fehlender Markerproteine nur als *label-retaining cells* (LRCs) detektiert werden. Die zur Generierung von LRCs durch *pulse-chase*-Markierung erforderlichen Kultivierungszeiten konnten in dieser Arbeit erstmals in einem derartigen Wundmodell gewährleistet werden. Der Anteil der LRCs stieg während der Reepithelialisierung von etwa 5% auf bis zu 20%, während der Anteil im intakten, wundfernen Epithel über den untersuchten Zeitraum konstant blieb. Dies lässt auf eine selektiv verstärkte Migration von LRCs in den Wundbereich schließen.

Durch globale Genexpressionsanalysen wurde die Genregulation der Epidermis während der Reepithelialisierung untersucht. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass bekannte Regulationsmuster der Wundheilung auch im Modell auftreten, obwohl hier die Regulation nur zwischen Keratinozyten und Fibroblasten und unter Ausschluss von Zellen der Blutbahn, bzw. autokrin stattfinden kann. Entzündungsfördernde Regulationswege, vermittelt durch Interleukin-1 und TNF standen im frühen Stadium der Reepithelialisierung im Vordergrund. Diese leiten vermutlich weitere, durch Wachstumsfaktoren vermittelte Signalkaskaden, sowie weitreichende Umbauten des Zytoskeletts ein. Es konnte gezeigt werden, dass diese tiefgreifenden Veränderungen reversibel waren und nach erfolgtem Wundschluss eine Annäherung an den Ausgangszustand erfolgte.

Die Ergebnisse zeigen, dass das etablierte Langzeit-Wundmodell im Gegensatz zu bisherigen *in vitro*-Modellen die Beobachtung der Reepithelialisierung von der Epithelreaktivierung durch die Verwundung bis zur Wiederherstellung der Homöostase erlaubt. Darüber hinaus eröffnet es die Möglichkeit zur Untersuchung von IES als LRCs, was mit bisherigen Modellen aufgrund der deutlich kürzeren Lebensdauer nicht möglich ist. Die Genexpressionsanalyse bietet wichtige Daten zur auto- und parakrinen Regulation der Keratinozyten.

6. ABSTRACT

Wound healing is an essential feature of human skin. Re-epithelialisation is the aspect of wound healing that re-establishes the barrier function of the skin after mechanical, chemical or biological disruption of the skin barrier. Interfollicular epidermal stem cells (IES) play a crucial, yet under-investigated role during this process. Millions of patients are affected by pathologic wound healing disorders in Germany, making novel treatment strategies indispensable. The development of these strategies in turn demands deeper insights into the complex concerted regulatory processes during re-epithelialisation. Therefore, the aim of this thesis was the development of an improved *in vitro* model of human skin wound healing, which would provide most physiological conditions for the investigation of IES contribution and the analysis of gene regulation during re-epithelialisation.

The physiologic relevance of the novel wound healing model is connected to the significantly prolonged cultivation period. It was first tested by fluorescence staining for well established marker proteins like Keratin 17 and vimentin, confirming that marker expression reflected the *in vivo* situation. Effects of vital culture conditions were investigated. It was shown that prolonged pre-cultivation resulted in extended lag-period before onset of re-epithelialisation and reduced the rate of wound healing. This is presumably caused by reduced levels of keratinocyte activation in largely homeostatic epithelia. Furthermore, the availability of signal molecules like growth factors by serum supplementation significantly affected the wound healing rate and the life span of the model system.

Due to the lack of reliable marker proteins, IES can only be visualized by pulse-chase labelling and consequent label-retention. A significantly extended life span is essential for the generation of label-retaining cells (LRCs) and was achieved for the first time in an *in vitro* wound healing model. Wound healing studies revealed the dynamics of the LRCs population during re-epithelialisation. The proportion of LRCs increased from 5% up to 20% during re-epithelialisation, while the proportion was stable in the distal part of the epithelium, pointing towards selectively enhanced migration of LRCs into the wound area.

Global gene expression analysis of keratinocytes during wound healing was performed. The results showed well-established patterns of gene regulation associated with wound healing. These complex patterns were caused only by autocrine regulation or keratinocyte-fibroblast interaction, as the model system is devoid of blood-derived cells. Interleukin-1 and TNF-mediated inflammatory pathways were strongly upregulated in the early migratory stage of re-epithelialisation, pointing to an initiating function for further signalling cascades and profound cytoskeleton remodelling. It was shown that these far-reaching changes were widely reverted after wound closure.

In contrast to previously published wound healing models, this novel long-term model of human skin wound healing allows the investigation of the wound healing process from epithelial activation through re-epithelialisation to re-established homeostasis. In addition potential interfollicular stem cells can be observed as LRCs in the context of wound healing for the first time. The gene expression data prove the relevance of the model system and provide valuable insights into the auto- and paracrine regulation of keratinocyte dynamics.

LITERATURVERZEICHNIS

- Alam, H. et al., 2011. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 22, pp.4068–4078.
- Allen, T.D. & Potten, C.S., 1974. Fine-structural identification and organization of the epidermal proliferative unit. *Journal of cell science*, 15, pp.291–319.
- Annes, J.P., Munger, J.S. & Rifkin, D.B., 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of cell science*, 116(Pt 2), pp.217–24.
- Appay, V. & Rowland-Jones, S.L., 2001. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends in immunology*, 22(2), pp.83–7.
- Arwert, E.N., Hoste, E. & Watt, F.M., 2012. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nature reviews.Cancer*, 12(3), pp.170–180.
- Banks-Schlegel, S. & Green, H., 1981. Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia. *Journal of Cell Biology*, 90(September), pp.732–737.
- Banno, T., Gazel, A. & Blumenberg, M., 2004. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *The Journal of biological chemistry*, 279(31), pp.32633–42.
- Banno, T., Gazel, A. & Blumenberg, M., 2005. Pathway-specific profiling identifies the NF-kappa B-dependent tumor necrosis factor alpha-regulated genes in epidermal keratinocytes. *The Journal of biological chemistry*, 280(19), pp.18973–80.
- Berning, M. et al., 2015. Three-Dimensional In Vitro Skin and Skin Cancer Models Based on Human Fibroblast-Derived Matrix. *Tissue Engineering Part C: Methods*, p.Epub ahead of print.
- Bickenbach, J.R., 1981. Identification and Behavior of Label-retaining Cells in Oral Mucosa and Skin. *Journal of Dental Research*, 60(3 Suppl), pp.1611–1620.
- Blanpain, C. & Fuchs, E., 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(mARCH), pp.207–217.
- Blanpain, C. & Fuchs, E., 2006. Epidermal stem cells of the skin. *Annual review of cell and developmental biology*, 22, pp.339–373.
- Boehnke, K., 2008. *Etablierung und Charakterisierung eines Hautmodells zur Analyse epidermaler Regeneration, dermalen Histogenese und endothelialer Vaskulogenese in vitro*. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Boehnke, K. et al., 2012. Stem cells of the human epidermis and their niche: Composition and function in epidermal regeneration and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 33(7), pp.1247–1258.
- Boukamp, P. et al., 1990. Mesenchyme-mediated and endogenous regulation of growth and differentiation of human skin keratinocytes derived from different body sites. *Differentiation; research in biological diversity*, 44(2), pp.150–61.
- Boukamp, P. et al., 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*, 106(3), pp.761–71.
- Boukamp, P. et al., 1982. Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin. *Journal of the National Cancer Institute*, 68(3), pp.415–427.
- Breitkreutz, D. et al., 1998. Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *European journal of cell biology*, 75(3), pp.273–86.
- Breitkreutz, D. et al., 1997. Integrin and basement membrane normalization in mouse grafts of human keratinocytes—implications for epidermal homeostasis. *Differentiation; research in biological diversity*, 61(3), pp.195–209.

- Bruckner-Tuderman, L. & Has, C., 2014. Disorders of the cutaneous basement membrane zone-The paradigm of epidermolysis bullosa. *Matrix Biology*, 33, pp.29–34.
- Burgeson, R.E. & Christiano, A.M., 1997. The dermal-epidermal junction. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(5), pp.651–658.
- Chan, R.W.S. & Gargett, C.E., 2006. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(6), pp.1529–38.
- Chen, J.D. et al., 1993. Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the alpha 2 integrin subunit. *Experimental cell research*, 209(2), pp.216–23.
- Chen, J.D. et al., 1995. Interleukin-1 alpha stimulates keratinocyte migration through an epidermal growth factor/transforming growth factor-alpha-independent pathway. *The Journal of investigative dermatology*, 104(5), pp.729–33.
- Chen, L. et al., 2011. IκB kinase β regulates epithelium migration during corneal wound healing. *PLoS one*, 6(1), p.e16132.
- Chen, L. et al., 2013. Toll-like receptor 4 has an essential role in early skin wound healing. *The Journal of investigative dermatology*, 133(1), pp.258–67.
- Chen, R. et al., 2014. Rac1 regulates skin tumors by regulation of keratin 17 through recruitment and interaction with CD11b+Gr1+ cells. *Oncotarget*, 5(12), pp.4406–17.
- Cho, Y.-M. et al., 2004. Regulation of parathyroid hormone-related protein gene expression by epidermal growth factor-family ligands in primary human keratinocytes. *The Journal of endocrinology*, 181(1), pp.179–90.
- Choma, D.P. et al., 2007. Integrin alpha3beta1-dependent activation of FAK/Src regulates Rac1-mediated keratinocyte polarization on laminin-5. *The Journal of investigative dermatology*, 127(1), pp.31–40.
- Cole, J. et al., 2001. Early gene expression profile of human skin to injury using high-density cDNA microarrays. *Wound Repair and Regeneration*, 9(5), pp.360–370.
- Coolen, N. a et al., 2010. Comparison between human fetal and adult skin. *Archives of dermatological research*, 302(1), pp.47–55.
- Cooper, L. et al., 2005. Wound healing and inflammation genes revealed by array analysis of “macrophageless” PU.1 null mice. *Genome biology*, 6(1), p.R5.
- Coulombe, P. A., 1997. Towards a molecular definition of keratinocyte activation after acute injury to stratified epithelia. *Biochemical and biophysical research communications*, 236(2), pp.231–8.
- Dale, B.A. et al., 1997. Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *The Journal of investigative dermatology*, 108(2), pp.179–87.
- Dasu, M.R. & Rivkah Isseroff, R., 2012. Toll-Like Receptors in Wound Healing: Location, Accessibility, and Timing. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(8), pp.1955–1958.
- Dawes, J.M. et al., 2011. CXCL5 mediates UVB irradiation-induced pain. *Science translational medicine*, 3(90), p.90ra60.
- Deonarine, K. et al., 2007. Gene expression profiling of cutaneous wound healing. *Journal of translational medicine*, 5, p.11.
- Dieu-Nosjean, M.C. et al., 2000. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *The Journal of experimental medicine*, 192(5), pp.705–18.
- Dinarelli, C.A., 1994. Interleukin-1 in disease. *Keio Journal of Medicine*, 43, pp.131–136.

- Donaldson, D.J. & Mahan, J.T., 1988. Keratinocyte migration and the extracellular matrix. *The Journal of investigative dermatology*, 90(5), pp.623–628.
- Doupé, D.P. & Jones, P.H., 2012. Interfollicular epidermal homeostasis: Dicing with differentiation. *Experimental Dermatology*, 21, pp.249–253.
- el-Ghalbzouri, A. et al., 2002. Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *The British journal of dermatology*, 147(2), pp.230–43.
- Elias, P.M. & Feingold, K.R., 2005. The Epidermal Lamellar Body as a Multifunctional Secretory Organelle. In *Skin Barrier*. pp. 261–272.
- Falanga, V. et al., 2002. Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. *The Journal of investigative dermatology*, 119(3), pp.653–60.
- Falkowska-Hansen, B. et al., 2010. An inducible Tet-Off-H2B-GFP lentiviral reporter vector for detection and in vivo isolation of label-retaining cells. *Experimental cell research*, 316(11), pp.1885–95.
- Fitsialos, G. et al., 2007. Transcriptional signature of epidermal keratinocytes subjected to in vitro scratch wounding reveals selective roles for ERK1/2, p38, and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*, 282(20), pp.15090–102.
- Forsberg, E. et al., 1996. Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), pp.6594–9.
- Frank, D.E. & Carter, W.G., 2004. Laminin 5 deposition regulates keratinocyte polarization and persistent migration. *Journal of cell science*, 117(Pt 8), pp.1351–63.
- Fransson, J. & Hammar, H., 1992. Epidermal growth in the skin equivalent. *Archives of dermatological research*, 284(6), pp.343–8.
- Franzke, C.W., Bruckner, P. & Bruckner-Tuderman, L., 2005. Collagenous transmembrane proteins: Recent insights into biology and pathology. *Journal of Biological Chemistry*, 280, pp.4005–4008.
- Freedberg, I.M. et al., 2001. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *The Journal of investigative dermatology*, 116(5), pp.633–40.
- Fuchs, E., 1994. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *Princess Takamatsu symposia*, 24, pp.290–302.
- Fuchs, E. & Green, H., 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19(April), pp.1033–1042.
- Fusenig, N.E. et al., 1990. In vitro transformation of human skin epithelial cells: Role of RAS oncogene in malignant progression. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 4(4-5), pp.627–34.
- Garlick, J.A. & Taichman, L.B., 1994. Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 70(6), pp.916–24.
- Gazel, A. et al., 2003. Transcriptional profiling of epidermal keratinocytes: comparison of genes expressed in skin, cultured keratinocytes, and reconstituted epidermis, using large DNA microarrays. *The Journal of investigative dermatology*, 121(6), pp.1459–68.
- Geer, D.J., Swartz, D.D. & Andreadis, S.T., 2002. Fibrin promotes migration in a three-dimensional in vitro model of wound regeneration. *Tissue engineering*, 8(5), pp.787–98.
- Ghazizadeh, S. & Taichman, L.B., 2001. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: A lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO Journal*, 20(6), pp.1215–1222.
- Gurtner, G.C. et al., 2008. Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), pp.314–21.

- Han, Y.P. et al., 2001. Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *The Journal of biological chemistry*, 276(25), pp.22341–50.
- Harding, C.R., Aho, S. & Bosko, C. a., 2013. Filaggrin - Revisited. *International Journal of Cosmetic Science*, 35, pp.412–423.
- Heldin, C.H. & Westermark, B., 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews*, 79(4), pp.1283–1316.
- Heng, M.C.Y., 2011. Wound healing in adult skin: Aiming for perfect regeneration. *International Journal of Dermatology*, 50(9), pp.1058–1066.
- Herz, C. et al., 2006. Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes. *The Journal of biological chemistry*, 281(47), pp.36082–90.
- Huang, N. et al., 2012. Vasorelaxation effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor-165 in isolated perfused human skin flaps. *The Journal of surgical research*, 172(1), pp.177–86.
- Huber, M.A. et al., 2004. NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *Journal of Clinical Investigation*, 114(4), pp.569–581.
- Imanishi, J. et al., 2000. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Progress in retinal and eye research*, 19(1), pp.113–29.
- Incorvaia, C. et al., 2008. Allergy and the skin. *Clinical and experimental immunology*, 153 Suppl , pp.27–9.
- Ishida-Yamamoto, A., Igawa, S. & Kishibe, M., 2011. Order and disorder in corneocyte adhesion. *Journal of Dermatology*, 38, pp.645–654.
- Isseroff, R.R., Chun, K.T. & Rosenberg, R.M., 1989. Triiodothyronine alters the cornification of cultured human keratinocytes. *The British journal of dermatology*, 120(4), pp.503–10.
- Jaks, V. et al., 2008. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nature genetics*, 40(11), pp.1291–1299.
- Jensen, J. et al., 2004. Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*, 122(6), pp.1423–31.
- Jones, P.H., Harper, S. & Watt, F.M., 1995. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell*, 80, pp.83–93.
- Jones, P.H. & Watt, F.M., 1993. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 73, pp.713–724.
- Kaiser, S.M. et al., 1992. Enhanced growth of a human keratinocyte cell line induced by antisense RNA for parathyroid hormone-related peptide. *The Journal of biological chemistry*, 267(19), pp.13623–8.
- Kaur, P., 2006. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *The Journal of investigative dermatology*, 126(April 2005), pp.1450–1458.
- Keene, D.R. et al., 1987. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *Journal of Cell Biology*, 104(March), pp.611–621.
- Kivelevitch, D., Mansouri, B. & Menter, A., 2014. Long term efficacy and safety of etanercept in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *Biologics : targets & therapy*, 8, pp.169–82.
- Kiwanuka, E. et al., 2013. CCN2 promotes keratinocyte adhesion and migration via integrin α 5 β 1. *Experimental cell research*, 319(19), pp.2938–46.
- Kobayashi, T. et al., 2014. Matrix metalloproteinase-9 activates TGF- β and stimulates fibroblast

- contraction of collagen gels. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 306(11), pp.L1006–15.
- Köllisch, G. et al., 2005. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*, 114, pp.531–541.
- Komine, M., Freedberg, I.M. & Blumenberg, M., 1996. Regulation of epidermal expression of keratin K17 in inflammatory skin diseases. *The Journal of investigative dermatology*, 107(4), pp.569–75.
- Krawczyk, W.S., 1971. A pattern of epidermal cell migration during wound healing. *The Journal of cell biology*, 49(2), pp.247–263.
- Kroeze, K.L. et al., 2012. Autocrine regulation of re-epithelialization after wounding by chemokine receptors CCR1, CCR10, CXCR1, CXCR2, and CXCR3. *The Journal of investigative dermatology*, 132(1), pp.216–25.
- Lai, Y. & Gallo, R.L., 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*, 30(3), pp.131–41.
- Lan, Y.-J. et al., 2013. Immunolocalization of Vimentin, Keratin 17, Ki-67, Involucrin, β -Catenin and E-Cadherin in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Pathology oncology research : POR*, pp.263–266.
- Langton, A.K., Herrick, S.E. & Headon, D.J., 2008. An extended epidermal response heals cutaneous wounds in the absence of a hair follicle stem cell contribution. *The Journal of investigative dermatology*, 128(5), pp.1311–8.
- Laplante, a F. et al., 2001. Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(13), pp.2377–89.
- Larouche, D. et al., 2011. Tissue-engineered skin preserving the potential of epithelial cells to differentiate into hair after grafting. *Tissue engineering. Part A*, 17(5-6), pp.819–30.
- Lau, K. et al., 2009. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Experimental dermatology*, 18(11), pp.921–33.
- Lavker, R.M. & Sun, T.T., 1982. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science (New York, N.Y.)*, 215(August), pp.1239–1241.
- Lebre, M.C. et al., 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *The Journal of investigative dermatology*, 127, pp.331–341.
- Lee, Y. et al., 2010. Activation of toll-like receptors 2, 3 or 5 induces matrix metalloproteinase-1 and -9 expression with the involvement of MAPKs and NF-kappaB in human epidermal keratinocytes. *Experimental dermatology*, 19(8), pp.e44–e49.
- Li, A., Simmons, P.J. & Kaur, P., 1998. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), pp.3902–7.
- Li, Y. et al., 2006. Transforming growth factor-alpha: a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *The Journal of investigative dermatology*, 126(9), pp.2096–105.
- Lin, Q. et al., 2012. Toll-like receptor 3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid promotes wound healing in human and murine skin. *The Journal of investigative dermatology*, 132(8), pp.2085–92.
- Ma, S. et al., 1997. Transcriptional control of K5, K6, K14, and K17 keratin genes by AP-1 and NF-kappaB family members. *Gene expression*, 6(6), pp.361–70.
- Maas-Szabowski, N. et al., 2001. Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 116(5), pp.816–820.
- Maas-Szabowski, N., Stärker, A. & Fusenig, N.E., 2003. Epidermal tissue regeneration and stromal

- interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- α . *Journal of cell science*, 116(Pt 14), pp.2937–48.
- Mabuchi, T. et al., 2012. Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. *Journal of dermatological science*, 65(1), pp.4–11.
- Mackenzie, I.C., 1970. Relationship between mitosis and the ordered structure of the stratum corneum in mouse epidermis. *Nature*, 226, pp.653–655.
- Mackie, E.J. & Tucker, R.P., 1999. The tenascin-C knockout revisited. , 3853, pp.3847–3853.
- Madlener, M. et al., 1996. Regulation of the expression of stromelysin-2 by growth factors in keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing. *The Biochemical journal*, 320 (Pt 2, pp.659–64.
- Mann, A. et al., 2001. Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *The Journal of investigative dermatology*, 117(6), pp.1382–90.
- Margadant, C. et al., 2013. Kindlin-1 regulates integrin dynamics and adhesion turnover. *PLoS one*, 8(6), p.e65341.
- Marikovsky, M. et al., 1996. Wound Fluid-Derived Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor (HB-EGF) Is Synergistic with Insulin-Like Growth Factor-I For Balb/MK Keratinocyte Proliferation. *Journal of Investigative Dermatology*, 106(4), pp.616–621.
- Martins-Green, M., 2013. The Yin and Yang of Integrin Function in Re-Epithelialization During Wound Healing. *Advances in wound care*, 2(3), pp.75–80.
- Mascr , G. et al., 2012. Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature*, 489(7415), pp.257–62.
- Mcgowan, K.M. & Coulombe, P.A., 1998. Onset of Keratin 17 Expression Coincides with the Definition of Major Epithelial Lineages during Skin Development. , 143(2), pp.469–486.
- Mcheik, J.N. et al., 2014. Study of proliferation and 3D epidermal reconstruction from foreskin, auricular and trunk keratinocytes in children. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*.
- Mempel, M. et al., 2003. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *The Journal of investigative dermatology*, 121, pp.1389–1396.
- Meuter, S. & Moser, B., 2008. Constitutive expression of CXCL14 in healthy human and murine epithelial tissues. *Cytokine*, 44(2), pp.248–55.
- Michel, M. et al., 1999. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 35(6), pp.318–26.
- Midwood, K.S., Williams, L.V. & Schwarzbauer, J.E., 2004. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(6), pp.1031–7.
- Miller, L.S., 2008. Toll-Like Receptors in Skin. *Advances in Dermatology*, 24(C), pp.71–87.
- Mohan, R. et al., 2002. Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 277, pp.2065–2072.
- Moll, I. et al., 1998. Characterization of epidermal wound healing in a human skin organ culture model: acceleration by transplanted keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 111(2), pp.251–8.
- Morris, R.J. et al., 2004. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nature biotechnology*, 22(4), pp.411–417.

- Morrison, K.M. et al., 2009. Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Developmental Biology*, 336(1), pp.76–83.
- Muffler, S. et al., 2008. A stable niche supports long-term maintenance of human epidermal stem cells in organotypic cultures. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(10), pp.2506–15.
- Mulder, G., Tenenhaus, M. & D'Souza, G.F., 2014. Reduction of Diabetic Foot Ulcer Healing Times Through Use of Advanced Treatment Modalities. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 13, pp.335–346.
- Nold, M.F. et al., 2010. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nature immunology*, 11(11), pp.1014–22.
- O'Neill, L. a & Greene, C., 1998. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *Journal of leukocyte biology*, 63, pp.650–657.
- Ojeh, N.O. & Navsaria, H. a, 2014. An in vitro skin model to study the effect of mesenchymal stem cells in wound healing and epidermal regeneration. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 102(8), pp.2785–92.
- Okamura, Y. et al., 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry*, 276(13), pp.10229–33.
- Ouwehand, K. et al., 2012. CCL5 and CCL20 mediate immigration of Langerhans cells into the epidermis of full thickness human skin equivalents. *European journal of cell biology*, 91(10), pp.765–73.
- Paladini, R.D. et al., 1996. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *The Journal of cell biology*, 132(3), pp.381–97.
- Pedersen, T.X. et al., 2003. Laser capture microdissection-based in vivo genomic profiling of wound keratinocytes identifies similarities and differences to squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 22(25), pp.3964–76.
- Petering, H. et al., 2001. Characterization of the CC chemokine receptor 3 on human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 116(4), pp.549–55.
- Plikus, M. V. et al., 2012. Epithelial stem cells and implications for wound repair. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(9), pp.946–53.
- Potten, C.S., 1971. Early and late incorporation of tritiated thymidine into skin cells and the presence of a long-lived G 0-specific precursor pool. *The Journal of cell biology*, 51(9), pp.855–861.
- Potten, C.S., 2004. Keratinocyte stem cells, label-retaining cells and possible genome protection mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 9, pp.183–195.
- Presland, R.B. & Dale, B. a, 2000. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 11(4), pp.383–408.
- Proksch, E., Brandner, J.M. & Jensen, J.M., 2008. The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17, pp.1063–1072.
- Rassner, G., 2013. *Dermatologie: Lehrbuch und Atlas* 9th ed., Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- Riches, D.W.H., 1996. Macrophage Involvement in Wound Repair, Remodeling, and Fibrosis. In E. Clark, ed. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Dpringer Science & Business Media, pp. 95–96.
- Rifkin, D.B. & Moscatelli, D., 1989. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *The Journal of cell biology*, 109(1), pp.1–6.
- Ro, S. & Rannala, B., 2004. A stop-EGFP transgenic mouse to detect clonal cell lineages generated by

- mutation. *EMBO reports*, 5(9), pp.914–920.
- Ronfard, V. & Barrandon, Y., 2001. Migration of keratinocytes through tunnels of digested fibrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), pp.4504–4509.
- Roy, S. et al., 2008. Characterization of the acute temporal changes in excisional murine cutaneous wound inflammation by screening of the wound-edge transcriptome. *Physiological genomics*, 34(2), pp.162–84.
- Safferling, K. et al., 2013. Wound healing revised: a novel reepithelialization mechanism revealed by in vitro and in silico models. *The Journal of cell biology*, 203(4), pp.691–709.
- Santoro, M.M. & Gaudino, G., 2005. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental cell research*, 304(1), pp.274–86.
- Schäfer, M. & Werner, S., 2008. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(8), pp.628–38.
- Schlaepfer, D.D., Mitra, S.K. & Ilic, D., 2004. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1692(2-3), pp.77–102.
- Schlüter, H. et al., 2013. WIF1 is expressed by stem cells of the human interfollicular epidermis and acts to suppress keratinocyte proliferation. *The Journal of investigative dermatology*, 133(6), pp.1669–73.
- Schoop, V.M., Mirancea, N. & Fusenig, N.E., 1999. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology*, 112(3), pp.343–53.
- Scott, K. a et al., 2004. TNF-alpha regulates epithelial expression of MMP-9 and integrin alphavbeta6 during tumour promotion. A role for TNF-alpha in keratinocyte migration? *Oncogene*, 23(41), pp.6954–66.
- Seidel, J., Zabel, M. & Kasprzak, A., 2002. PTHrP and cytokeratins in human epidermis. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 40(2), pp.209–10.
- Shi, J.W. et al., 2013. The enforced expression of c-Myc in pig fibroblasts triggers mesenchymal-epithelial transition (MET) via F-actin reorganization and RhoA/Rock pathway inactivation. *Cell Cycle*, 12, pp.1119–1127.
- Singer, A.J. & Clark, R.A., 1999. Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine*, 341(10), pp.738–46.
- Sogabe, Y. et al., 2006. Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 14(4), pp.457–62.
- Staniszewska, M., Ślucznanowska-Głąbowska, S. & Drukała, J., 2011. Stem cells and skin regeneration. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 49(3), pp.375–380.
- Stark, H.J. et al., 1999. Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *The Journal of investigative dermatology*, 112(5), pp.681–91.
- Stark, H.-J. et al., 2004. Authentic fibroblast matrix in dermal equivalents normalises epidermal histogenesis and dermoepidermal junction in organotypic co-culture. *European journal of cell biology*, 83(11-12), pp.631–45.
- Stark, H.-J. et al., 2006. Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*, 11(1), pp.93–105.

- Steinstraesser, L. et al., 2009. A human full-skin culture system for interventional studies. *Eplasty*, 9, p.e5.
- Sterry, W., 2011. *Kurzlehrbuch Dermatologie*, Georg Thieme Verlag.
- Stoll, S.W. et al., 2012. Heparin-binding EGF-like growth factor promotes epithelial-mesenchymal transition in human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 132(9), pp.2148–57.
- Suga, H. et al., 2014. TLR4, rather than TLR2, regulates wound healing through TGF- β and CCL5 expression. *Journal of dermatological science*, 73(2), pp.117–24.
- Törmä, H., Lindberg, M. & Berne, B., 2008. Skin barrier disruption by sodium lauryl sulfate-exposure alters the expressions of involucrin, transglutaminase 1, profilaggrin, and kallikreins during the repair phase in human skin in vivo. *The Journal of investigative dermatology*, 128(5), pp.1212–9.
- Wang, Y. et al., 2013. Hepatic stellate cells, liver innate immunity, and hepatitis C virus. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 28 Suppl 1(0 1), pp.112–5.
- Watt, F.M., 1989. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Current opinion in cell biology*, 1, pp.1107–1115.
- Werner, S. & Grose, R., 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*, 83(3), pp.835–70.
- Wiche, G. & Winter, L., 2011. Plectin isoforms as organizers of intermediate filament cytoarchitecture. , 1(February 2015), pp.14–20.
- Wu, X. & Hammer, J. a., 2014. Melanosome transfer: It is best to give and receive. *Current Opinion in Cell Biology*, 29, pp.1–7.
- Xie, Y. et al., 2010. Development of a three-dimensional human skin equivalent wound model for investigating novel wound healing therapies. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 16(5), pp.1111–23.
- Xu, W. et al., 2012. Application of a partial-thickness human ex vivo skin culture model in cutaneous wound healing study. *Laboratory Investigation*, 92(4), pp.584–599.
- Xue, M., Le, N.T. V & Jackson, C.J., 2006. Targeting matrix metalloproteases to improve cutaneous wound healing. *Expert opinion on therapeutic targets*, 10(1), pp.143–155.
- Yan, C. et al., 2010. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor-alpha through bone morphogenic protein-2. *The American journal of pathology*, 176(5), pp.2247–58.
- Yanagisawa, M. et al., 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332(6163), pp.411–5.
- Yohn, J.J. et al., 1993. Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1. *The Journal of investigative dermatology*, 100(1), pp.23–6.
- Yuan, Y. et al., 2014. The translation initiation factor Eif3i upregulates vascular endothelial growth factor A, accelerates cell proliferation, and promotes angiogenesis in embryonic development and tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry*.
- Zgheib, C., Xu, J. & Liechty, K.W., 2014. Targeting Inflammatory Cytokines and Extracellular Matrix Composition to Promote Wound Regeneration. *Advances in wound care*, 3(4), pp.344–355.
- Zhang, K. & Kramer, R.H., 1996. Laminin 5 deposition promotes keratinocyte motility. *Experimental cell research*, 227(2), pp.309–22.

VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabelle 1: Regulierte biologische Funktionen und Krankheiten laut IPA©	38
Tabelle 2: Vorgeschaltete Regulationselemente laut IPA®	40
Tabelle 3: Top 25 der differentiell regulierten Gene in der Epidermis	69
Abbildung 1: Schematische Darstellungen von Epidermis und Haut	2
Abbildung 2: Symmetrische und asymmetrische Teilung von Stammzellen	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Quantifizierung der Wundheilung	18
Abbildung 4: Wundheilung in stabilisierten colOTCs	20
Abbildung 5: H&E-Färbung histologischer Schnitte verwundeter scaOTCs	21
Abbildung 6: Wundheilung in cdmOTCs.....	22
Abbildung 7: Expression von Differenzierungsmarkern im zeitlichen Verlauf.....	23
Abbildung 8: Intermediärfilamente als Wundheilungsmarker	24
Abbildung 9: Wundschlusskinetik	25
Abbildung 10: Auswirkung des Serumgehalts des Kulturmediums auf Wundheilung und Proliferation	26
Abbildung 11: Auswirkung der Vorkulturdauer auf die Reepithelisierungsrate	27
Abbildung 12: Wundheilung in HaCaT-scaOTCs	28
Abbildung 13: Zeitlich aufgelöste laterale Verteilung epidermaler Stammzellen während der Reepithelialisierung.....	29
Abbildung 14: label retaining cells und Proliferation in verwundenen scaOTCs	29
Abbildung 15: zeitlicher Verlauf der mRNA-Expression ausgewählter Gene aus dem <i>microarray</i>	31
Abbildung 16: <i>Heatmap</i> regulierter biologischer Funktionen laut IPA®	34
Abbildung 17: Mit IPA® aus den Expressionsdaten erstellte Vorhersagen über aktivierte biologische Funktionen	35
Abbildung 18: Mit IPA® aus den Expressionsdaten erstellte Vorhersagen über aktivierte kanonische Signalwege.....	36
Abbildung 19: Effekt immunmodulatorischer Agenzien auf die Reepithelialisierung	41

ANHANG

Tabelle 3: Top 25 der differentiell regulierten Gene in der Epidermis

Die 25 am stärksten hoch- bzw. herunterregulierten Gene sind je Zeitpunkt aufgelistet

FC = *fold-change*, Regulationsfaktor gegenüber unverwundeter Kontrolle

2 Tage, hochreguliert			
Gen	Beschreibung	p-Wert	FC
MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	0.00000	32.11
MMP10	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	0.00001	18.51
DEFB4A	defensin, beta 4A	0.00004	8.88
IL1B	interleukin 1, beta	0.00001	8.49
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	0.00001	7.67
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	0.00001	7.44
LAMA3	laminin, alpha 3	0.00001	6.28
LAMC2	laminin, gamma 2	0.00001	6.11
LAMC2	laminin, gamma 2	0.00001	6.00
SCG5	secretogranin V (7B2 protein)	0.00001	5.98
CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	0.00001	5.84
LAMA3	laminin, alpha 3	0.00001	5.58
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	0.00001	5.37
FERMT1	fermitin family member 1	0.00001	5.28
EDN1	endothelin 1	0.00002	5.22
IL1A	interleukin 1, alpha	0.00003	5.17
SPINK6	serine peptidase inhibitor, Kazal type 6	0.00003	4.87
KRT17	keratin 17	0.00001	4.82
LAMB3	laminin, beta 3	0.00002	4.82
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	0.00001	4.71
ADAM19	ADAM metalloproteinase domain 19	0.00001	4.71
BMP6	bone morphogenetic protein 6	0.00001	4.63
SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	0.00001	4.44
HLA-G	major histocompatibility complex, class I, G	0.00003	4.13
SPRR2B	small proline-rich protein 2B	0.00004	4.00

Tabelle 3: Fortsetzung

2 Tage, herunterreguliert			
Gen	Beschreibung	p-Wert	FC
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0.0000	-2.56
SPON1	spondin 1, extracellular matrix protein	0.0001	-2.56
FBLN1	fibulin 1	0.0002	-2.64
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	0.0000	-2.71
FLG	filaggrin	0.0003	-2.76
FBLN2	fibulin 2	0.0000	-2.78
H19	H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)	0.0001	-2.80
MFAP4	microfibrillar-associated protein 4	0.0005	-2.96
PSORS1C2	psoriasis susceptibility 1 candidate 2	0.0003	-2.99
LCE5A	late cornified envelope 5A	0.0001	-3.07
MAL	mal, T-cell differentiation protein	0.0078	-3.10
LBP	lipopolysaccharide binding protein	0.0000	-3.28
COL3A1	collagen, type III, alpha 1	0.0000	-3.41
KRT15	keratin 15	0.0001	-3.52
KRT4	keratin 4	0.0011	-3.53
SPOCK1	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1	0.0001	-3.62
RARRES2	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	0.0002	-3.62
COMP	cartilage oligomeric matrix protein	0.0006	-3.69
STMN2	stathmin-like 2	0.0000	-3.99
C13orf15	chromosome 13 open reading frame 15	0.0000	-4.17
STMN2	stathmin-like 2	0.0001	-4.21
APOD	apolipoprotein D	0.0002	-4.47
CRNN	cornulin	0.0007	-4.58
DAPL1	death associated protein-like 1	0.0000	-4.86

Tabelle 3: Fortsetzung

5 Tage, hochreguliert			
Gen	Beschreibung	p-Wert	FC
DEFB4A	defensin, beta 4A	0.00000	24.42
IL1B	interleukin 1, beta	0.00000	16.34
MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	0.00003	14.57
ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	0.00003	11.16
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	0.00002	7.75
SPINK6	serine peptidase inhibitor, Kazal type 6	0.00001	7.73
KLK12	kallikrein-related peptidase 12	0.00002	7.67
IL8	interleukin 8	0.00027	6.92
KRT17	keratin 17	0.00016	6.43
UPP1	uridine phosphorylase 1	0.00002	6.25
SERPINB1	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	0.00004	6.19
ANXA3	annexin A3	0.00003	6.00
ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	0.00006	5.88
IL1A	interleukin 1, alpha	0.00003	5.80
SPINK6	serine peptidase inhibitor, Kazal type 6	0.00002	5.70
CALB2	calbindin 2	0.00005	5.62
CAMK2N1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	0.00008	5.54
THBS1	thrombospondin 1	0.00145	5.35
DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	0.00028	5.31
EDN1	endothelin 1	0.00006	5.13
LAMC2	laminin, gamma 2	0.00023	5.03
MMP10	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	0.00004	4.99
LAMC2	laminin, gamma 2	0.00005	4.94
KLK12	kallikrein-related peptidase 12	0.00006	4.69
ODC1	ornithine decarboxylase 1	0.00008	4.63

Tabelle 3: Fortsetzung

5 Tage, herunterreguliert			
Gen	Beschreibung	p-Wert	FC
ASGR1	asialoglycoprotein receptor 1	0.00052	-3.04
BTC	betacellulin	0.00059	-3.04
ELF5	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)	0.00071	-3.15
BTBD16	BTB (POZ) domain containing 16	0.00038	-3.18
PNPLA7	patatin-like phospholipase domain containing 7	0.00038	-3.20
LCE6A	late cornified envelope 6A	0.00023	-3.27
FLG2	filaggrin family member 2	0.00023	-3.35
DAPL1	death associated protein-like 1	0.00033	-3.51
CYP4F12	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 12	0.00024	-3.52
KRT15	keratin 15	0.00024	-3.64
TCHH	trichohyalin	0.00047	-3.75
HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	0.00010	-3.76
AADAC	arylacetamide deacetylase (esterase)	0.00020	-3.84
PSORS1C2	psoriasis susceptibility 1 candidate 2	0.00009	-3.88
BLMH	bleomycin hydrolase	0.00013	-3.94
LCE6A	late cornified envelope 6A	0.00009	-3.99
KIAA1239	KIAA1239	0.00018	-4.00
SLC40A1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	0.00006	-4.13
CGA	glycoprotein hormones, alpha polypeptide	0.00007	-4.26
LCE5A	late cornified envelope 5A	0.00006	-4.32
TMEM99	transmembrane protein 99	0.00006	-4.55
KRT77	keratin 77	0.00006	-4.61
CCL27	chemokine (C-C motif) ligand 27	0.00016	-4.61
SLC16A10	solute carrier family 16, member 10 (aromatic amino acid transporter)	0.00006	-4.94
SLC47A2	solute carrier family 47, member 2	0.00004	-5.28

Tabelle 3: Fortsetzung

13 Tage, hochreguliert			
Gen	Beschreibung	p-Wert	FC
KRT4	keratin 4	0.01841	15.40
GPX2	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	0.01288	12.91
KLK12	kallikrein-related peptidase 12	0.02281	8.72
AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	0.01288	8.60
DIO2	deiodinase, iodothyronine, type II	0.03930	7.14
CLCA4	chloride channel accessory 4	0.02297	7.11
CRNN	cornulin	0.04104	6.66
KRT13	keratin 13	0.03742	6.28
RHCG	Rh family, C glycoprotein	0.02566	5.41
PITX1	paired-like homeodomain 1	0.02778	5.24
GBP6	guanylate binding protein family, member 6	0.01288	5.08
PYGB	phosphorylase, glycogen; brain	0.01302	4.91
KLK12	kallikrein-related peptidase 12	0.02557	4.84
CD14	CD14 molecule	0.01841	4.44
CD14	CD14 molecule	0.02225	4.42
MUC20	mucin 20, cell surface associated	0.02406	4.35
AGR2	anterior gradient homolog 2 (<i>Xenopus laevis</i>)	0.02977	4.33
SLC4A11	solute carrier family 4, sodium borate transporter, member 11	0.02281	3.67
MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus	0.02406	3.56
TM4SF1	transmembrane 4 L six family member 1	0.02497	3.42
ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	0.02297	3.39
FBXO32	F-box protein 32	0.04608	3.39
CTSC	cathepsin C	0.02346	3.17
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	0.01852	3.15
KLK13	kallikrein-related peptidase 13	0.03930	3.12

Tabelle 3: Fortsetzung

13 Tage, herunterreguliert			
Gen	Beschreibung	p-Wert	FC
LCE1F	late cornified envelope 1F	0.01302	-7.11
SPRR2C	small proline-rich protein 2C (pseudogene)	0.02114	-7.21
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	0.01288	-7.46
BLMH	bleomycin hydrolase	0.02232	-8.34
LCE1D	late cornified envelope 1D	0.01288	-9.00
LCE1C	late cornified envelope 1C	0.01841	-9.16
SPRR2B	small proline-rich protein 2B	0.02346	-9.32
SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	0.01727	-9.42
UNC93A	unc-93 homolog A (C. elegans)	0.01288	-9.55
DSC1	desmocollin 1	0.04498	-10.02
LCE1A	late cornified envelope 1A	0.01288	-10.09
PSORS1C2	psoriasis susceptibility 1 candidate 2	0.02497	-10.16
DSC1	desmocollin 1	0.04699	-10.56
LCE6A	late cornified envelope 6A	0.01288	-10.74
LCE2A	late cornified envelope 2A	0.01302	-11.12
IL1F7	interleukin 1 family, member 7 (zeta)	0.01305	-11.24
IL1F7	interleukin 1 family, member 7 (zeta)	0.01841	-12.21
CA9	carbonic anhydrase IX	0.01288	-12.91
LCE6A	late cornified envelope 6A	0.01552	-14.03
C1orf68	chromosome 1 open reading frame 68	0.01288	-15.08
NDUFA4L2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4-like 2	0.01288	-15.14
CCL27	chemokine (C-C motif) ligand 27	0.01288	-15.45
LCE5A	late cornified envelope 5A	0.01288	-15.73
SERPINA12	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 12	0.02342	-17.81
TCHH	trichohyalin	0.01288	-29.45

DANKSAGUNG

Größter Dank gilt meinen Eltern, die in vielerlei Hinsicht zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen und überhaupt ermöglicht haben, die mir immer eine große Stütze waren und immer an mich geglaubt haben. Meinen Geschwistern, die jederzeit für mich da waren und sind.

Dank gilt auch Frau Prof. Petra Boukamp, die mit Themenstellung, Doktorandenstelle und Betreuung bis zur letzten Sekunde großen Anteil an dieser Arbeit hat. Ebenso danke ich Dr. Hans-Jürgen Stark für bereichernde fachliche und nicht-fachliche Gespräche aller Art und viele aufmunternde Worte.

Vielen Dank an alle A110er, die ehemaligen und die wenigen verbliebenen. Mein Dank gilt Leo Nevaril für die bereichernde Freundschaft, und die Gewissheit, immer ein offenes Ohr für Persönliches, aber auch Fachliches zu finden. Insbesondere danke ich auch Iris Martin, Katrin Schmidt, Hermann Stammer für die technische und methodische Unterstützung.

Vielen Dank an Prof. Peter Angel für die Begutachtung der Arbeit und wertvolle Anregungen im TAC. Dr. Niels Grabe danke ich für rege Diskussionen im und um das TAC.

Ein großes Dankeschön an meine jetzigen Chefs vor allem für ihre lange Geduld.

Danke an alle Menschen, die nicht persönlich erwähnt wurden, aber ihren Teil beigetragen haben.

Allergrößter Dank gilt meinem ganz persönlichen Engel, Sabine Lehmann, für...einfach alles!