

Sebastian Günkel
Dr. med.

Entwicklung eines ex-vivo-Modells zur Untersuchung von
Wundheilung, Polyploidie und p53-Funktion in der Maus
- eine experimentelle Studie-

Geboren am 21. Mai 1977 in Erfurt
Staatsexamen am 08.06.06 an der Universität Heidelberg.

Promotionsfach: Chirurgie
Doktorvater: Professor Dr. med. G. Germann

Der Einfluss von p53 auf die Regeneration von Gewebe ist, wie in vielen Untersuchungen gezeigt wurde, von entscheidender Bedeutung für den Ablauf einer Vielzahl von Heilungsprozessen. Einige Arbeitsgruppen untersuchten den Zusammenhang von Veränderungen der Zentrosomen, Chromosomen und des p53-Proteingehaltes während der Wundheilung. Die bisherigen in vitro gewonnenen Erkenntnisse entstammen nicht validierten Modellen. Auf die Komplexität von in vivo Untersuchungen wird in der Literatur nicht weiter eingegangen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, ob sich durch Modifizierung und Verfeinerung der Untersuchungsmethoden eine Fluoreszenz In Situ Hybridisierung zur Analyse von numerischen Chromosomenveränderungen und eine immunohistochemische Darstellung der Zentrosomen im Granulationsgewebe in vivo erzielen lassen.

Die dazu gewonnen Resultate demonstrieren, dass trotz vieler Variationen der Untersuchungstechniken, eine Fluoreszenz In Situ Hybridisierung zur quantitativen Analyse von numerischen Chromosomenveränderungen und eine immunohistochemische Zentrosomendarstellung im nativen Gewebe in vivo mit den derzeitigen Methoden nicht zu reproduzierbaren Daten führen. Ein wesentliches Problem stellt die unzureichende Permeabilisierung der Zelle und des Zellkerns für die Zentrosomenantikörper und die Hybridisierungs sonden dar. Weiter führen notwendig dünne Schnittdicken zu geringen darstellbaren Zellzahlen. Auch eine Kondensierung der Chromosomen durch Synchronisierung der Analysezellen konnte die Darstellbarkeit der Chromosomen nicht ausreichend verbessern. Eine flächendeckende Färbung des Gewebeverbandes, die eine relevante Aussage zum Ploidiegrad und zur Zentrosomenzahl liefert, erlauben die eingesetzten Methoden nicht.

Ein weiterer Fokus der Arbeit lag auf der Entwicklung eines standardisierten ex-vivo-Modells, das die gewünschten Analysen im Heilungsgewebe zulässt. Die Wertigkeit der Aussagekraft dieses Modells sollte anhand des charakteristischen Verlaufes der p53-Proteinexpression während der Wundheilung überprüft werden.

Bezogen auf die Fluoreszenz In Situ Hybridisierung bietet das ex-vivo-Modell die Möglichkeit, eine Chromosomenanalyse am Monolayer fibroblastoider Zellen durchzuführen. Die auswachsenden Zellen des Granulationsgewebes stellen ein Modell dar, in dem der Wundheilungsprozess voranschreitet und die Analysen, wie der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung zugänglich sind.

Die untersuchten Ploidieraten im ex-vivo-Modell können exemplarisch zeigen, dass die Untersuchungstechniken im Vergleich zum nativen Gewebe der in vivo Situation durchführbar und quantitativ auswertbar sind. Analog zu publizierten Daten konnte im Rahmen des hohen p53-Proteingehaltes eine Abnahme der Anzahl von polyploiden Zellen zu den Untersuchungszeitpunkten im vorliegenden Modell beobachtet werden. Der festgestellte hohe p53-Proteingehalt, der für spätere Phasen der Wundheilung charakteristisch ist, spiegelt sich in niedrigen Ploidieraten wieder.

Eine Besonderheit stellt die Analyse der Zentrosomen dar. Während in einzelnen Zellen gute Zentrosomendarstellungen gelangen, konnte keine flächendeckende Anfärbung von Zentrosomen im auswachsenden Monolayer erreicht werden. Diese Beobachtung deckt sich mit Literaturhinweisen, die aufzeigen, dass durch physiologische Verhältnisse während der Mitose, die Zentrosomen in Monolayern oft unter dem Zellkern liegen und somit erschwert darstellbar sind. Eine quantitative Analyse der Zentrosomenzahl im ex-vivo-Modell ist mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden nicht reproduzierbar möglich.

Die erarbeiteten Ergebnisse konnten zeigen, dass sich im ex-vivo-Modell der zeitliche Verlauf des p53-Proteingehaltes analysieren lässt. Er weist ein analoges Muster zu der publizierten in-vivo-Situation auf. Bedingt durch die methodisch determinierte 7tägige Kultivierung der auswachsenden Zellen muss jedoch die Kultivierungsdauer zu dem physiologischen Heilungsverlauf addiert werden.

Das hier vorgestellte ex-vivo-Modell kann als valides Modell für Wundheilungsanalysen, insbesondere zur Chromosomenanalyse von Granulationsgewebe, herangezogen werden.