

Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen
Abteilung Radioonkologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg
Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung
Leiter: Professor Dr. H. P. Rodemann

**Autologer vitaler Hautersatz für die Behandlung chronischer
Wunden**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanwissenschaften

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

Weiguo Xu

Liaoyang, China

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. P. Rodemann

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Skutella

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Univ.-Klinik für Radioonkologie, Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. H. Peter Rodemann in der Zeit von Januar 2003 bis März 2007 durchgeführt.

*Meiner Frau Jingyi Xu und meinem
Sohn Xianliang Xu, die mich
während meiner Arbeit begleitet
und unterstützt haben, gilt ein ganz
besonderer Dank.*

1 Einleitung.....	1
1.1 Wunden	1
1.1.1 Stadien der Wundheilung	1
1.1.2 Chronische Wunden	2
1.1.3 Die Behandlung chronischer Wunden.....	2
1.2 Aufbau und Funktion der Haut.....	5
1.2.1 Die Epidermis.....	5
1.2.2 Basalmembran.....	6
1.2.3 Die Dermis	7
1.3 Das Fibroblastenzellsystem.....	7
1.4 KGF – “Keratinocyte-Growth-Factor”	9
1.5 ECM (Die extrazelluläre Matrix) und 3D-Kulturmodelle der Haut <i>in vitro</i>	10
1.6 3D-Trägersysteme	10
1.7 Ziel der Arbeit	11
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Geräte und sonstige Materialien.....	13
2.2 Chemikalien	13
2.3 MatriDerm.....	14
2.4 Zellkultur.....	15
2.4.1 Medien, Puffer und Lösungen.....	16
2.4.2 Keratinozyten, Fibroblasten und HaCaT-Zellen.....	16
2.4.2.1 Kultivierung humaner Keratinozyten.....	16
2.4.2.2 Kultivierung humaner Fibroblasten	17
2.4.2.3 Die HaCaT-Zellen.....	17
2.4.3 DAPI-Färbung.....	17
2.4.4 β -Gal-Färbung	18
2.4.5 Passagieren von Keratinozyten, Fibroblasten und HaCaT-Zellen	18
2.4.6 Kryokonservierung und Auftauen von HSF, Keratinozyten und HaCaT-Zellen....	19
2.4.7 Koloniebildungstest.....	19
2.4.8 Anreicherung von MF und PMF Zellen für KGF-Bestimmung	20
2.4.9 Proliferationskinetik in der Monokultur.....	20
2.4.10 Proliferationskinetik in Kokultur-System	20
2.5 Bestimmung der KGF-Expression und des KGF-mRNA-Gehalts von Progenitorfibroblasten und differenzierten Fibrozyten	21

2.5.1 Bestimmung der KGF-Expression im Zellkulturüberstand mittels ELISA	21
2.5.2 Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (real-time RT-PCR)	22
2.5.2.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription	22
2.5.2.2 Realtime PCR.....	22
2.6 Drei-Dimensionale Kultur.....	23
2.6.1 Spalthauttransplantate auf MatriDerm mit oder ohne Fibroblasten-Besiedelung...	23
2.6.2 Besiedelungsdynamik von HSF, HaCaT-Zellen und Keratinozyten auf MatriDerm	24
2.6.3 Bestimmung der Proliferation von Fibroblasten in MatriDerm mittels BrdU- Färbung	24
2.6.4 Besiedlungsdynamik von HaCaT-Zellen und primären Keratinozyten auf/in MatriDerm mit oder ohne Fibroblastenvorbesiedlung.....	25
2.7 Immunhistochemie	25
2.7.1 Herstellung von Paraffinschnitten.....	26
2.7.2 Immunhistochemische Färbung	26
3 Ergebnisse	28
3.1 Proliferationsverhalten von Hautfibroblasten und Keratinozyten.....	28
3.1.1 Proliferationsverhalten von Fibroblasten als Funktion der Mediumbedingung.....	28
3.1.2 Koloniebildung von Hautfibroblasten als Funktion der Mediumbedingung	29
3.1.3 Proliferationsverhalten von Keratinozyten.....	31
3.1.3.1 Proliferation von HaCaT-Zellen in unterschiedlichen Medien	31
3.1.3.2 Proliferation von primären Keratinozyten in unterschiedlichen Medien	32
3.2 Proliferation in Kokultur-System	33
3.2.1 Proliferation von Progenitorfibroblasten in Kokultur mit HaCaT-Zellen.....	33
3.2.2 Proliferation von HaCaT-Zellen in Kokultur mit unterschiedlichen Differenzierungstypen von humanen Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten	34
3.2.3 Proliferation von humanen Keratinozyten in Kokultur mit Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten.....	35
3.3 KGF-Expression von Progenitorfibroblasten und terminal differenzierten Funktionsfibrozyten	39
3.4 MatriDerm.....	41
3.4.1 Zellverteilung und Adhäsion auf MatriDerm sowie Zellmigration und – Proliferation auf MatriDerm.....	41

3.4.1.1 Zellverteilung von Progenitor-Fibroblasten auf bzw. in den MatriDerm-Spalt 1 bis 9	41
3.4.1.2 Migration und Proliferation von Progenitorfibroblasten in MatriDerm unter 3D Kulturbedingungen.....	42
3.4.1.3 Migration von postmitotischen Fibrozyten in MatriDerm unter 3D-Kulturbedingungen.....	46
3.4.1.4 Proliferation von Fibroblasten auf MatriDerm in verschiedenen Zelldichten .	48
3.4.1.5 Zelladhäsion von Keratinozyten auf MatriDerm mit Verschiedenen Zelldichten	48
3.4.1.6 Proliferation von Keratinozyten auf MatriDerm mit verschiedenen Zelldichten	49
3.4.1.7 Die Bestimmung der Proliferation von Progenitorfibroblasten in MatriDerm unter 3D-Kulturbedingungen mittels BrdU-Färbung.....	50
3.4.1.8 3D-Besiedelung von MatriDerm mit HaCaT-Zellen	52
3.4.1.9 Die Bestimmung der Proliferation von primären humanen Keratinozyten in MatriDerm unter 3D-Kulturbedingung mittels BrdU-Färbung.....	56
3.4.2 Spalthauttransplantate auf MatriDerm mit oder ohne Fibroblasten-Besiedelung...	58
3.4.3 Besiedlungsdynamik von Zellen auf /in MatriDerm.....	61
3.4.3.1 Besiedlungsdynamik von HaCaT-Zellen auf/in MatriDerm mit oder ohne Fibroblastenbesiedlung.....	61
3.4.3.2 Besiedlungsdynamik humaner Keratinozyten auf/in MatriDerm	63
4 Diskussion	72
4.1 Beeinflussung der Keratinozyten-Proliferation durch Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten im 2-dimensionalen Kultursystem	73
4.1.1 Monokultursystem.....	73
4.1.2 Kokultursystem	74
4.2 Expression Keratinozyten-relevanter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren durch Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten.....	77
4.3 Wachstumsverhalten von Keratinozyten und Fibroblasten/Fibrozyten unter 3-dimensionalen Kulturbedingungen in MatriDerm	79
4.4 Aspekte der Wundheilung und die Bedeutung von Fibroblasten-/Fibrozyten-Differenzierungstypen.....	80
4.5 Epithelialisierung im organotypischen MatriDerm-Träger	83

4.6 Vergleich des zellbesiedelten MatriDerm-Systems mit existenten avitalen bzw. vitalen Compositen.....	85
4.7 Ausblick	88
5 Zusammenfassung.....	90
6 Literaturverzeichnis	92

1 Einleitung

1.1 Wunden

Kutane Wunden sind Gewebszerstörungen bzw. -schädigungen in Körperoberflächen und können mechanisch, ischämisch oder entzündlich entstanden sein. Sie lassen sich anhand der Dauer ihres Bestehens in akute und chronische Wunden unterteilen. Im Gegensatz zu akuten Wunden ist der Wundheilungsprozess bei chronischen Wunden gestört.

1.1.1 Stadien der Wundheilung

Je nach Art der Wunde verläuft die akute Wundheilung in 4 Phasen, die ineinander übergehen: frühe exsudative Entzündungsphase, späte resorptive Entzündungsphase, proliferative Phase und reparative Phase. In der exsudativen Phase (erste Stunden) werden die Gewebedefekte mit Blut und Lymphe ausgefüllt und Wundschorf gebildet. Wundexsudat ist reich an antibakteriellen Substanzen, Wachstumsfaktoren und anderen heilungsfördernden Zytokinen. Nach der Verletzung werden die Thrombozyten durch den Kontakt mit subendotheliales Kollagen aktiviert. Die Aggregation der Thrombozyten führt zur Blutgerinnung und die Freisetzung der thrombozytären Wachstumsfaktoren stimuliert die Wundheilung. In der späten resorptiven Entzündungsphase folgt eine akute Entzündung mit Einwanderung neutrophiler Granulozyten. Innerhalb von 24 Stunden sterben die neutrophilen Granulozyten ab. Nach Verletzung des Gewebes wandern die Fibroblasten von der Dermis in die Wunde ein und vermehren sich dort. Die Makrophagen stimulieren die Einwanderung von Fibroblasten und ihre Proliferation in der Wundregion, die für die vermehrte Bildung von Kollagen sorgen. Flüssigkeit und Plasmaproteine treten zunehmend aus der Blutbahn in das Gewebe ein und verursachen die Schwellung des Wundgebietes. Diese Phase dauert ca. 1-10 Tage. Für die Behandlung dieser Phase muss ein geeigneter, saugfähiger Wundverband verwendet werden, damit Gewebetrümmer, Bakterien, Blut und Exsudat rasch aufgenommen werden können. Ab dem dritten Tag bis zum 24. Tag folgt eine proliferative Phase. Kollagen und Blutgefäße werden gebildet. Neue Kapillaren aus dem gesunden Nachbargewebe wachsen in die neu gebildete Kollagenmatrix ein und es entsteht Granulationsgewebe. Die Epithelialisierung findet auf dieser Unterlage statt. Die Wunde darf in dieser Phase nicht austrocknen und der Wundschorf verzögert die Granulation und Epithelialisierung. Anschließend setzt die reparative Phase vor Abschluss der Epithelialisierung ein, die viele Monate lang dauern kann. Die Keratinozyten vom Wundrand und aus Haarfollikeln wandern konzentrisch zur Mitte hin. Dies wird durch zahlreiche Kontakt- und Signalsubstanzen gesteuert. Für den Aufbau der

Narbe werden von den Fibroblasten mehr Kollagen und Proteoglykane gebildet und danach setzt die Wundkontraktion ein (Aukhil, 2000). Viele lokale und systemische Störfaktoren führen zu Wundheilungsstörungen. Lokale Störfaktoren für die Wundheilung umfassen Makroangiopathie, Mikroangiopathie, Fremdkörper, Wundödem, Wundinfektion sowie starker lokaler Druck. Der Ernährungszustand der Patienten ist ein wesentlicher systemischer Störfaktor für die Wundheilung. Daraus resultieren Störungen des Metabolismus und eine verringerte Sauerstoffversorgung des Gewebes, die eine verzögerte Wundheilung verursachen.

1.1.2 Chronische Wunden

In chronischen Wunden wird die Proliferation der Progenitorfibroblasten gehemmt (Harding et al., 2005). Chronische Wunden oder Ulcera sind in der Regel die Wunden, bei denen innerhalb von 4 Wochen kein Wundverschluss erfolgt. Die häufigsten chronischen Wunden sind venöse Ulcera dekubiti und diabetisch-neuropathische und diabetisch-angiopathische Ulcera sowie Ulcera auf dem Boden von arteriellen Gefäßverschlüssen. Chronische Wunden werden meistens von chronischen Infektionen begleitet. Charakteristisch für chronische Wunden sind erhöhte Spiegel für entzündliche Zytokine, hohe Protease-Aktivität und verminderte Konzentrationen von Wachstumsfaktoren. Die Behandlung der chronischen Wunden hängt von vielen Faktoren ab. Sie schließt die Behandlung der Grundkrankheit ein. In Deutschland leiden schätzungsweise über 4 Mio. Menschen an chronischen Wunden. Chronische Wunden, die Monate lang nicht heilen und zu einer großen Minderung der Lebensqualität der Patienten führen, sind eine große medizinische Herausforderung (Dill-Muller and Tilgen, 2005). Außerdem brauchen die Patienten tägliche Pflege und ärztliche Behandlung der Wunden, was mit erheblichen finanziellen Kosten verbunden ist. In Deutschland werden die Kosten für die Behandlung des Dekubitus, des diabetischen Fuß-Ulcus und Ulcus cruris mit bis zum 5 Milliarden Euro pro Jahr angegeben (Nord, 2006).

1.1.3 Die Behandlung chronischer Wunden

Wundheilung ist ein komplexer, biologischer Vorgang. Er benötigt sowohl die zelluläre Interaktion zwischen verschiedenen Zellpopulationen bzw. Keratinozyten, Fibroblasten, Myofibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen als auch die Herausbildung neuer extrazellulärer Matrix. Diese Interaktion wird durch viele Faktoren reguliert, z.B. EGF (epidermal growth factor), KGF (keratinocyte growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IGF (insulin-like growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), TGF (transforming growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor) (Grazul-Bilska et al., 2003).

Die fehlende Reepithelialisierung des Wundgrundes ist die Hauptproblematik bei chronischen Wunden. Der Wundgrund ist so pathologisch verändert, dass die Keratinozyten vom Wundrand nicht über den Wundgrund migrieren können. Die Proliferation der Keratinozyten am Wundrand ist jedoch ungestört. Eine große Anzahl der Wunden kommt trotz dieser Therapie nicht zur endgültigen Ausheilung, d.h. zu Wundverschluss.

Die bisherige Behandlung chronischer Wunden stützt sich auf lokale und systemische, die Grunderkrankung angreifende Maßnahmen. Die lokale Therapie umfasst die Wundausschneidung und die Wundreinigung, die feuchte Wundheilung, die Physiotherapie, die operative Therapie sowie die Zell- und Wachstumsfaktor-Therapie bei schwer heilenden Wunden. Bei Wundausschneidung und Wundreinigung erfolgt die Entfernung von oberflächlichem, also epidermalem oder dermalem, und tiefer liegendem, subkutanem abgestorbenem Zellgewebe. Lokale Infektionen der chronischen Wunden verhindern die Wundheilung. Sie müssen deshalb behandelt werden. Interaktive Wundverbände können ein feuchtes Wundmilieu erhalten. Im Vergleich zur offenen, austrocknenden Wunde machen die feuchten Wundverhältnisse ein leichtes Wandern der frischen Epithelzellen möglich. Außerdem wird die Angiogenese durch die hervorgerufene Hypoxie bei feuchten Wundverhältnissen im Bereich der Wundoberfläche gefördert. Diese chronischen Wunden können durch operative Therapie oder Zell- und Wachstumsfaktor-Therapie behandelt werden. Diese Therapie umfasst allogene Keratinozyten und Fibroblasten, autologe Keratinozyten, Auto-Transplantation und die Behandlung mit Wachstumsfaktoren. Die Grundvoraussetzungen der operativen Therapie von chronischen Wunden sind ein guter Allgemein- und Ernährungszustand und die Korrektur von Stoffwechselerkrankungen. Es werden unterschiedliche operative Verfahren angewendet. Hauttransplantate sowie Mesh-, Spalt- und Vollhaut haben den Vorteil, dass die Entnahme und Deckungsmöglichkeit für chronische Wunden einfach ist. Systemische Therapie umfasst biomedizinische Intervention, Ernährungstherapie, Schmerztherapie und medikamentöse Therapie. Bei einer Infektion erfolgt systemische Antibiose.

Für die Therapie chronischer Wunden werden meistens konservativ verschiedene interaktive, nicht-biologische Wundverbände verwendet. Die Verwendung von Wachstumsfaktoren wie bFGF, TGF- β 2 and PDGF bei der Behandlung der chronischen Wunden wurde experimentell untersucht (Schultz et al., 2003). Klinisch wurde letztlich nur der Wachstumsfaktor PDGF (RegranexTM) angewendet. Die klinische Datenlage bleibt uneinheitlich. RegranexTM ist ein Produkt, das PDGF enthält und in Verbindung mit einer zusätzlichen guten Wundbehandlung die Granulation und dadurch die Heilung von tiefen, neuropathischen, chronischen sowie

diabetischen Ulcera von einer Größe bis zu maximal 5 cm² fördert. Der Bestandteil von RegranexTM, Becaplermin, ist ein rekombinanter humaner thrombozytärer Wachstumsfaktor-BB (rhPDGF-BB), der das Wachstum des normalen Gewebes zur Heilung von diabetischen Ulcera fördert.

Neben dem Einsatz der Wachstumsfaktoren wird zur Zeit versucht, mit interaktiven Hautersatzmaterialien eine bessere Heilung zu erreichen. Nach Erfolg der Kultivierung von Keratinozyten von Rheinwald und Green (1975) hatte O'Connor (1981) in ersten klinischen Anwendungen erfolgreich kultivierte, humane Keratinozyten auf Verbrennungswunden von Patienten aufgebracht (O'Connor, 1981). 1984 hatte Gallico *et al.* die erste klinische Anwendung von kultiviertem autologem, menschlichem Epithel zur Abdeckung großer Wunden angewendet (Gallico *et al.*, 1984). Azelluläre Matrix wurde von Burke *et al.* in klinischen Anwendungen für Verbrennungswunden verwendet (Burke *et al.*, 1981). Im letzten Jahrzehnt kam zellulärer und azellulärer Hautersatz für die Behandlung von Wunden zur Anwendung. Nach seiner Funktion lässt sich Hautersatz in zwei Kategorien einteilen: der temporäre Hautersatz und der permanente Hautersatz. Temporärer Hautersatz, beispielsweise biologische Xenografts, Allografts oder synthetische Membranen, bietet einen vorübergehenden Wundverschluss und wird vom Immunsystem abgestoßen oder muss entfernt werden. Permanenter Hautersatz, z.B. Epicel, Dermagraft oder Apligraf wird dauerhaft in die Wunde integriert.

Epicel sind autologe kultivierte Keratinozyten-Sheets, die nur wenige Zelllagen hat. Die Kultivierung von transplantatfähigen Keratinozyten-Sheets dauert ca. 3 bis 4 Wochen und verursacht hohe Kosten. Eine neue Entwicklung ist die Anwendung der kultivierten Keratinozyten-Sheets aus Haarwurzeln. Bei dieser Methode braucht man keine gesunde Haut entnehmen und sie lässt sich auch bei alten Patienten anwenden. Im Gegensatz zu autologen Keratinozyten-Sheets stehen die allogenen Keratinozyten-Sheets sofort zur Verfügung. Dazu werden fötale Keratinozyten verwendet, die wenig Risiko für allergische Reaktionen und hohe Teilungskapazität haben. Der kultivierte dermale Hautersatz bringt biologische aktive Zellen auf die Wunde. Diese therapeutischen Möglichkeiten haben den Vorteil, dass die Zellen nicht nur einen Wachstumsfaktor exprimieren, sondern eine Vielzahl von Mediatoren sezernieren, die alle physiologisch an der Wundheilung beteiligt sind. Üblicherweise werden die metabolisch aktiven Zellen in eine Matrix inkorporiert und dieses Konstrukt als biologischer Wundverband auf die Wunde aufgebracht. Diese wirkt sich stark auf Anheften, Migration, Wachstum und Differenzierung epithelialer Zellen aus. Apligraf ist eine Kombination aus humanen fetalen Fibroblasten, Keratinozyten und bovinem Kollagen. Vorteile sind sofortige

Verfügbarkeit und keine Retransplantation. Nachteile sind Virusübertragung und limitierter Aufbewahrungszeitraum nach der Fertigstellung.

Die idealen Eigenschaften von Hautersatz sind vielfältig, die wichtigste Eigenschaft ist die schnelle und anhaltende Anhaftung auf der Wundfläche. Ein idealer Hautersatz konnte bis jetzt nicht gefunden werden.

1.2 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut (Cutis) bedeckt die Oberfläche des Körpers und erfüllt als größtes Organ des Menschen zahlreiche und wichtige Aufgaben. Sie begrenzt die Oberfläche des Körpers, schützt den Körper vor Hitze, Licht, Verletzung und Infektion, reguliert die Körpertemperatur durch Schwitzen und verhindert Wasserverlust. Die gesamte Fläche der Haut beträgt ungefähr zwei Quadratmeter. Die Haut setzt sich zusammen aus der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis) und der Unterhaut (Subcutis), die untereinander in Verbindung stehen, voneinander abhängig sind und sich gegenseitig beeinflussen.

1.2.1 Die Epidermis

Die Epidermis, die äußerste Hautschicht der Haut, ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel in verschiedenen Differenzierungsformen u.a. Stratum corneum, Stratum graulosum, Stratum spinosum und Stratum basale. Die gefäßlose Epidermis besteht zu etwa 90% aus Keratinozyten, die sich in Hornzellen umwandeln. Zudem befinden sich in ihr auch Melanozyten (Pigmentsystem), Langerhans-Zellen (Immunsystem) und Merkelzellen (Nervensystem). Das Zytoskelett der Keratinozyten wird hauptsächlich aus Keratinen gebildet, die in bis zu 20 unterschiedliche Arten unterteilt werden. Eine einzelne Epithelzelle kann mehrere Keratinarten herstellen, durch Antikörper gegen Cytokeratine können die Proteine der Keratine gut dargestellt werden (Fuchs and Cleveland, 1998). Jedes Keratinfilament ist aus einer Mischung von saurem Typ I und basischem Typ II kombiniert. Basalzellen synthetisieren die Keratine 5 und 14 und manchmal die Keratine 15 und 17. Als Differenzierungsmarker in den suprabasalen Keratinozyten und in oberem Stratum spinosum befinden sich die Keratine 1 und 10. Die Paarung, Keratine 6 und 16 als Marker für hyperproliferative Epithelien treten nach Verletzung oder an Haarwurzelscheiden auf. Keratine 8 und 18 sind typische Marker für einschichtige Epithelien (Paladini et al., 1996). Involucrin ist ein terminaler Differenzierungsmarker der Keratinozyten, die von der Basalmembran nach außen zuwandern, und lagert sich in der frühen Stratum spinosum und

Stratum granulosum ein (Eckert et al., 2004; Watt, 1983). Der Aufbau des Epithels ist in Abbildung 1 dargestellt.

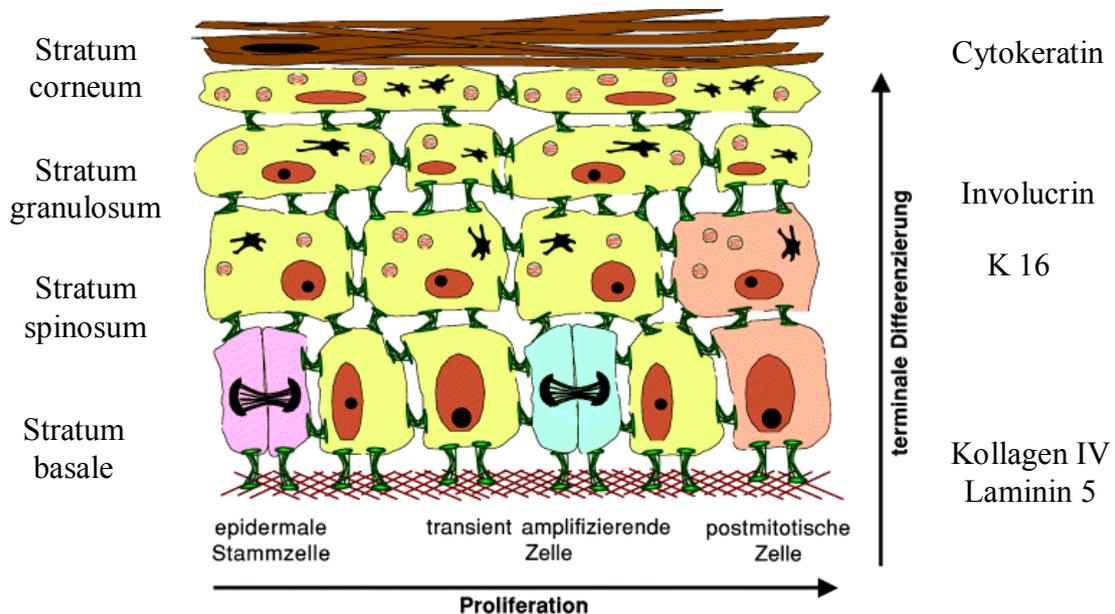


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Organisation von Epidermis und Lokalisation der Differenzierungsmarker (Rzepka et al., 2005)

Die Neubildung von Keratinozyten und die Zellabstoßung in der Epidermis finden ständig statt und werden genau reguliert. Die Basalzellen und suprabasale Zellen sind Pool der proliferationsfähigen Zellen. Danach differenzieren die Zellen zu amplifizierenden Zellen. Nach zwei bis fünf durchlaufenen Zellzyklen differenzieren die transient amplifizierten Zellen zu postmitotischen Zellen (Rzepka et al., 2005). Die Wachstumsfaktoren aus den Epidermiszellen und Fibroblasten regulieren die Proliferation der Keratinozyten. Die Transitzeit beträgt ungefähr vier Wochen. Die Veränderung der Keratinozyten wird deutlich durch Morphologie und Biochemie unterschieden.

1.2.2 Basalmembran

Die Basalmembran ist eine Proteinschicht einer spezialisierten extrazellulären Matrix und liegt als Grenzfläche zwischen Epidermis und Dermis, die sowohl von Fibroblasten als auch von Keratinozyten synthetisiert werden (Elkhal et al., 2004; Smola et al., 1998). Sie besteht vorwiegend aus Kollagen IV, Laminin 5 und Kollagen VII sowie anderen Proteinen wie Laminin-1 usw. und hat wichtige Mehrfachfunktionen bei Geweberegeneration, Migration, Wachstum und Differenzierung anderer Zelltypen (Watt et al., 1993). Kollagen IV kommt in verschiedenen Isoformen vor und sorgt für die mechanische Integrität und Stabilität. Während

der frühen Entwicklung enthält die Basalmembran aber wenig oder gar kein Kollagen IV, sondern besteht hauptsächlich aus Lamininmolekülen. Laminin-1, ein großes bewegliches Protein, besteht aus drei Polypeptidketten $\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$. Laminin-5, die Hauptkomponente der Lamina densa der Haut, besteht hauptsächlich aus den $\alpha 3$ -, $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Ketten und ist für die Verbindung zwischen Epidermis und Basalmembran verantwortlich (Rousselle et al., 1997). Nach Verletzung stimuliert Laminin-5 die Migration der Keratinozyten. Die fehlende Migration der Keratinozyten bei Verletzung bedingt die chronische Wunde.

1.2.3 Die Dermis

Die Dermis ist eine bis zu 3 mm dicke fibroelastische Schicht mit speziellen Eigenschaften wie Festigkeit, Elastizität und besteht aus Stratum papillare und Stratum reticulare. Das Stratum papillare ist eine oberflächliche, dünne, gefäß- und zellreiche Bindegewebsschicht und enthält Kollagenfasern vom Typ VII und Elastinfasern, die mit der Basalmembran verankert sind. Das Stratum reticulare ist eine tiefere, dickere Schicht und enthält kräftige Kollagenfaserbündel vom Typ I und zahlreiche Elastinfasern, die die Festigkeit und Zugelastizität der Haut gewährleisten. Die Bestandteile der Dermis setzen sich zu etwa 75% aus Kollagenfasern zusammen. Fibroblasten sind die wesentlichen Zellen der Dermis und können Kollagenfasern synthetisieren oder abbauen. Neben den Fibroblasten befinden sich in der Dermis auch Entzündungszellen, Blut- und Lymphgefäße. Die Hautdrüsen, Haarwurzeln und meisten Sinnesrezeptoren sind in die Dermis eingebettet.

1.3 Das Fibroblastenzellsystem

Fibroblasten sind ein wichtiger Bestandteil des Bindegewebes, zeigen aber unterschiedliche charakteristische Phänotypen in Abhängigkeit des Gewebegebietes (Castor et al., 1962). Das Fibroblastenzellsystem der Haut (siehe Abb.2) besteht aus Progenitorfibroblasten (MF) und differenzierten Fibrozyten (PMF) (Bayreuther et al., 1988a). Drei Zelltypen von Vorläuferfibroblasten, MF I, MF II und MF III, existieren bei Menschen. Nach dem Auslaufen der Teilungsaktivität im Zelltyp MF III differenziert diese Zelle über die postmitotischen Funktionsfibrozyten PMF IV und PMF V zum terminalen Funktionstyp PMF VI. Diese unterschiedlichen Zelltypen sind durch β -Gal Färbung gekennzeichnet.

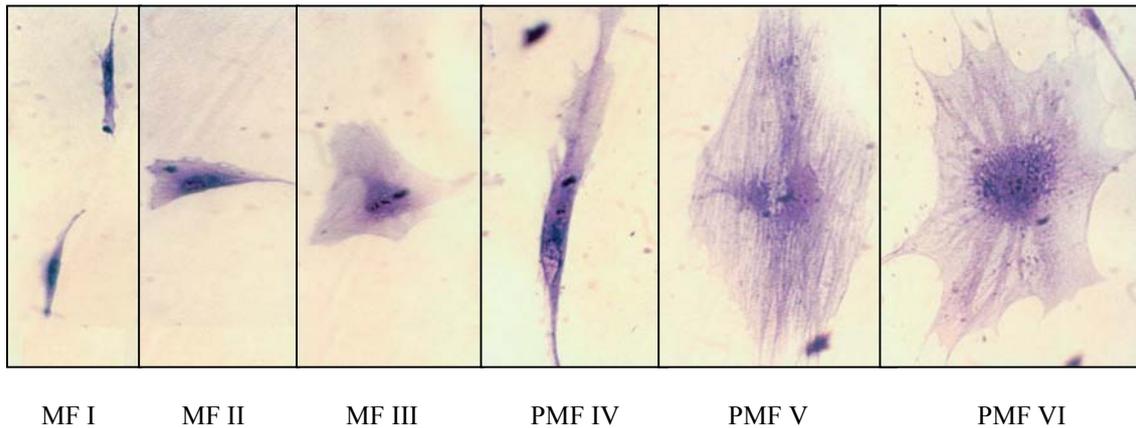


Abbildung 2: Das Progenitor-kompartiment und Funktionskompartiment des Fibroblasten-Zellsystems, bestehend aus den potentiell mitotisch aktiven Progenitorfibroblasten MF I, MF II und MF III und postmitotischen Funktionsfibrozyten PMF IV, PMF V und PMF VI; (Vergrößerung: x 50)

Die Progenitorfibroblasten differenzieren *in vitro* nach ca. 50-60 Populationsverdopplungen zu postmitotischen Fibrozyten. Der terminale Differenzierungsprozess kann *in vitro* auch durch Behandlung von Mitomycin C oder UV- bzw. ionisierende Strahlung induziert werden (Rodemann, 1989; Rodemann et al., 1991b). Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen kann dieses Zellstammsystem somit auch in das Progenitor-Kompartiment und Funktions-Kompartiment eingeteilt werden.

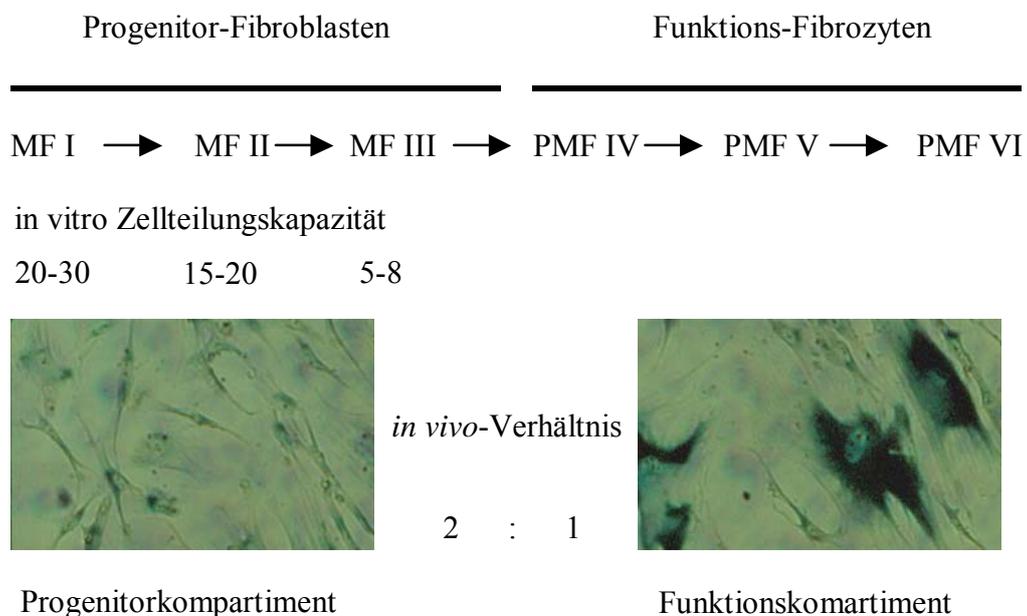


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus des Fibroblastenzellsystems von β -Gal Färbung (aus Rodemann, 1996)

Das Progenitor-kompartiment setzt sich aus den drei potentiell teilungsfähigen Progenitorfibroblasten MF I, MF II und MF III zusammen, die eine unterschiedliche Teilungskapazität haben (siehe Abb. 3): MF I kann maximal ca. 25-30 Zellteilungen durchlaufen, MF II ca. 20 Zellteilungen und MF III ca. 5-8 Zellteilungen. Nach Ablauf des spezifischen Teilungspotentials differenziert die jeweilige Zelle in den nächst höheren Zelltyp (MF I → MF II → MF III). Anhand von *ex vivo/in vitro* Untersuchungen an Hautbiopsiematerial von Spendern verschiedener Altersgruppen konnte gezeigt werden, dass beispielsweise in der Dermis altersunabhängig ein ausgewogenes und konstantes Verhältnis von mitotischen Progenitorfibroblasten und postmitotischen Fibrozyten von 2:1 besteht. Die Aufrechterhaltung dieses ausgewogenen Verhältnisses von Progenitorfibroblasten zu Fibrozyten ist für die zelluläre und biochemische Homöostase des Bindegewebes von entscheidender Bedeutung zu sein (Rodemann et al., 1996).

1.4 KGF – “Keratinocyte-Growth-Factor”

Wachstumsfaktoren regen das Zellwachstum an, indem sie die Synthese von Proteinen und anderen Makromolekülen fördern und deren Abbau hemmen. Im Jahr 1989 wurde der Keratinozyten Wachstumsfaktor (KGF) von Rubin *et al.* entdeckt. KGF setzt sich aus 194 Aminosäuren zusammen und gehört zur FGF-Familie. KGF hat ein Molekulargewicht von ca. 22,5 kDa und ist ein starkes und spezifisches Mitogen für unterschiedliche Arten der Epithelzellen. (Finch et al., 1989; Rubin et al., 1989). Aufgrund dieser Eigenschaft ist KGF für die Reparatur verletzter Epithelgewebe von besonderer Bedeutung. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Expression von KGF bei Hautverletzungen zunimmt (Werner et al., 1992). Der KGF-mRNA-Gehalt in basalen Keratinozyten steigt nach akuten Verletzungen der Haut bei Menschen um das 160-fache (Marchese et al., 1995). Bei der Reepithelialisierung humaner Haut spielt KGF ebenfalls eine wichtige Rolle, und auch die Adhäsion der Keratinozyten an die extrazelluläre Matrix wird durch KGF stimuliert (Marchese et al., 1995). Nach Verletzung des Gewebes werden zahlreiche Faktoren, einschließlich Interleukin-1 und TNF- α , aus Entzündungszellen, endothelialen Zellen und Keratinozyten freigesetzt. IL-1- α , IL-1 β und TNF- α induzieren dabei eine Erhöhung der KGF-Expression bei Fibroblasten. Fibroblasten als Hauptquelle des KGF sind für Wachstum und Differenzierung der Keratinozyten verantwortlich (Tang and Gilchrist, 1996). Ein Experiment von Maas-Szabowski *et al.* zeigte, dass die Regeneration der Epidermis in organotypischer Kokultur mit Fibroblasten hauptsächlich durch IL-1 reguliert wird. IL-1 induziert auch die KGF-Expression bei kokultivierten Fibroblasten (Maas-Szabowski et al., 2000). In der ohne Fibroblasten

besiedelten 3D-Kultur wurde die Expression von Keratin 6, Keratin 16 und Keratin 17 nicht von IGE, PDGF und TGF- β , sondern von KGF beeinflusst (El Ghalbzouri et al., 2002).

1.5 ECM (Die extrazelluläre Matrix) und 3D-Kulturmodelle der Haut *in vitro*

Die Keratinozyten sind in einer kompliziert aufgebaute extrazelluläre Matrix eingebettet, die nicht nur die Bindung von Zellen aneinander, sondern auch deren Überleben, Form, Polarität und Verhalten beeinflusst. Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht hauptsächlich aus zwei Hauptklassen von Makromolekülen: Polysaccharide vom Glykosaminoglykan-Typ (GAGs) und faserförmige Proteine, insbesondere Kollagen, Elastin und Laminin. Kollagene als Faserproteine sind ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix. Die Makromoleküle der extrazellulären Matrix werden im Wesentlichen von Fibroblasten bzw. Fibrozyten gebildet. Kollagen-Typ-I ist ein essenzielles Kollagen im menschlichen Bindegewebe, besonders in Knochen, Sehnen und der Haut.

1.6 3D-Trägersysteme

Kollagenfasern beeinflussen die Verteilung der Fibroblasten und umgekehrt beeinflussen die Fibroblasten die Orientierungspolarisation der Kollagenfasern. Durch membrangebundene Proteine heften sich die Fibroblasten an die Kollagenfasern. Elastin, der Bestandteil der elastischen Fasern, verleiht den Geweben ihre Elastizität. Die Wundheilung der Haut hängt von vielen Faktoren ab, z.B. Entzündung, Proteinsynthese, Matrixablagerung und Migration und Proliferation der Keratinozyten vom Wundrand. Ein wichtiger Regulator ist die Interaktion zwischen extrazellulärer Matrix und Wachstumsfaktoren (Clark, 1993). Die Wechselwirkungen zwischen den Wachstumsfaktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix beweisen, dass diese Interaktion ein kritischer Punkt für die Wundheilung ist (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Die epithelial-mesenchymale Interaktion kontrolliert das Wachstum des Epithels und beeinflusst die Differenzierung der Epidermis (Fusenig et al., 1994). Um die Zellwanderung der Fibroblasten zu gewährleisten, werden die Bestandteile der Matrix von extrazellulären, proteolytischen Enzymen abgebaut. Die meisten von ihnen sind Ca^{2+} - oder Zn^{2+} -abhängige Matrix-Metalloproteasen (MMP).

Seit Rheinwald und Green (1975) zum ersten Mal humane Keratinozyten etabliert hatten, wurden verschiedene Kokultursysteme entwickelt, um die *in vivo*-Situation der normalen Haut nachzuahmen (Limat et al., 1989). In organotypischer Kultur wurden die Keratinozyten bei Luft-Kontakt auf verschiedenen Matrices als Hautersatz kultiviert (Schoop et al., 1999). Solche Kultursysteme wurden weitergehend für die Untersuchung von Genexpression,

epithelial-mesenchymale Interaktion und Wundheilung verwendet. Die epithelial-mesenchymale Interaktion bei der Wundheilung *in vivo* ist ein sehr komplexer Prozess und schwer zu untersuchen, weil *in vivo* zahlreiche Faktoren eine Rolle spielen. Hinsichtlich der drei-dimensionalen Kultursysteme wurden die Untersuchungen für Zellwachstum und Zell-Zell-Interaktion *in vitro* hauptsächlich mit Keratinozyten und Fibroblasten durchgeführt (Maas-Szabowski et al., 1999). Die mesenchymalen Fibroblasten in diesen drei-dimensionalen Kulturmodellen waren ein kritischer Faktor, da nämlich ohne kokultivierten Fibroblasten die Keratinozyten schneller ausdifferenzierten (Maas-Szabowski et al., 2000). Nur unter solchen drei-dimensionalen mit Fibroblasten kokultivierten Kulturbedingungen wurden von primären Keratinozyten verschiedene Differenzierungsmarker produziert und eine Basalmembran zwischen Epidermis und Dermis gebildet. MatriDerm aus nativen Kollagen eignet sich als Zellträger aufgrund einer Vielzahl positiver Eigenschaften. Es ist nicht toxisch für Fibroblasten sowie Keratinozyten und wird deshalb in dieser Arbeit für die 3D-Kultur verwendet.

1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen biologischen Hautersatz (*COMPOSITE*) unter Verwendung autologer Progenitorfibroblasten/Funktionsfibrozyten und einem biokompatiblen Trägersystem zur Behandlung von chronischen Wunden herzustellen. Die unterschiedlichen Differenzierungszustände der autologen Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten des dermalen Bindegewebes werden auf Kollagenmatrix inkubiert und für einen biologischen Hautersatz untersucht. Ausgehend von diesen Erkenntnissen soll ein neuer Ansatz zur Behandlung chronischer Wunden durch autologen Hautersatz dargestellt werden.

Ein wichtiger Aspekt in dieser Untersuchung ist das Fibroblasten/Fibrozyten-Zellsystem. Ein weiterer Aspekt bei der Behandlung der chronischen Wunden mit dem Hautersatz ist der geeignete Zellträger. Hierzu soll aus autologen Fibroblastenvorläuferzellen bzw. deren terminal differenzierten Funktionsderivaten (Funktionsfibrozyten) und deren Einsaat mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen in MatriDerm ein biologischen Hautersatz für die Therapie von Patienten mit chronischen Wunden hergestellt werden. Es soll geprüft werden, ob einen entsprechend der *in vivo*-Zusammensetzung des Fibroblasten-/Fibrozyten-Zellsystems (Progenitorfibroblasten:Funktionsfibrozyten im Verhältnis 2:1) hergestelltes *COMPOSITE* entscheidende Vorteile gegenüber bislang verwendeten, zellbesiedelten *COMPOSITES* erbringt.

Im Rahmen des Projektes wurden folgende Fragen beantwortet:

Frage 1: Zeigen die verschiedenen Differenzierungsstadien von Fibroblasten und Fibrozyten Unterschiede in der Synthese von KGF im zwei-dimensionalen Kultursystem?

Frage 2: Gibt es Unterschiede im Wachstumsverhalten von Keratinozyten und Fibroblasten in zwei-dimensionaler Kultur im Bezug auf unterschiedliche Medien?

Frage 3: Gibt es Unterschiede im Wachstumsverhalten von Keratinozyten im drei-dimensionalen Kokultursystem mit Fibroblastenpopulationen, die entweder aus reinen Progenitorfibroblasten (MF) sowie postmitotischen Funktionsfibrozyten (PMF) oder einer 2:1-Mischung aus Progenitorfibroblasten und postmitotischen Funktionsfibrozyten (MF:PMF 2:1)?

Frage 4: Fördert die Besiedelung von 3D-Matrices (d.h. MatriDerm) mit spezifischen Differenzierungsstadien von Fibroblasten und Fibrozyten die Auswanderung und Proliferation von Keratinozyten aus Spalthaut?

Frage 5: Fördert die Besiedelung von 3D-Matrices (i.e. MatriDerm) mit spezifischen Differenzierungsstadien von Fibroblasten und Fibrozyten die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten?

Frage 6: Induzieren 3D-Matrices (d.h. MatriDerm) besiedelt mit spezifischen Differenzierungsstadien von Fibroblasten und Fibrozyten die Stratifizierung und Epithelialisierung der Keratinozyten?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und sonstige Materialien

Brutschrank mit CO ₂ -Begasung	Heraeus
Casy	Schärfe System
Einfrierröhrchen	Nunc TM
ELISA-Reader	Beckmann
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135 Zeiss
Freezing Container	Nalgene
Jung RM 2065	Leica
Kulturröhrchen	Greiner bio-one
Lichtmikroskop	Zeiss
LightCycler [®]	Roche
Spritzen	BD Plastipak TM
Sterilfilter	Millipore
TES 99	Medite
Ofen	Heraeus
PCR-Gerät	Perkin-Elmer
Zentrifugen	Eppendorf
Zellkultur Material	Falcon

2.2 Chemikalien

Aceton	Merck
Bromphenolblau	Sigma
Coomassie Brillant Blau Tabletten	Serva
DAPI	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dinatriumhydrogenphosphat	Serva
Ethanol	Merck
EDTA	Sigma
Formaldehyd	Merck
Giemsa	Serva
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Roth

β-Glycerophosphat	Sigma
Glycin	Sigma
Insulin	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
L-ascorbic acid	Sigma
Methanol	Merck
Mowiol	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Biochrom
Natriumhydroxid	Sigma
Natriumfluorid	Sigma
Penicillin	Biochrom
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Silan (3-Aminopropyltriethoxysilan)	Sigma
Streptomycin	Biochrom
Tris-Base	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Triton-X	Serva
Trypsin	Serva
Tween 20	Roth
X-Gal	Promega
Xylolersatzstoff	Medire

2.3 MatriDerm

MatriDerm ist ein dreidimensionaler *Kollagen-Elastin*-Träger der Firma Dr. Suwelack Skin & Health Care AG und besteht aus bovinen nativen strukturierten Kollagenfibrillen mit Elastin für die dermale Regeneration. Die Kombination von Elastin und Kollagen in MatriDerm ergibt ein stabiles Netz. MatriDerm (Charge: L347703) wird als klinisch zugelassenes, biokompatibles und *in vivo* degradierbares Produkt eingesetzt. Die Struktur von MatriDerm ist in Abbildung 4 dargestellt.

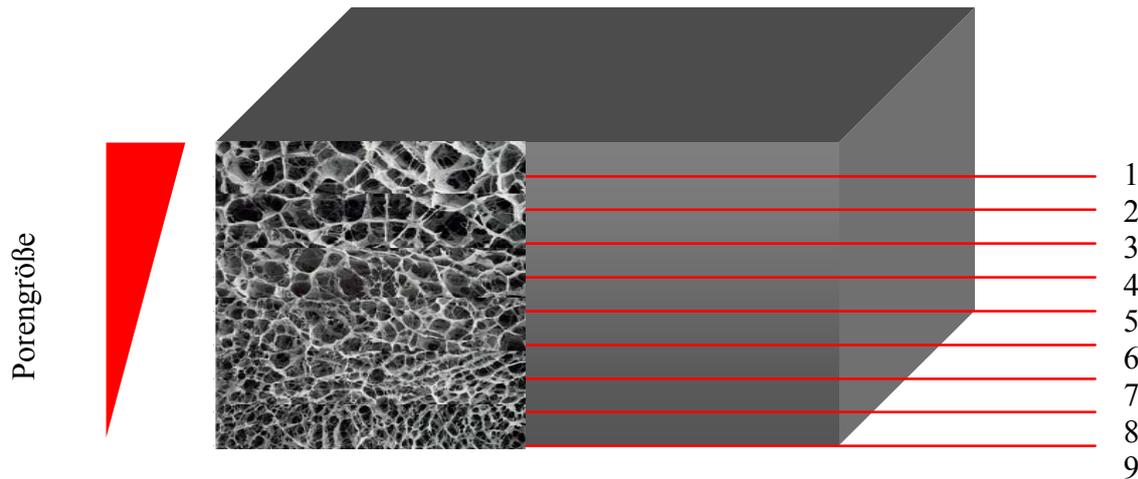


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur von MatriDerm.

Nach Anfertigung des MatriDerms wird das Produkt horizontal in neun jeweils 2 mm dicke sogenannte Spalten geschnitten (Spalt 1 bis Spalt 9). Die Porengröße nimmt von Spalt 1 bis Spalt 9 ab. Eine Quantifizierung der Porenfläche und Porendurchmesser wurde von der Fa. Suwelack Health Care AG für Spalt 1, 5 und 9 vorgenommen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgende Tabelle dargestellt.

Schicht (Dicke 2mm)	Durchmesser [μm] Durchmesser
Spalt 1	> 60
Spalt 5	35-45
Spalt 9	< 25

2.4 Zellkultur

Progenitorfibroblasten und Keratinozyten wurden aus Hautgewebe, welches bei Operationen an Patienten der Klinik für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und Verbrennungschirurgie übrig bleibt, nach Standardmethoden isoliert und in Primärkultur etabliert. Zur Durchführung der Experimente wurden 51 Hautbiopsien verwendet, wovon 8 für die Etablierung der Human-Fibroblastenzellstämme und 43 für Human-Keratinozytenzellstämme ausgewählt wurden. Die Hautentnahme und Einbringung der daraus isolierten Zellen in diese Studie waren durch die Ethikkommission der Eberhard-Karls Universität Tübingen genehmigt. HaCaT-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Petra Boukamp (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Inkubation aller Zelltypen wurde in einem Brutschrank bei 37°C und 93% Feuchtigkeit mit

7% CO₂-Begasung durchgeführt. Alle Materialien, Lösungen und Substanzen für die Zellkultur wurden vor Gebrauch entweder sterilisiert/autoklaviert oder mittels Sterilfilter steril filtriert.

2.4.1 Medien, Puffer und Lösungen

DMEM	Dulbecco's Modified Eagles' Medium (Life Technologies)
Serum	Fötales Rinderserum, Gibco bzw. BioWhitaker
Keratinocyten-SFM	Serumfrei Keratinocyten Medium mit L-Glutamin, BPE und rEGF (GIBCO)
3D Kultur Medium	Mischung von Keratinocyten-SFM und DMEM im Verhältnis 2:1 + 10% FCS
β-Gal-Färbung-Puffer	7,68g Zitronensäuer, 2,112g Kalium-Ferrocynide, 1,64g Kalium-Ferricyanid, 8,76g NaCl, 0,4g MgCl ₂ x6H ₂ O in 1L H ₂ O _{dd} , PH 5,5
PBS ⁻	8,0g NaCl, 1,44g Na ₂ HPO ₄ , 0,2g KCl und 0,2g KH ₂ PO ₄ in 1L H ₂ O _{dd}
10 x TBS-Puffer	30,3g Trizma base, 81,8g NaCl in 1L H ₂ O _{dd} , PH 7,5
1 x TBS-Tween	10% 10 x TBS, 0,5% Tween 20 in 1L H ₂ O _{dd}
0,1 % Tris-BSA	100 ml 1 x TBS, 100 mg Albumin fraktion V aus Rinderserum
Trypsin/EDTA	0,05% Trypsin + 0,2% EDTA in PBS ⁻ -Lösung

2.4.2 Keratinocyten, Fibroblasten und HaCaT-Zellen

2.4.2.1 Kultivierung humaner Keratinocyten

Ein Hautstück wurde 3-mal in Penicillin-Streptomycin-Lösung gewaschen und in 15 ml-Röhrchen in ca. 5 ml 0,25% Trypsin/ 0,1% EDTA über Nacht bei 4°C (ca. 14-16 Stunden) inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Trypsin abgesaugt. Die Epidermis wurde mit einem Spatel mechanisch abgeschabt und zerteilt. Die Zellen wurden in 10 ml DMEM mit 10% FCS in ein 15 ml-Röhrchen aufgenommen und zentrifugiert (RT, 3 min, 1000U/min). Der

Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde in Keratinozyten-SFM Medium resuspendiert, die Zellsuspension in eine T75-Flasche überführt und im Brutschrank inkubiert. Alle drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Bei Erreichen einer 70-80 % Konfluenzrate wurden die Zellen mit 4 ml 0,05% Trypsin bei Raumtemperatur trypsinisiert, und mit PBS gewaschen, um die Fibroblasten zu entfernen. In Passage 1 wurden die Zellen kryokonserviert.

2.4.2.2 Kultivierung humaner Fibroblasten

Die fettfreien Biopsien wurden 3-mal in Penicillin-Streptomycin-Lösung gewaschen. Das Hautstück wurde mit einem Skalpell in ca. 1 mm³ große Stück geschnitten und diese auf 6 cm-Schalen ausgelegt. Nach kurzem Antrocknen wurden 5 ml DMEM + 20% FCS zugegeben und die Biopsien im Brutschrank inkubiert. Jede Woche erfolgte ein Mediumwechsel. Nach ca. 3-4 Wochen waren die Fibroblasten konfluent und wurden subkultiviert. Spätestens nach der fünften Passage wurden die Zellen eingefroren.

2.4.2.3 Die HaCaT-Zellen

Die humanen HaCaT-Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Petra Boukamp vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die Zellen stammen aus einem exzidierten Melanom-Biopsat eines 62-jährigen Patienten. Der Name „HaCaT“ kommt ursprünglich aus den primären Kulturbedingungen: humane Haut, niedriger Ca²⁺-Gehalt (0,2 mM) und erhöhte Temperatur (38,5 °C). Diese Zelllinie ist immortalisiert und behält die Fähigkeit zur Differenzierung ohne Tumorigenität. Die Differenzierungsmarker, z.B. Keratin, Involucrin und Filaggrin werden bei HaCaT-Zellen exprimiert. Wegen der unter *in vitro* Bedingungen schnell ablaufenden Differenzierung primärer Keratinozyten werden die immortalisierten HaCaT-Zellen häufig bei Untersuchungen für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkung verwendet.

2.4.3 DAPI-Färbung

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzmarker, der durch intakte Zellmembranen hindurchwandern kann, und wird oft in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Der DAPI-Test ist eine Methode zur Kontaminationskontrolle für Mycoplasmen. Die Mycoplasmen erscheinen als gleichmäßig geformte, kleine, hell leuchtende Punkte. Kernreste zerfallender Zellen sowie Bakterien und Pilze sind wesentlich größer und anders geformt als Mycoplasmen. Für den Test wurden jeweils 2x10⁴ Zellen pro Well von der Zelllinie, die zu untersuchen ist, auf sterilen Deckgläschen in 6-Well-Platte ausgesät. Am

folgenden Tag wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit 5 µg/ ml DAPI für 20 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Deckglas mit PBS⁻ gewaschen und mit 100-fachem Ölimmersionsobjektiv mikroskopiert. Für die Darstellung der Zellmigration und den Nachweis von HaCaT-Zellen, Keratinozyten und Fibroblasten wurde das MatriDerm ebenfalls mit DAPI angefärbt.

2.4.4 β-Gal-Färbung

Das Enzym SA-β-Galactosidase existiert bei humanen Fibroblasten. Bei postmitotischen Fibrozyten ist die Expression und Aktivität von SA-β-Galactosidase erhöht. Bei PH 5,5 spaltet dieses Enzym das Substrat [5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid (X-Gal)], wodurch es eine Blaufärbung kommt (Dimri et al., 1995).

Die Fibroblasten wurden in eine 6 cm Schale mit einer Zelldichte von 10⁴ ausgesät und über Nacht im Brutschrank gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit 0,2% Glutaraldehyd oder 3% Formaldehyd für 3 bis 5 Minuten fixiert. Dann wurden die Zellen mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. X-Gal-Stammlösung (20mg/ml) wurde in N,N-Dimethylformamid-Lösung vorbereitet. Dann wurde diese Stammlösung in β-Gal-Färbung-Puffer verdünnt (1:20). Diese Lösung wurde zuerst durch einen Filter und dann auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 16 Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln und ohne CO₂ inkubiert. Nach 16 Stunden wurde die Färbung abgestoppt. Nachdem das Präparat mit PBS-Puffer gewaschen wurde, wurden die Zellen unter dem Mikroskop ausgewertet. Die β-Gal-positiven Zellen sind dabei blau gefärbt.

2.4.5 Passagieren von Keratinozyten, Fibroblasten und HaCaT-Zellen

Konfluente Fibroblastenkulturen oder 70-80 % konfluente Keratinozyten wurden zweimal mit jeweils 10 ml PBS⁻ gewaschen und mit 1,5 ml/T 75 Trypsin für ca. 5 min im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen abgelöst waren, wurden 5 ml DMEM + 10% FCS zum Abstoppen der Trypsinwirkung dazu gegeben und die Zellen vereinzelt. Anschließend wurde die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Für die Subkultivierung der Fibroblasten wurden jeweils 8 x 10⁵ Zellen in 10 ml Medium pro Kulturflasche T75 ausgesät. Für die Passagen der Keratinozyten und HaCaT-Zellen wurden konfluente HaCaT-Zellen sowie 70-80 % konfluente Keratinozyten mit einer 1:3 Verdünnung subkultiviert.

2.4.6 Kryokonservierung und Auftauen von HSF, Keratinozyten und HaCaT-Zellen

Konfluente Fibroblasten oder HaCaT-Zellen sowie 70-80 % konfluente Keratinozyten wurden trypsiniert, gezählt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde dann in entsprechendem eiskaltem Einfriermedium resuspendiert (DMEM + 20% FCS + 5% DMSO für Fibroblasten, DMEM + 20% FCS + 10% Glycerin für HaCaT Zellen und DMEM + 50% FCS + 10% DMSO für Keratinozyten), sodass die Zellkonzentration 2×10^6 Zellen/ml betrug. Von dieser Suspension wurde jeweils 1 ml in vorgekühlte Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden im Einfriertank in einer speziellen Vorrichtung in unterschiedlichen Zeiten (15, 30 und 60 min) in drei verschiedenen Höhen über dem flüssigen Stickstoff gehalten. Dieses Vorgehen ergibt eine Absenkung der Temperatur um ca. 1°C pro Minute. Danach wurden die Röhrchen komplett in flüssigem Stickstoff gelagert.

Beim Auftauen wurden die Kryoröhrchen ins Wasserbad bei 37°C gelegt bis noch ein kleines Eisklumpchen sichtbar war. Die Zellen wurden dann sofort in eine Kulturflasche mit entsprechendem Kulturmedium gebracht. Nachdem sich die Zellen auf dem Boden (nach ca. 4-6 Stunden) abgesetzt hatten, wurde die Anwachsrate mit dem Mikroskop bestimmt und das Medium durch normales Kultivierungsmedium (s.o.) ersetzt.

2.4.7 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest stellt eine sensitive Methode zur Analyse des klonogenen Wachstums von Einzelzellen dar. Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit der Fibroblasten wurden 500 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte oder 1000 Zellen in eine 10 cm-Schale in entsprechenden Medien ausgesät. Die Zellen wurden dann für 10-12 Tage im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Koloniekulturen mit PBS⁻ gewaschen und jeweils 10 min in Formaldehydlösung und Alkohol fixiert. Nach Spülung unter Leitungswasser wurden die Platten oder Schalen im Wärmeschrank getrocknet. Anschließend wurden sie 30-40 Sekunden mit Coomassielösung und 30-40 min Giemsa-Färbelösung zur Anfärbung der Zellkolonien inkubiert. Die Koloniebildungsfähigkeit wurde durch Auszählen der Kolonien, die aus mehr als 50 Einzelzellen bestanden, ermittelt pro Kulturgefäß. Die Klonierungseffizienz (*plating-efficiency*, PE) wurde dann so berechnet:

$$\text{PE} = \text{Mittelwert der Klone} > 50 \text{ Zellen/ausgesäte Zellzahl}$$

2.4.8 Anreicherung von MF und PMF Zellen für KGF-Bestimmung

Die Fibroblastenkulturen wurden mit Zellzahlen von 10^3 pro 10 cm Schale ausgesät und für 12 Tage in DMEM + 10% FCS inkubiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden Klone der verschiedenen Progenitorfibroblasten MF I, MF II und MF III identifiziert. Diese wurden mit Glasring umgeben und subkultiviert. Zur Herstellung von PMF-Zellen wurden die Fibroblasten 3-4-mal mit MMC ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) behandelt, und nach 3 Wochen die PMF-Zellen mit β -Gal-Färbung identifiziert. Die PMF-Zellen wurden mit X-Gal durch die β -Galactosidase blau gefärbt. Die bei der β -Gal-Färbung positiven Zellen wurden als postmitotische Fibroblasten verwendet.

2.4.9 Proliferationskinetik in der Monokultur

Für die Proliferationskinetik von Fibroblasten, humanen Keratinozyten und HaCaT-Zellen wurden jeweils 2×10^4 Zellen in 3 Wells von einer 6-Well-Platte in entsprechenden Medien (DMEM, DMEM + 10% FCS, SFM, SFM/DMEM, SFM/DMEM + 10% FCS) ausgesät. Zur Ermittlung der Zelltyp-spezifischen Proliferationsrate wurde nach 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 und 15 Tagen die Zellzahl mit einem Zellzählgerät (Casy) bestimmt.

2.4.10 Proliferationskinetik in Kokultur-System

Um die Proliferationskinetik von Fibroblasten und Keratinozyten in KoKultur-Bedingungen zu untersuchen, wurde ein Kokultursystem verwendet, das aus 6-Well-Platten und einem speziellen Filtereinsatz besteht. Das Kokultursystem ist in Abbildung 5 dargestellt.

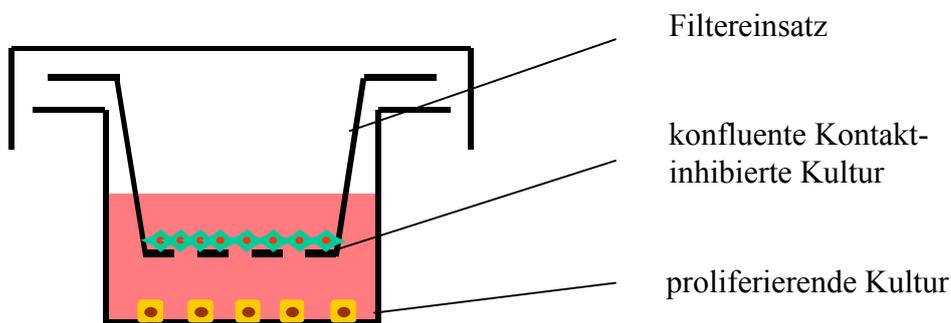


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Kokultursystems

Für die Proliferationskinetik von Fibroblasten wurden HaCaT-Zellen in 6-Well-Platten mit jeweils 2×10^4 Zellen pro Well in DMEM + 10% FCS ausgesät. An den Tagen 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 und 15 wurde die Zellzahl mit dem Zellzählgerät Casy bestimmt.

Für die Proliferationskinetik von HaCaT-Zellen wurden jeweils 2×10^4 Zellen pro Well in 6-Well-Platte in SFM/DMEM (2:1) + 10% FCS Medium ausgesät. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde die Zellzahl mit dem Zellzählgerät bestimmt. Für die Kokultur von HaCaT-Zellen mit Fibroblasten, die entweder aus reinen Progenitorfibroblasten (MF), postmitotischen Fibrozyten (PMF) oder einer 2:1-Mischung aus Progenitorfibroblasten und postmitotischen Funktionsfibrozyten (MF:PMF) bestehen, wurden 10^5 Fibroblasten pro Insert in 6-Well-Platten in DMEM + 10% FCS zwei Tage vor der Kokultur ausgesät. Zum Zeitpunkt der Kokultur wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 1,5 ml des entsprechenden Mediums zugegeben. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Zellzahl mit dem Zellzählgerät bestimmt.

Für die Proliferationskinetik von primären Keratinozyten wurden jeweils 2×10^4 Zellen pro Well in 6-Well-Platten in SFM-Keratinozyten Medium ausgesät. Die Aussaat der Fibroblasten für die Kokultur und die Bestimmung der Zellzahl wurde wie zuvor geschrieben durchgeführt.

2.5 Bestimmung der KGF-Expression und des KGF-mRNA-Gehalts von Progenitorfibroblasten und differenzierten Fibrozyten

Die Protein-Expression und der mRNA-Gehalt von KGF in verschiedenen Fibroblastenpopulationen wurden mittels ELISA und Real-time RT-PCR untersucht.

2.5.1 Bestimmung der KGF-Expression im Zellkulturüberstand mittels ELISA

Zur Bestimmung der KGF-Expression wurden die Überstände der verschiedenen Zellkulturen, die zu analysieren waren, mit ELISA (R&D Systems) untersucht. KGF-ELISA ist eine immunologische Nachweismethode, bei der spezifische Antigene oder Antikörper an den Mikrotiterplatten gebunden sind. Nach Entfernung der ungebundenen Antikörper werden die Anti-Antikörper zugegeben. Es gibt eine Farbreaktion durch zugefügtes Substrat und dies ermöglicht eine quantitative Messung. Für die Untersuchung der KGF-Expression von konfluenten Fibroblasten wurden ca. 0,8 Mio. Progenitorfibroblasten in T75 Flaschen ausgesät. Nach Konfluenz wurde das Medium abgesaugt, die Zellkultur 2-mal mit PBS gewaschen und wieder DMEM + 10 % FCS oder nur DMEM zugegeben. Die Überstände wurden nach 24 und 48 Stunden gesammelt, zentrifugiert und eingefroren. Für die

Untersuchung der KGF-Expression von Logphase-wachsenden Fibroblasten und von postmitotischen Fibrozyten wurden ca. 0,4 Mio. Progenitorfibroblasten in T75 ausgesät, nach einem Tag das Medium abgesaugt und dann wie vorher beschrieben weiter gemacht. Danach wurden die gesammelten Überstände nach dem Standardprotokoll des ELISA-Kit behandelt und ausgewertet.

2.5.2 Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (real-time RT-PCR)

2.5.2.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Für die Bestimmung des mRNA-Gehalts von KGF wurde die RNA, die aus Progenitorfibroblasten und postmitotische Fibrozyten isoliert wurde, in einer reversen Transkriptionsreaktion in cDNA umgeschrieben. Die Isolation der RNA wurde mit dem Total RNA Isolation NucleoPin[®] RNA II Kit nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Die Messung der RNA wurde am Gene Quant II (Pharmacia Biotec) durchgeführt. Formel für die Berechnung der Konzentration:

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g RNA / ml}$$

$$\text{RNA-Konzentration [mg/ml]} = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Umschreibung von RNA in cDNA wurde mit dem First Stand cDNA Synthesis Kit (Roche) durchgeführt. Pro Reaktion wurden jeweils 1 μg gesamt-RNA und 2 μl Primer mit Wasser auf 10,2 μl eingesetzt. Nach Denaturierung (70 °C, 10 min) wurden die Reaktionsgefäße sofort für 5 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurde 9,8 μl Mix (2 μl 10 x Puffer, 4 μl MgCl_2 , 2 μl dNTP-Mix, 1 μl Rnase-Inhibitor, 0,8 μl AMV-RT) hinzupipettiert. Reaktionsgefäße mit dem vervollständigten RT-Ansatz wurden in ein Perkin Elmer 2400 PCR-Gerät eingebracht und bei Temperaturen von 25 °C 10 min, 42 °C 60 min und 99 °C 5 min inkubiert. Nach Ablauf des Programms wurde die erhaltene cDNA-Lösung mit RNase-freiem H_2O auf 100 μl aufgefüllt und bei -70 °C eingefroren.

2.5.2.2 Realtime PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte mit Hilfe eines Kapillaren-Lightcyclers (Roche).

Primer und RT-PCR-Bedingungen

Primer	Sequenzen	T _m	Produkt (bp)
KGF for	5'-CCT GAG CGA CAC ACA AGA AG-3'	68 °C	166
KGF rev	5'-GCC ACT GTC CTG ATT TCC AT-3'	68 °C	166
GAPDH for	5'-CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC-3'	68 °C	471
GAPDH rev	5'-CCC ATC ACC ATC TTC CAG GAG C-3'	68 °C	471

PCR-Protokoll

Proben-Ansatz für die GAPDH-Bestimmung

Template	5 µl
FAST	2 µl
Primermix	2 µl
MgCl ₂	2,4 µl
H ₂ O	8,6 µl

H₂O-Kontrolle im LC

H ₂ O	5 µl
FAST	2 µl
Primermix	2 µl
MgCl ₂	2,4 µl
H ₂ O	8,6 µl

Anschließend wurde der mRNA-Gehalt von KGF berechnet.

2.6 Drei-Dimensionale Kultur

MatriDerm wurde für die dreidimensionale Kultur als Zellträger verwendet. Zur Bestimmung der optimalen, initial einzusetzenden Zellzahl und der Qualität der verschiedenen MatriDermspalten wurden Fibroblasten, HaCaT-Zellen und primäre Keratinozyten auf unterschiedliche MatriDermspalten ausgesät. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aussaat wurden verschiedene Parameter wie Proliferation oder Migration untersucht.

2.6.1 Spalthauttransplantate auf MatriDerm mit oder ohne Fibroblasten-Besiedelung

Spalthaut ist ungefähr 0,2 bis 0,3 mm dick und besteht aus der Epidermis und einem kleinen Anteil der Dermis. Die Spalthaut wurde in 2 mm breite Proben geschnitten. Diese wurde auf das mit Fibroblasten besiedelte oder unbesiedelte MatriDerm aufgetragen. Mit Fibroblasten

besiedelte MatriDerm wurde jeweils 5 Tage zuvor mit Zelldichte von $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ in einem Mischungsmedium von SFM und DMEM in Verhältnis 2:1 + 10% FCS ausgesät. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt und das Gewebe zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Die Spalthauttransplantate sind in Abbildung 6 dargestellt.

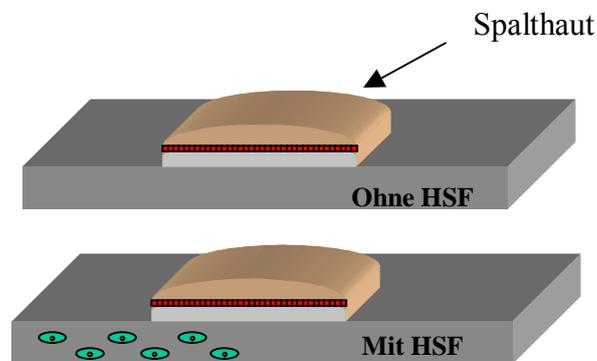


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Organokultur von Spalthaut auf mit oder ohne HSF-besiedelter MatriDerm.

2.6.2 Besiedelungsdynamik von HSF, HaCaT-Zellen und Keratinozyten auf MatriDerm

Die unterschiedliche Porengröße von MatriDerm beeinflusst die Migration und Proliferation der Fibroblasten, HaCaT-Zellen und Keratinozyten. Um einen optimalen Spalt von MatriDerm für die optimalen 3D-Kokulturbedingungen zu finden, wurden die MatriDerm Spalte 1-9 separat mit Fibroblasten, HaCaT-Zellen und primären Keratinozyten untersucht.

2.6.3 Bestimmung der Proliferation von Fibroblasten in MatriDerm mittels BrdU-Färbung

Um die Proliferation der Fibroblasten in MatriDerm nachzuweisen, wurde die BrdU-Färbung (In situ Cell Proliferation Kit, Fluos, Roche) angewendet, mit der proliferierende Fibroblasten in MatriDerm erkannt werden. Dazu wurden die Fibroblasten auf MatriDerm in DMEM + 10% FCS an verschiedenen Tagen nach Aussaat für 24 Stunden mit BrdU ($10\mu\text{M}$) inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe nach verschiedenen Zeiten in 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Färbung von Gewebeschnitten für BrdU wurde mit dem *in situ* Cell Proliferation-Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte zur Gegenfärbung der Kerne mit DAPI gefärbt und in Mowiol eingebettet.

2.6.4 Besiedlungsdynamik von HaCaT-Zellen und primären Keratinozyten auf/in MatriDerm mit oder ohne Fibroblastenvorbesiedlung

Um die Besiedlungsdynamik von HaCaT-Zellen und primären Keratinozyten auf/in MatriDerm mit oder ohne Fibroblastenbesiedlung zu untersuchen, wurden die HaCaT-Zellen oder primäre Keratinozyten auf MatriDerm in Filtereinsätzen bei Luftkontakt inkubiert. Unter solchen dreidimensionalen Kulturbedingungen können die primären Keratinozyten ein neues Epithel bilden. Diese neue Epithelien exprimieren spezifische Differenzierungsmarkern exprimiert. Damit können Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen untersucht werden. Das Kultursystem ist in Abbildung 7 dargestellt

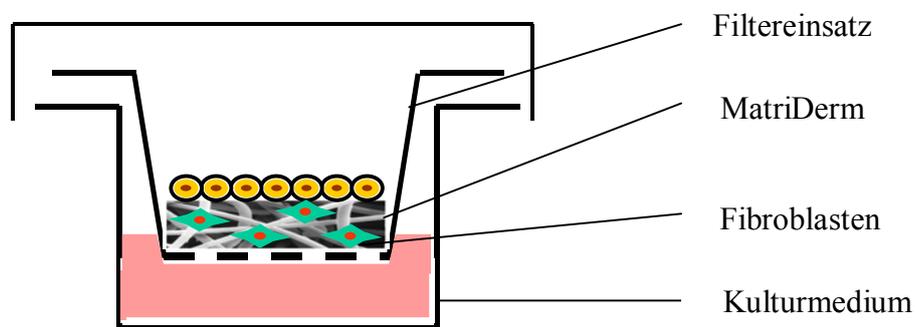


Abbildung 7: schematische Darstellung der organotypischen Kultur

2.7 Immunhistochemie

Durch die Immunohistochemie unter Verwendung spezifischer Antikörper können die Expression spezifischer Antigene dargestellt werden. Die primären Antikörper werden direkt an das passende Antigen gebunden. Die mit verschiedenen Fluorochromen gekoppelten sekundären Antikörper erkennen die primären Antikörper, wodurch die nachzuweisenden Antigene unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können.

Folgende Antigene wurden mit den primären und sekundären Antikörpern in dieser Arbeit nachgewiesen:

Primäre Antikörper

Antigen	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
Cytokeratin	Kanichen	1 :500	Dako
Involucrin	Maus	1:200	Dianova
Kollagen IV	Maus	1 :25	Dako
K 16	Maus	1:200	Dianova
Laminin 1+2	Kaninchen	1 :1000	Biozol
Laminin 5	Maus	1 :25	Dako
Vimentin	Maus	1 :100	Dako

Sekundäre Antikörper

Spezifität	Fluorochrom	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen	Cy3	1:400	Jacksonimmuno
Kaninchen	FITC	1:20	Dako
Maus	Cy3	1:400	Jacksonimmuno
Maus	FITC	1:20	Dako

2.7.1 Herstellung von Paraffinschnitten

MatriDermpräparate wurden für 24 Stunden in 4%iger Paraformaldehyd fixiert, dann in Paraffin eingebettet. Die eingebetteten Proben wurden an einem Mikrotom (2065, Leica) mit 8 µm dicken Schnitten angefertigt und auf Objektträger (Superfrost, R. Langenbrinck) aufgezogen, danach wurden die Paraffinschnitte über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Paraffinschnitte für jeweils 2 Minuten in 4 verschiedenen Xylol-Gefäßen entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe bzw. 100%, 100%, 96%, 96%, 70% rehydriert. Danach wurden die Schnitte 2 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Dann wurden sie in 4% Paraformaldehyd für 20 min eingelegt und 3-mal für 5 min in TBS-Tween-Puffer (pH 7,5) gewaschen. Die Schnitte wurden weiter für die immunhistochemische Färbung vorbereitet.

2.7.2 Immunhistochemische Färbung

Um optimale Resultate für formalinfixierte Gewebe zu erhalten, waren verschiedene Vorbehandlungen erforderlich. Die Vorbehandlung entsprach dem Hinweis des Antikörpers. Für die Färbungen von Laminin-5, Vimentin und Collagen IV ist eine Vorbehandlung des Gewebes mit hitzeinduzierter Epitopdemaskierung erforderlich. Nach der Vorbehandlung der

verschiedenen Gewebeschnitte wurden die Objektträger wieder 3-mal für 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Eine 30-minütige Inkubation von Proben erfolgte in 10%igem Schweineserum. Es wurde jeweils 100 µl der verdünnten primären Antikörper in Tris-BSA-Lösung auf die Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Parallel hierzu wurde die Tris-BAS-Lösung ohne Antikörper als Negativkontrolle verwendet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 3-mal für 5 min in TBS-Tween-Puffer gespült und die verdünnten sekundären Antikörper jeweils 100 µl wurden auf die Objektträger pipettiert und für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben noch 3-mal für 5 min in TBS-Tween-Puffer gespült und mit Kaiser-Gelatine eingedeckt.

3 Ergebnisse

3.1 Proliferationsverhalten von Hautfibroblasten und Keratinozyten

Fibroblasten und Keratinozyten benötigen *in vitro* zum Erhalt reproduzierbarer Wachstumsbedingungen optimierte Mediumbedingungen. Es ist bekannt, dass für Fibroblasten und Keratinozyten jedoch deutliche Unterschiede in der Nährstoff- und Ionen-Zusammensetzung der optimalen Kulturmedien gegeben sind. Für die *in vitro* Propagierung von Fibroblasten wird im allgemeinen DMEM, dem 10 % FCS zugefügt verwendet. Aufgrund des hohen Ca^{2+} -Gehaltes und des Zusatzes von FCS ist dieses Medium für die Kultur von Keratinozyten der Haut nicht geeignet, da diese Zelle durch sofortige Ausdifferenzierung und Apoptoseinduktion keine *in vitro* Propagierung ermöglichen. Somit war es für die Erstellung von zellbesiedelten 3-dimensionalen Compositen aus MatriDerm, in denen die Fähigkeit von dermale Fibroblasten/Fibrozyten und epidermale Keratinozyten ein organotypisches Hautäquivalent zu bilden, analysiert werden sollte, zunächst erforderlich, Mediumbedingungen zu finden, die für beide Zellsysteme ein adäquates Wachstumsverhalten ermöglichen.

3.1.1 Proliferationsverhalten von Fibroblasten als Funktion der Mediumbedingung

Für die Bestimmung des Proliferationsverhaltens in unterschiedlichen Medien wurden Fibroblasten mit konstanter Zelldichte in 6-Well-Platten in DMEM + 10%, DMEM ohne Serumzusatz, SFM ohne Serumzusatz bzw. SFM/DMEM (2:1) ohne Serumzusatz ausgesät. Zu verschiedenen Zeiten nach Aussaat wurde die Zellzahl bestimmt und zur Erstellung der Proliferationskinetiken gegen die Kulturzeit aufgetragen (Abb. 8).

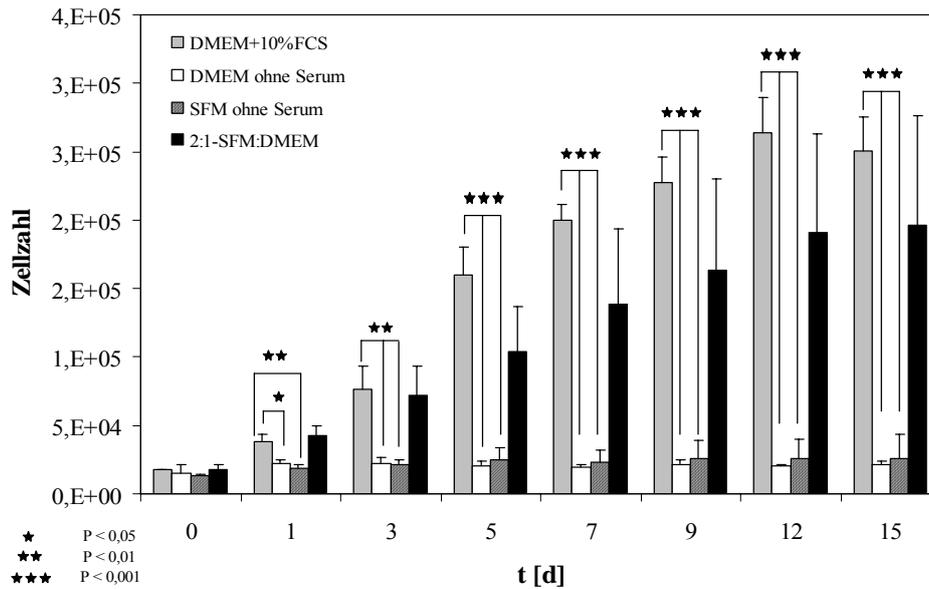


Abbildung 8: Proliferationsverhalten von Fibroblasten als Funktion der Mediumbedingung. Das Proliferationsverhalten wurde mit 3 Fibroblastenzellstämmen (HSF-X1, HSF-X4 und HSF-X5), die mit der gleichen Zellzahl (2×10^4 Zellen pro well) in unterschiedlichen Medien (DMEM + 10% FCS, DMEM ohne Serum, SFM ohne Serum und 2:1-SFM:DMEM ohne Serum) ausgesät wurden, bestimmt. Hierzu wurde die nach 8 h, bzw. 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 Tagen erreichte Zellzahl bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Parallelansätzen ($n=9$). Die Ergebnisse wurden mittels ANOVA auf statistische Signifikanz überprüft.

Wie aus Abbildung 8 zu ersehen ist, zeigen Fibroblasten in serumfreien DMEM und SFM-Medien kein Zellwachstum im untersuchten Zeitraum. Wie zu erwarten war, zeigen Fibroblasten in DMEM plus 10 % FCS über den Untersuchungszeitraum eine kontinuierliche und signifikante Zunahme der Zellzahl, z.B. im direkten Vergleich mit serumfreiem DMEM ($p < 0.05$ für Tag 1; $p < 0.01$ für Tag 3; $p < 0.001$ ab Tag 5) bzw. SFM ($p < 0.01$ für Tag 1; $p < 0.001$ ab Tag 5). Primär und vor dem Hintergrund der fehlenden Proliferation in serumfreiem DMEM bzw. SFM war nicht zu erwarten, dass Fibroblasten in einer serumfreien 2:1 Mischung aus SFM und DMEM nahezu genauso gut proliferieren wie in DMEM plus 10% FCS. In DMEM plus 10 % FCS erreichten die Testfibroblastenstämmen durchschnittlich das 14-fach der Ausgangszellzahl und in der 2:1 Mischung von SFM:DMEM ca. das 11-fache. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

3.1.2 Koloniebildung von Hautfibroblasten als Funktion der Mediumbedingung

Um die Koloniebildungsfähigkeit von Hautfibroblasten in verschiedenen Medien zu untersuchen, wurden Koloniebildungstests durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1000 Zellen pro Well in eine 10 cm Schale in unterschiedlichen Medien ausgesät. Nach 12-tägigem

Wachstum wurde die Koloniebildung ausgewertet. Die unter den verschiedenen Medien erzielte Koloniebildungsfähigkeit wurde als Plating Efficiency gegenüber der Mediumbedingung aufgetragen. (Abb. 9).

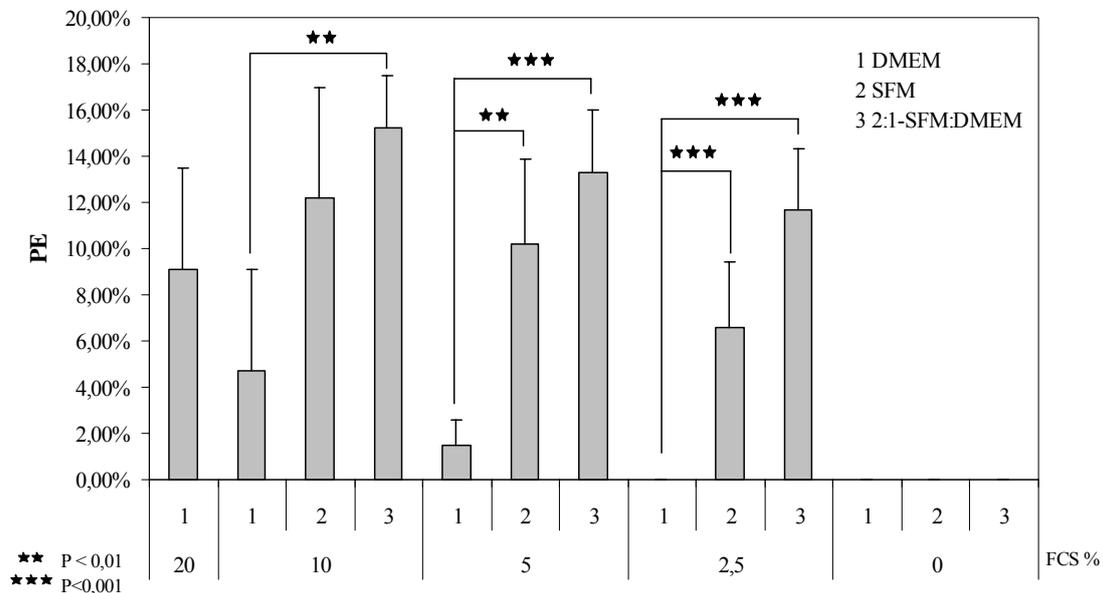


Abbildung 9: Koloniebildungsfähigkeit von Fibroblasten als Funktion der Mediumbedingung. Die Koloniebildungsfähigkeit von Einzelzellen der drei Fibroblastenzellstämme HSF-X1, HSF-X4 und HSF-X7 wurde in den Medien DMEM, SFM und 2:1-SFM:DMEM, denen unterschiedliche Serumanteile zugesetzt waren (0, 2.5, 5 oder 10 %; für DMEM wurden als Standardkontrolle auch ein 20 %-iger Serumzusatz gewählt), über einen Inkubationszeitraum von 12 Tagen getestet. Zur reproduzierbaren Plattierung von Einzelzellen wurden Zelldichten von 1×10^3 Zellen pro 10 cm Kulturschale ausgesät. 12 Tage nach Aussaat der Zellen wurden die Kulturen fixiert und gefärbt, um die Anzahl der aus Einzelzellen gebildeten Kolonien mit mehr als 50 Zellen zu bestimmen. Anhand dieser Koloniezahl wurde Plating Efficiency (PE) nach dem Standardverfahren im Verhältnis zur Ausgangszellzahl berechnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD basierend auf $n=24$. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für die verschiedenen Medien für die Serumzusätze 10, 5 und 2.5 % mittels ANOVA berechnet. In den serumfreien Medien zeigte sich keine Koloniebildung.

Wie aus Abbildung 9 zu ersehen ist, ist die Koloniebildungsfähigkeit von Fibroblasten in DMEM mit 10%-igem Serumanteil gegenüber SFM mit gleicher Serumkonzentration reduziert (PE ca. 6 % vs. ca. 13%); dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu steigerte das 2:1-SFM:DMEM Medium plus 10 % FCS signifikant ($p < 0.01$) die Plating Efficiency auf ca. 17 %. Bei Reduktion der Serumanteile auf 5 % bzw. 2.5 % war die Plating Efficiency in SFM bzw. 2:1-SFM:DMEM gegenüber DMEM hochsignifikant ($p < 0.001$) verbessert. Obwohl die PE in 2:1-SFM:DMEM gegenüber SFM Medium unter allen Serumanteile verbessert war, zeigten sich im statistischen Vergleich keine signifikanten Unterschiede. Auffallend war hierbei, dass sowohl in SFM als auch in 2:1-SFM:DMEM Medium plus 10 % FCS die PE-Werte – wenn auch nicht signifikant – immer

über den PE Werten des für Fibroblastenkulturen international als Standardklonierungs-Medium eingesetzten DMEM plus 20 % FCS lagen.

3.1.3 Proliferationsverhalten von Keratinozyten

Da, wie oben erwähnt Keratinozyten andere Mediuferfordernisse aufweisen als Fibroblasten, diese Zellen jedoch für die Herstellung von zellbesiedelten Compositen in Kokultur mit Fibroblasten gebracht werden sollten, wurde zunächst das Proliferationsverhalten von Keratinozyten in auch für Fibroblasten verträglichen Medien überprüft werden. In den nachfolgenden dargestellten Experimenten wurde einerseits für die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT und andererseits für primäre humane Hautkeratinozyten der Einfluss unterschiedlicher Mediuumbedingungen auf das Proliferationsverhalten untersucht. Hierzu wurden als unterschiedliche Medien DMEM + 10% FCS bzw. 2:1-SFM:DMEM mit oder ohne 10% FCS getestet.

3.1.3.1 Proliferation von HaCaT-Zellen in unterschiedlichen Medien

Für die Bestimmung des Proliferationsverhaltens in unterschiedlichen Medien wurden HaCaT-Zellen mit konstanter Zelldichte in 6-Well-Platten in DMEM + 10% FCS und SFM/DMEM (2:1) + 10% FCS ausgesät. Zu verschiedenen Zeiten nach Aussaat wurde die Zellzahl bestimmt und zur Erstellung der Proliferationskinetiken gegen die Kulturzeit aufgetragen (Abb. 10).

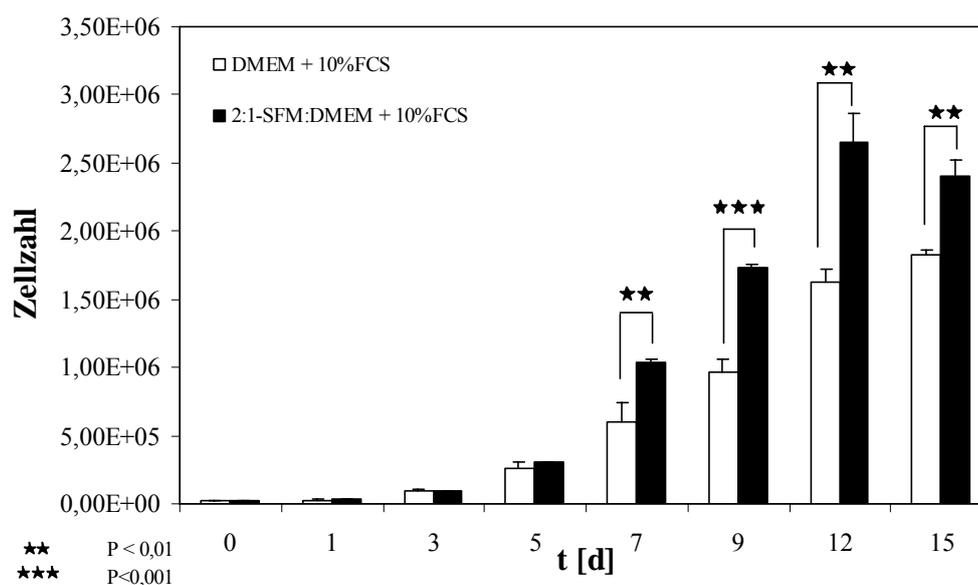


Abbildung 10: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen als Funktion der Mediuumbedingung. Das Proliferationsverhalten wurde mit HaCaT-Zellen, die mit einer konstanten Zellzahl (2×10^4 Zellen

pro well) in unterschiedlichen Medien (DMEM + 10% FCS und 2:1-SFM:DMEM + 10% FCS) ausgesät wurden, bestimmt. Hierzu wurde die nach 8 h, bzw. 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 Tagen erreichte Zellzahl ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Parallelansätzen ($n=9$). Die Ergebnisse wurden mittels ANOVA auf statistische Signifikanz überprüft.

Wie aus Abbildung 10 zu ersehen ist, zeigen HaCaT-Zellen in einer 2:1 Mischung aus SFM:DMEM plus 10% FCS im direkten Vergleich mit DMEM plus 10 % FCS über den Untersuchungszeitraum ab Tag 5-7 eine kontinuierliche und signifikante Zunahme der Zellzahl.

3.1.3.2 Proliferation von primären Keratinozyten in unterschiedlichen Medien

Für die Bestimmung des Proliferationsverhaltens in unterschiedlichen Medien wurden humane primäre Keratinozyten mit konstanter Zelldichte in 6-Well-Platten in SFM und SFM/DMEM (2:1) ausgesät. Zu verschiedenen Zeiten nach Aussaat wurde die Zellzahl bestimmt und zur Erstellung der Proliferationskinetiken gegen die Kulturzeit aufgetragen (Abb. 11).

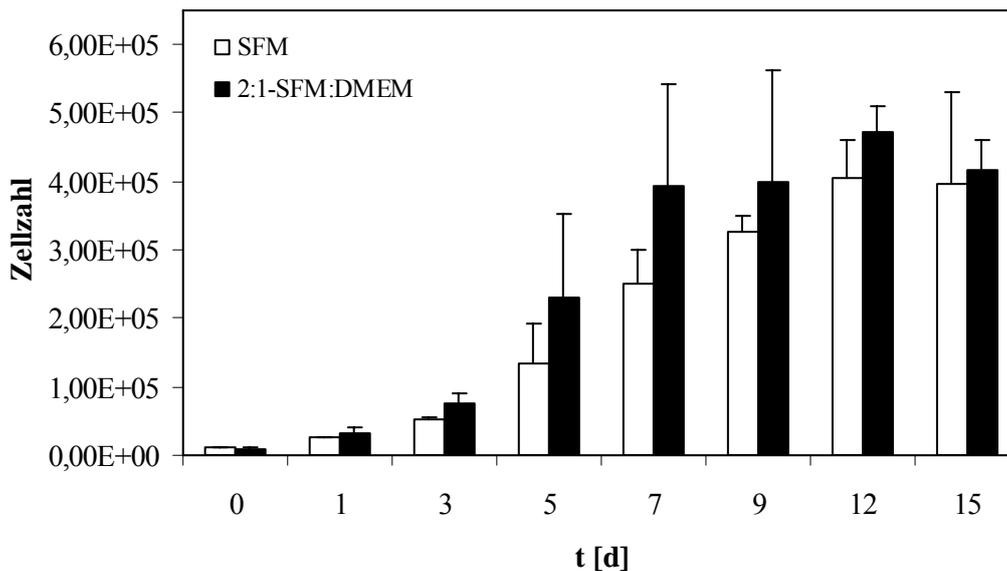


Abbildung 11: Proliferationsverhalten von humanen primären Keratinozyten als Funktion der Mediumbedingung. Das Proliferationsverhalten wurde mit 3 Keratinozytenzellstämmen (HK-3, HK-5 und HK9), die mit der gleichen Zellzahl (2×10^4 Zellen pro well) in unterschiedlichen Medien (SFM und 2:1-SFM:DMEM) ausgesät wurden, bestimmt. Hierzu wurde die nach 8 h, bzw. 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 Tagen erreichte Zellzahl bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Parallelansätzen ($n=9$). Die Ergebnisse wurden mittels ANOVA auf statistische Signifikanz überprüft.

Wie aus Abbildung 11 zu ersehen ist, zeigen Keratinozyten unter beiden Mediumbedingungen über den Untersuchungszeitraum eine kontinuierliche Zunahme der Zellzahl. In 2:1-

SFM:DMEM wurde das ca. 23-fach und in SFM ca. das 20-fache der Ausgangszellzahl erreicht. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

3.2 Proliferation in Kokultur-System

Um den gegenseitigen Einfluss der Kokulturpartner auf das Proliferationsverhalten des jeweiligen anderen Kokulturpartners zu analysieren, wurden zum einen Progenitorfibroblasten entweder mit Keratinozyten oder HaCaT-Zellen bzw. HaCaT und primäre Keratinozyten mit den verschiedenen Differenzierungstypen von Progenitorfibroblasten und Funktionsfibrozyten kokultiviert.

3.2.1 Proliferation von Progenitorfibroblasten in Kokultur mit HaCaT-Zellen

Für die Untersuchung des Proliferationsverhalten der mit HaCaT kokultivierten Progenitorfibroblasten wurden die Fibroblasten in DMEM + 10% FCS ausgesät. Dann wurden die mit HaCaT-Zellen konfluent besiedelten Inserts in die 6-Well-Platten eingelegt. An unterschiedlichen Tagen wurde die Zellzahl der Progenitorfibroblastenpopulationen bestimmt.

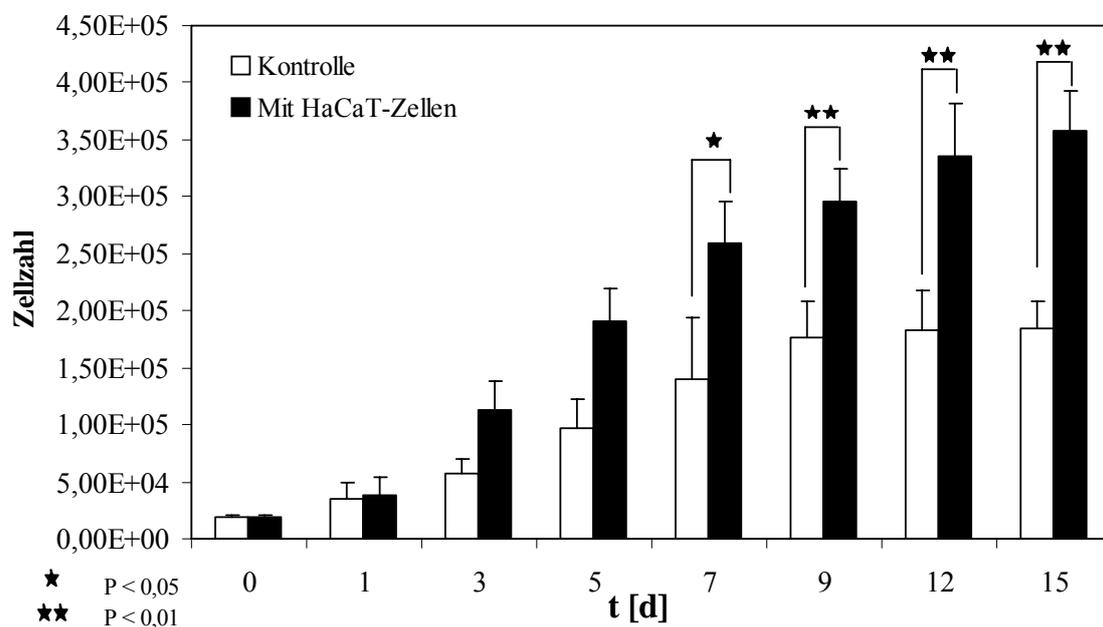


Abbildung 12: Proliferationsverhalten von humanen Progenitorfibroblasten (HSF-X1, HSF-X3 und HSF-X8; Mittelwerte der Zellzahl und Standardabweichung des Mittelwerts) ohne oder mit HaCaT-Zellen in Kokultur nach 8h, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 Tagen in DMEM + 10% FCS; Fibroblasten wachsen in Abhängigkeit von der Zeit; Die Signifikanz (Anova, n=9) wurde zwischen Kontrolle (ohne HaCaT-Zellen) und Probe mit HaCaT-Zellen dargestellt. Signifikantes Proliferationsverhalten nach 7 Tagen zwischen Kontrolle und Probe mit HaCaT-Zellen ($P < 0,05$), Hoch signifikant nach 9 sowie 12 Tagen ($P < 0,01$).

Die daraus resultierende Proliferationskinetik ist in Abbildung 12 dargestellt. Progenitorfibroblasten zeigen sowohl ohne als auch mit kokultivierten HaCaT-Zellen in DMEM + 10% FCS einen kontinuierlichen Zellzuwachs über die Zeit. Jedoch zeigen Progenitorfibroblasten, die mit HaCaT-Zellen kokultiviert wurden im Vergleich zu Progenitorfibroblasten ohne HaCaT-Kokultupartner ab Tag 7 ein signifikant schnelleres Wachstum mit einer nahezu verdoppelten Wachstumsrate.

3.2.2 Proliferation von HaCaT-Zellen in Kokultur mit unterschiedlichen Differenzierungstypen von humanen Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten

Um die Einflussnahme von Progenitorfibroblasten (MF) bzw. von Funktionsfibrozyten (PMF) auf das Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen zu untersuchen, wurden die HaCaT-Zellen in DMEM + 10% FCS ausgesät und danach die mit MF-Kulturen bzw. PMF-Kulturen oder MF:PMF-Kulturen (Mischungsverhältnis 2:1) konfluent besiedelten Inserts in die 6-Well-Platte eingelegt. Das Proliferationsverhalten der HaCaT-Zellen wurde über 15 Tage durch Zellzahlbestimmung zu den jeweiligen Stichtagen ermittelt. Das daraus resultierende Proliferationsverhalten ist in Abbildung 13 dargestellt.

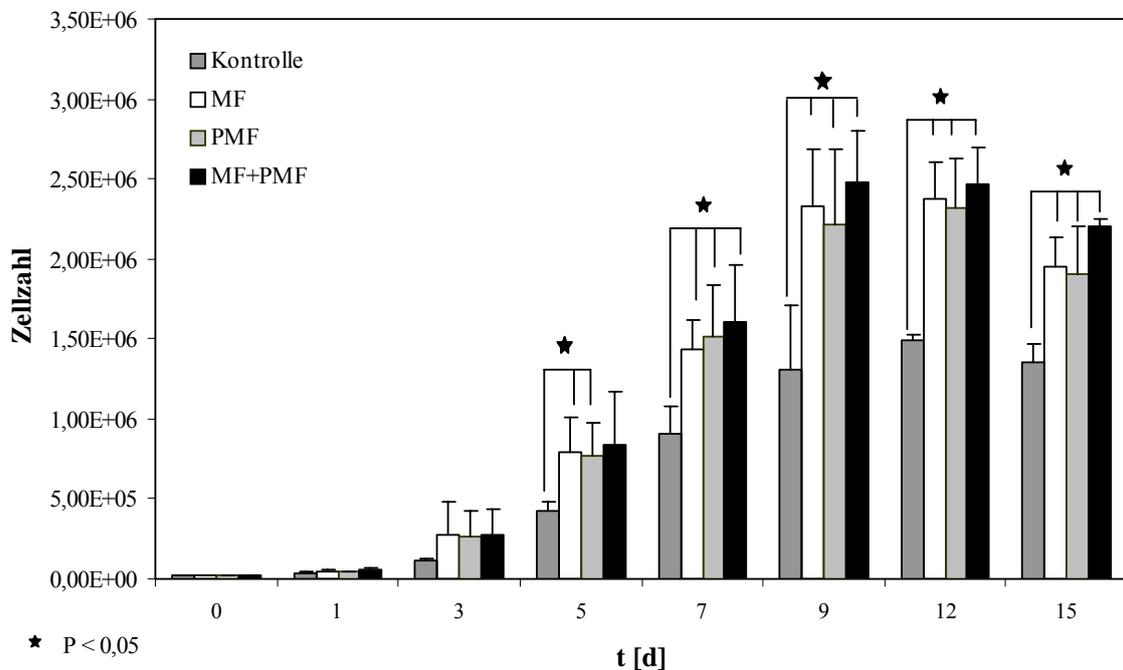


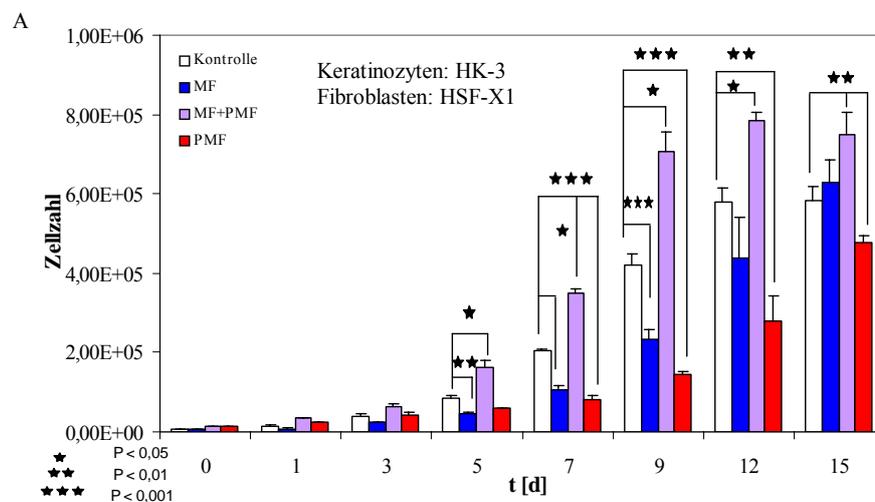
Abbildung 13: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen in Kokultur mit verschiedenen Fibroblastenpopulation von reinen Progenitorfibroblasten, reinen postmitotischen Fibrozyten und 2:1 Mischung aus MF und PMF-Zellen (HSF-X1, HSF-X3 und HSF-X4; Mittelwerte der Zellzahl und Standardabweichung des Mittelwerts) in Kokultur nach 8h, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 Tagen in DMEM + 10% FCS; HaCaT-Zellen wachsen in Abhängigkeit von der Zeit; Die Signifikanz (Anova, n=9) wurde zwischen Kontrolle und Fibroblastenpopulation dargestellt. Signifikantes

Proliferationsverhalten nach 5 Tagen zwischen Kontrolle und MF und PMF ($P < 0,05$), nach 7 Tagen zwischen Kontrolle und MF, PMF und 2:1 Mischung von MF und PMF ($P < 0,05$).

Die HaCaT-Zellen wachsen in DMEM + 10% FCS zeigen ohne oder mit verschiedenen kokultivierten Fibroblastenpopulationen in Abhängigkeit von der Zeit ein kontinuierliches Wachstum. Ab Tag 5 bzw. ab Tag 7 ist die Proliferation der HaCaT-Zellen, die in Kokultur mit MF-Progenitorfibroblasten, PMF-Funktionsfibrozyten bzw. einer 2:1 Mischung aus MF und PMF kultiviert wurden signifikant gegenüber der HaCaT-Monokultur verbessert. Signifikante differentielle Unterschiede als Funktion des jeweiligen Kokulturpartners ergaben sich hierbei jedoch nicht.

3.2.3 Proliferation von humanen Keratinozyten in Kokultur mit Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten

Um das Proliferationsverhalten von mit Progenitorfibroblasten (MF) oder Funktionsfibrozyten (PMF) bzw. einer Fibroblasten-Fibrozytenpopulation mit einem 2:1 Mischungsverhältnis von MF:PMF kokultivierten Keratinozyten zu bestimmen, wurden die Keratinozyten in SFM-Keratinozyten-Medium ohne Serumzusatz ausgesät und danach mit den verschiedenen auf MF, PMF bzw. 2:1-MF:PMF Kulturen der Zellstämme HSF-X1, HSF-X5 und HSF-X7 mittels Inserttechnik kokultiviert. In Abhängigkeit von dem Kokulturpartner wurde das Wachstumsverhalten der primären Keratinozyten über einen Zeitraum von 15 Tagen ermittelt (Abb. 14 A, B, C)



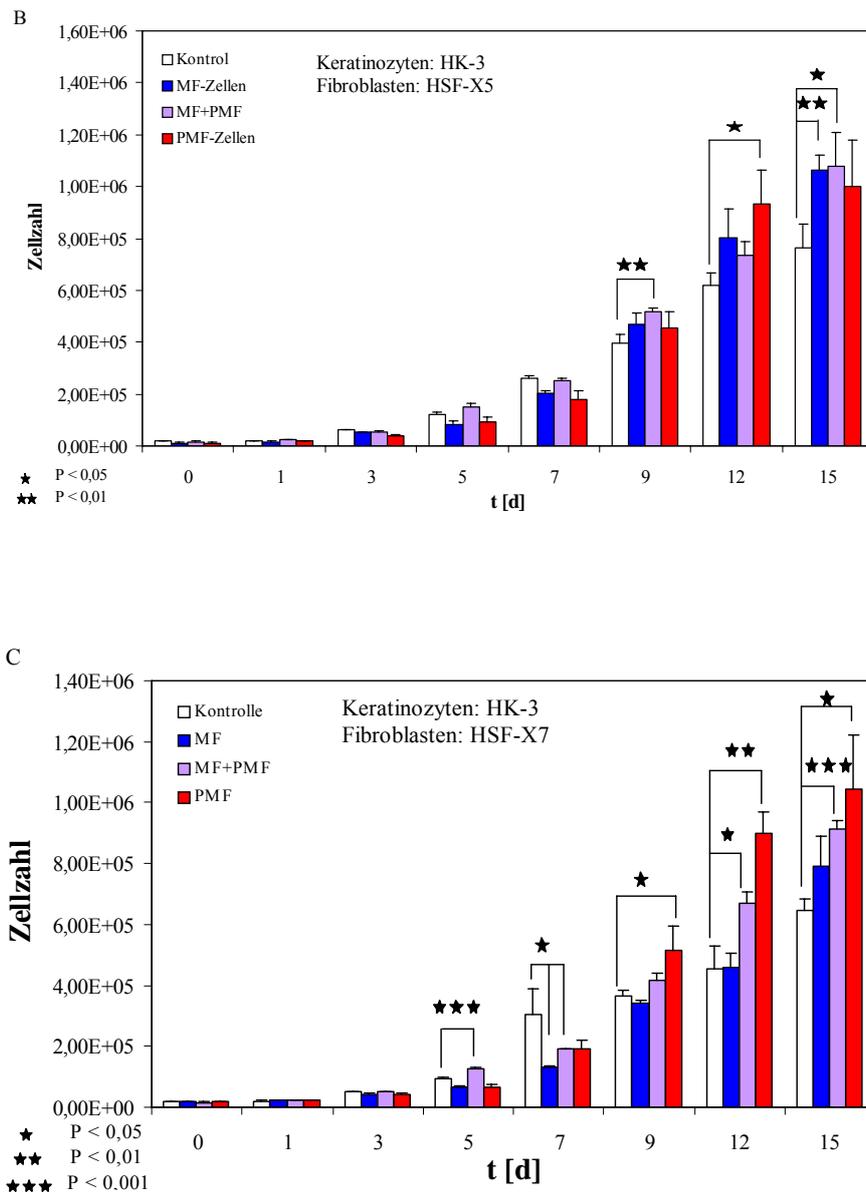


Abbildung 14: Proliferationsverhalten von humanen Keratinozyten in Kokultur mit verschiedenen Fibroblastenpopulation von reinen Progenitorfibroblasten, reinen postmitotischen Fibrozyten und 2:1 Mischung aus MF und PMF-Zellen (HSF-X1, HSF-X5 und HSF-X7, Mittelwerte der Zellzahl und Standardabweichung der Mittelwert) in Kokultur nach 8h, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 Tagen in SFM-Keratinozyten-Medium ohne Serumzusatz. (A) Proliferationsverhalten von Keratinozyten in Kokultur mit HSF-X1. Keratinozyten wachsen in Abhängigkeit von der Zeit; Die Signifikanz (Anova, n=3) wurde zwischen Kontrolle und Fibroblastenpopulation dargestellt. (B) Proliferationsverhalten von Keratinozyten in Kokultur mit HSF-X5. Keratinozyten wachsen in Abhängigkeit von der Zeit; Die Signifikanz (Anova, n=3) wurde zwischen Kontrolle und Fibroblastenpopulation dargestellt. (C) Proliferationsverhalten von Keratinozyten in Kokultur mit HSF-X7. Keratinozyten wachsen in Abhängigkeit von der Zeit; Die Signifikanz (Anova, n=3) wurde zwischen Kontrolle und Fibroblastenpopulation dargestellt.

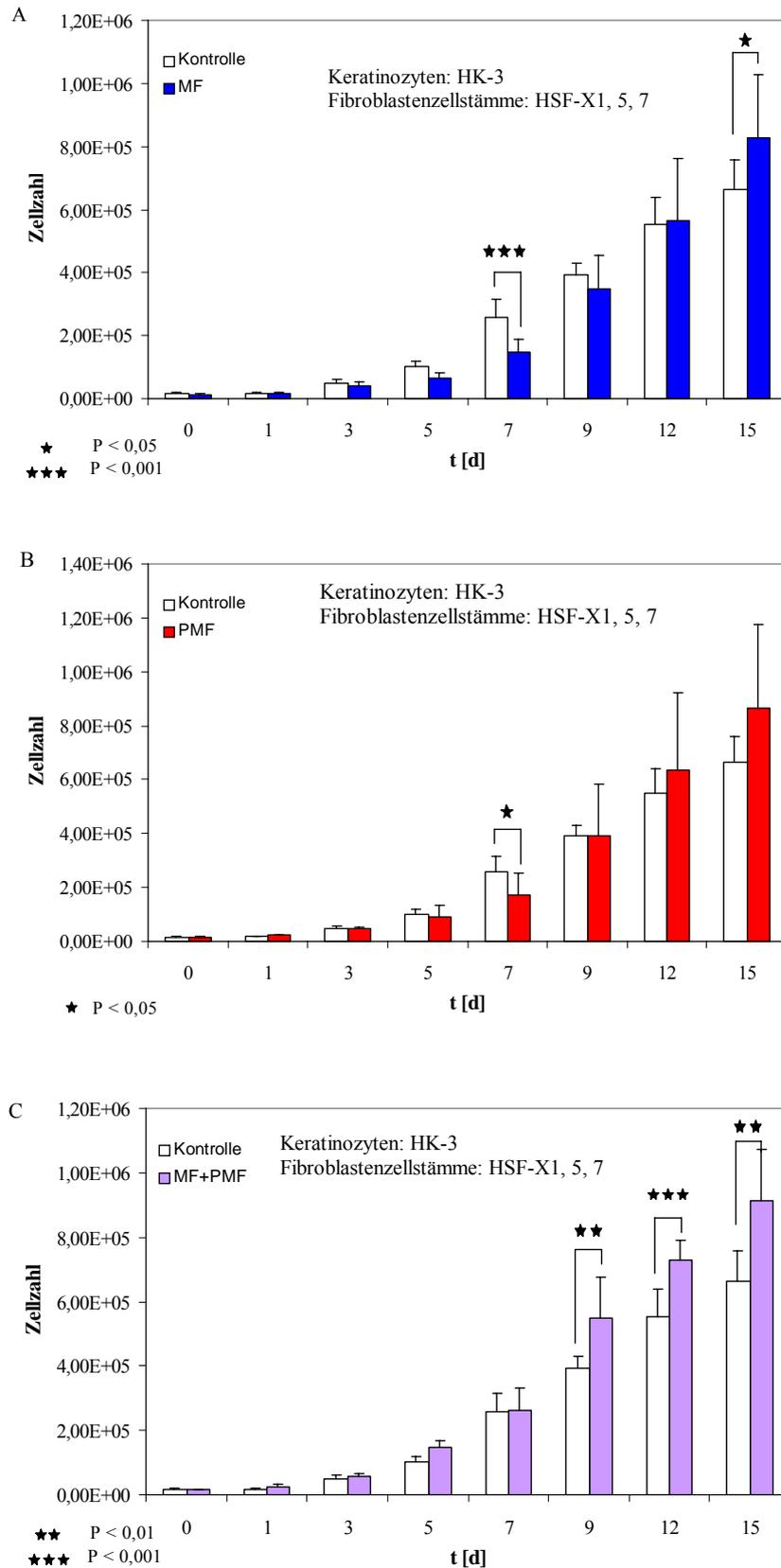


Abbildung 15: Zusammenfassung des Proliferationsverhaltens von primären Keratinocyten als Funktion der Kokultur mit MF-Progenitorfibroblasten bzw. PMF-Funktionsfibrozyten. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die zusammengefassten Daten aller drei verwendeten

Fibroblastenzellstämme (HSF-X1, 5, 7). Mittels ANOVA wurde die Ergebnisse auf statistische Signifikanz überprüft. (A) Keratinozytenproliferation als Funktion der Kokultur mit MF-Progenitorfibroblasten. (B) Keratinozytenproliferation als Funktion der Kokultur mit PMF-Funktionsfibrozyten. (C) Keratinozytenproliferation als Funktion der Kokultur mit einer 2:1 Mischung aus MF:PMF.

Wie aus den Abbildung 14 A-C zu ersehen ist, ist das Proliferationsverhalten der primären Keratinozyten in Abhängigkeit von den drei verschiedenen Fibroblastenzellstämmen, die als unterschiedlich differenzierte Kokulturpartner mit den Keratinozyten wechselwirken konnten, differentiell unterschiedlich stimuliert. Für alle drei Fibroblastenzellstämme konnte unabhängig von dem eingesetzten Differenzierungstyp eine signifikante Steigerung der Keratinozytenproliferation beobachtet werden. Bei dem Fibroblastenzellstamm HSF-X1 zeigten sich durch die Kokultur mit reinen MF-Population keine Steigerung der Keratinozytenproliferation (bis Tag 12 eher eine geringe aber nicht signifikante Hemmung), während eine 2:1 Mischpopulation aus MF:PMF von Tag 5 bis zumindest Tag 9 den Keratinozyten einen signifikanten Proliferationsstimulus vermittelt. Die Kokultur mit einer reinen PMF-Population führte dagegen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Keratinozytenproliferation.

Wurde der Fibroblastenzellstamm HSF-X5 als Kokulturpartner verwendet, konnten mit Ausnahme für Tag 12 keine signifikanten Veränderungen der Keratinozytenproliferation beobachtet werden. Am Tag 12 war die Proliferation der Keratinozyten, die mit reinen PMF-Populationen kokultiviert wurden signifikant gegenüber den als Monokultur bzw. mit anderen Kokulturpartner-Zusammensetzungen getesteten Keratinozyten gesteigert.

Mit dem Fibroblastenzellstamm HSF-X7 führte ab Tag 9 die Kokultur mit reinen PMF-Populationen zu einer hochsignifikant gesteigerten Keratinozytenproliferation, während die 2:1 Mischpopulation von MF:PMF erst ab Tag 12 zu einer signifikant gesteigerten Proliferation der Keratinozyten im Vergleich zur Monokultur führte. Wie auch bei dem Fibroblastenzellstamm HSF-X1 führte hier die Kokultur mit MF-Populationen zu keiner signifikanten Veränderung der Keratinozytenproliferation.

Werden diese Einzelergebnisse für die drei verschiedenen Fibroblastenzellstämme zusammengefasst und vergleicht man hierbei spezifisch das Proliferationsverhalten der Keratinozyten-Monokultur mit dem der in Kokultur mit MF- oder 2:1-MF:PMF inkubierten Keratinozyten, ist zu erkennen, dass beide Kokulturpartner (2:1-MF:PMF ab Tag 12; MF an Tag 15) signifikant die Keratinozytenproliferation mit fortschreitender Kulturdauer stimulieren. Ein signifikanter differentieller Unterschied zwischen den durch MF- oder 2:1-

MF:PMF-Populationen induzierten Steigerungsraten ist aber nicht gegeben, obwohl eine Tendenz zu einer weiter verbesserten Keratinozytenproliferation bei 2:1-MF-PMF-Populationen zu erkennen ist.

3.3 KGF-Expression von Progenitorfibroblasten und terminal differenzierten Funktionsfibrozyten

Die vorhergehenden Experimente zeigten deutlich, dass die mit Fibroblasten kokultivierten HaCaT-Zellen oder primären Keratinozyten ein schnelles Wachstum zeigen als in Monokultur gehaltenen Keratinozyten. Das von den Fibroblasten gebildete KGF ist ein wichtiger und entscheidender Faktor für die Proliferation von Keratinozyten. Um Aussagen treffen zu können, ob zwischen Progenitorfibroblasten und terminal differenzierten Fibrozyten quantitative Unterschiede in der KGF-Expression bestehen, wurde die KGF-Expression dieser Fibroblasten-/Fibrozytentypen mittels Realtime PCR bzw. ELISA-Technik bestimmt.

Die mRNA-Expression von KGF in Progenitorfibroblasten und terminal differenzierten Funktionsfibrozyten-Populationen wurde für insgesamt fünf unterschiedliche humane Hautfibroblasten-Zellstämme wurde mittels Realtime PCR bzw. ELISA-Technik gemessen.

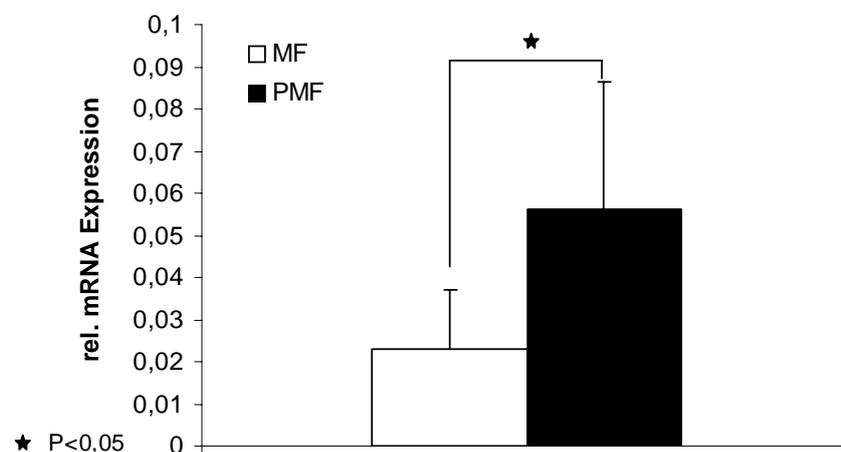


Abbildung 16: KGF-mRNA-Expression in den Progenitorfibroblasten und terminal postmitotisch differenzierten Fibrozyten (Mittelwerte aus HSF-X1, 2, 3, 4, 5 und 7, Standardabweichung des Mittelwerts, n=6) mittels Realtime PCR; Es ließen sich signifikanten Unterschiede zwischen MF und PMF-Zellen feststellen ($P < 0,05$).

Wie aus Abb. 15 zu ersehen ist, zeigen terminal differenzierte PMF-Fibrozyten im Vergleich mit MF-Progenitorfibroblasten eine signifikant um den Faktor 2.5 erhöhte mRNA-Expression für KGF.

Auf der Ebene der KGF-Peptidexpression wurden MF-Progenitorfibroblasten und terminal differenzierte Fibrozyten unter verschiedenen Kulturbedingungen (MF: konfluente vs. log-Phase-Kultur, plus/minus 10 % FCS; PMF: plus/minus 10 % FCS) analysiert. Dazu wurden die Progenitorfibroblasten semikonfluent oder konfluent, die postmitotischen Fibrozyten konfluent ausgesät. Nach einem Tag wurde eine Hälfte der ausgesäten Zellen serumfrei gesetzt, die andere Hälfte weiterhin mit 10 % Serum kultiviert und nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden das Medium für den ELISA entnommen. Die Ergebnisse des ELISA sind in Abbildung 16 dargestellt.

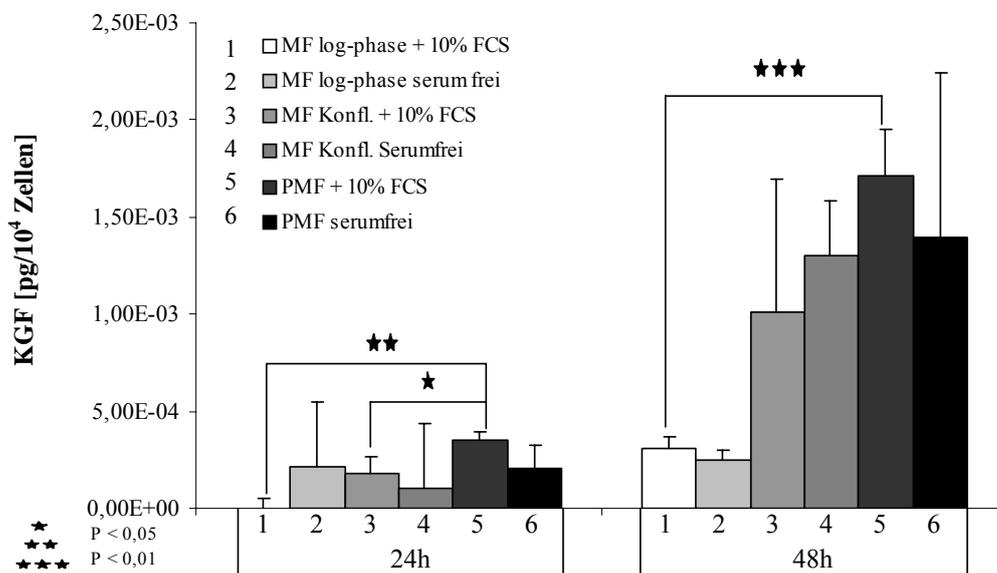


Abbildung 17: KGF-Produktion in den Progenitorfibroblasten (MF) und terminal postmitotisch differenzierten Fibrozyten (PMF) (Mittelwerte aus HSF-X2, HSF-X3 und HSF-X4, Standardabweichung des Mittelwerts, n=3). Die Analyse der KGF-Produktion pro Zelle erfolgte mittels ELISA-Bestimmung im Medium-Überstand 24 und 48 Stunden nach Mediumzugabe. Es ließen sich signifikanten Unterschiede nach 24 Stunden zwischen MF (log-phase und Konfluenz) und PMF-Zellen in DMEM + 10% FCS feststellen, sowie hoch signifikanten Unterschiede nach 48 Stunden zwischen MF (log-phase) und PMF-Zellen in DMEM + 10% FCS. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede nach 24 oder 48 Stunden zwischen MF (log-phase und Konfluenz) und PMF-Zellen in DMEM.

Abb. 16 lässt erkennen, dass proliferierenden und konfluenten MF-Progenitorfibroblasten sowohl unter serumhaltigen als auch serumfreien Bedingungen nur sehr wenig KGF produzieren (bis zu 3 pg/ 10⁴ Zellen). Dagegen ist die KGF-Produktion terminal differenzierter Fibrozyten sowohl unter serumfreien wie auch serumhaltigen Testbedingungen um ca. den Faktor 5 gesteigert (bis zu 17 pg/10⁴ Zellen).

3.4 MatriDerm

3.4.1 Zellverteilung und Adhäsion auf MatriDerm sowie Zellmigration und – Proliferation auf MatriDerm

3.4.1.1 Zellverteilung von Progenitor-Fibroblasten auf bzw. in den MatriDerm-Spalt 1 bis 9

Die Adhäsion und Verteilung von Progenitor-Fibroblasten (MF) auf der Oberfläche des MatriDerms von Spalt 1 bis Spalt 9 wurde mit verschiedenen Hautfibroblastenzellstämmen analysiert. Repräsentativ sind im Folgende die Ergebnisse für den Fibroblasten-Zellstamm HSF-X1 dargestellt. Die Progenitor-Fibroblasten wurden mit einer Zelldichte $2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ auf die verschiedenen MatriDerm-Spalte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die DAPI-Färbung und fluoreszenzmikroskopische Auswertung. Abb. 18 zeigt die Verteilung der Progenitor-Fibroblasten. Es ist zu erkennen, dass alle 9 MatriDerm-Spalte gleichermaßen als Substrat für die Adhäsion von Progenitor-Fibroblasten fungieren können.

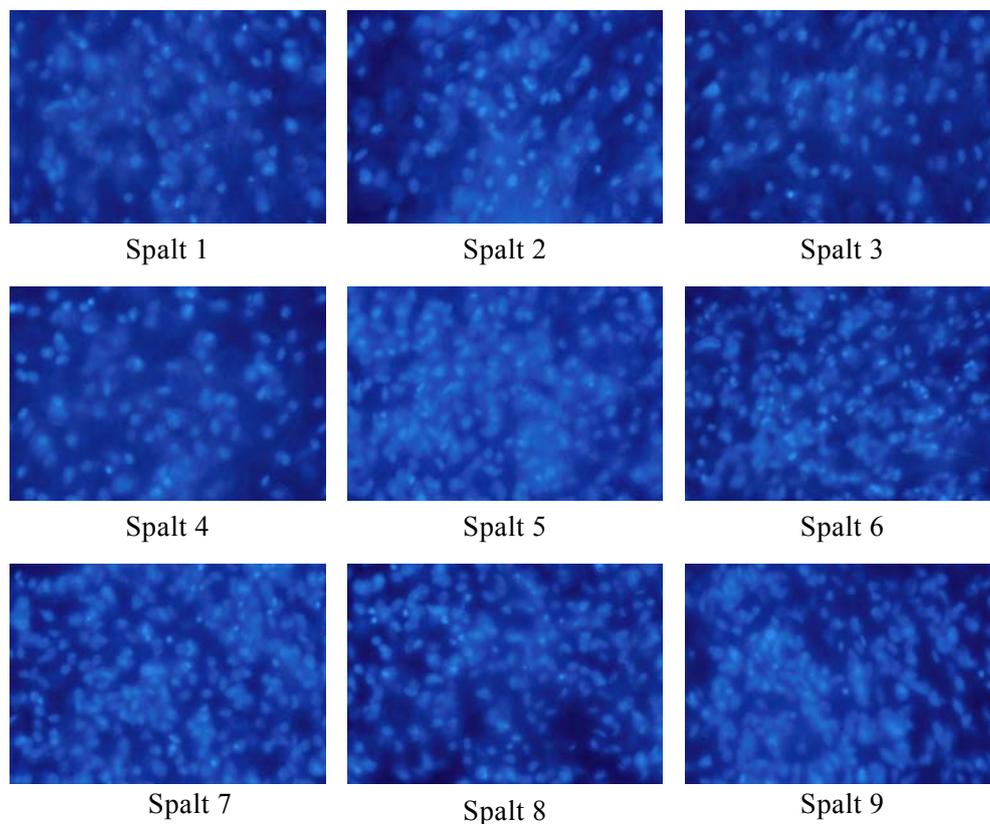


Abbildung 18: Verteilung der Fibroblasten auf der Oberfläche von Spalt 1 bis Spalt 9. (Vergrößerung x 12)

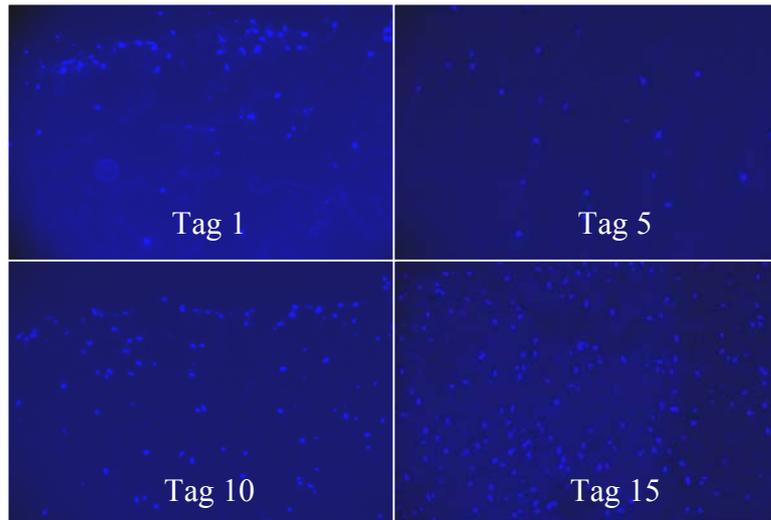
Auch die unterschiedliche Porengröße scheint keinen Einfluss auf die primäre Oberflächenbesiedelung der MatriDerm von Spalt 1 bis Spalt 9 auszuüben.

3.4.1.2 Migration und Proliferation von Progenitorfibroblasten in MatriDerm unter 3D Kulturbedingungen

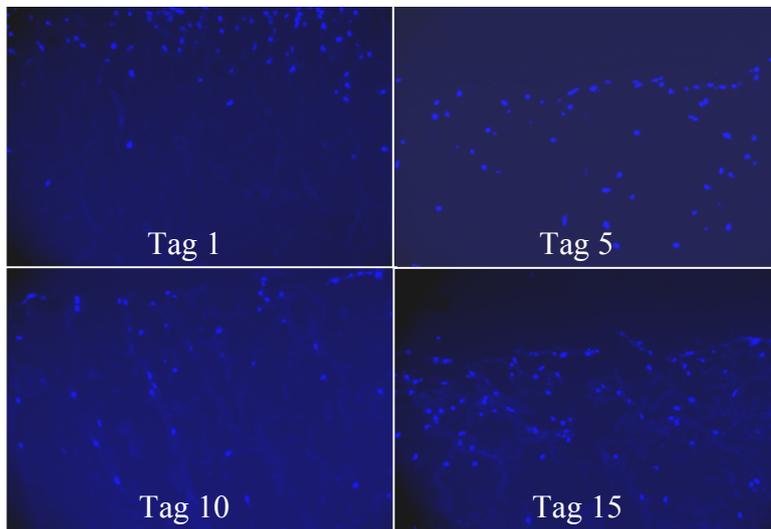
Zur Bestimmung des Migrations- und Proliferationsverhaltens wurden Progenitor-Fibroblasten mit einer Zelldichte von $2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ auf die verschiedenen MatriDerm-Spalte (Spalt 1 bis Spalt 9) unterschiedlicher Porengröße in SFM/DMEM (2:1) + 10 % FCS ausgesät. An den Tagen 1, 5, 10 und 15 nach Aussaat wurden die besiedelten MatriDerm fixiert und mit DAPI gefärbt.

Wie die in Abb. 19 dargestellte histologische Analyse der Einwanderung von Progenitor-Fibroblasten erkennen lässt, sind diese bereits einen Tag nach Aussaat in die Spalte 1 bis 6 stärker eingewandert als in die Spalte 7 bis 9. Dieses Ergebnis zeigt auf, dass die Porengröße für die primäre Einwanderungstiefe und Einwanderungsgeschwindigkeit relevant ist. An Tagen 5, 10 und 15 ist die Verteilung der Fibroblasten jedoch bei allen Spalten gleich.

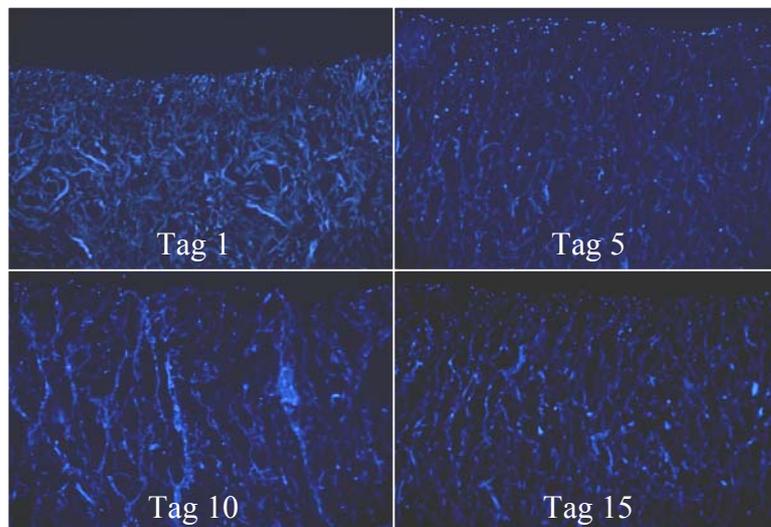
Spalt 1



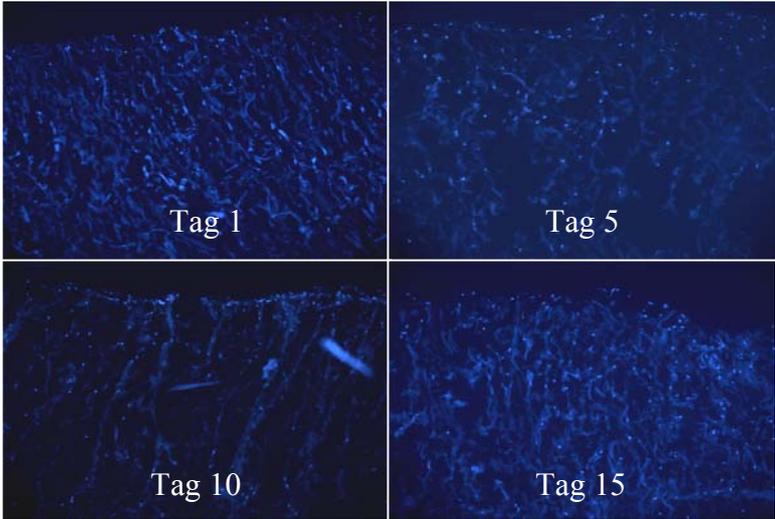
Spalt 2



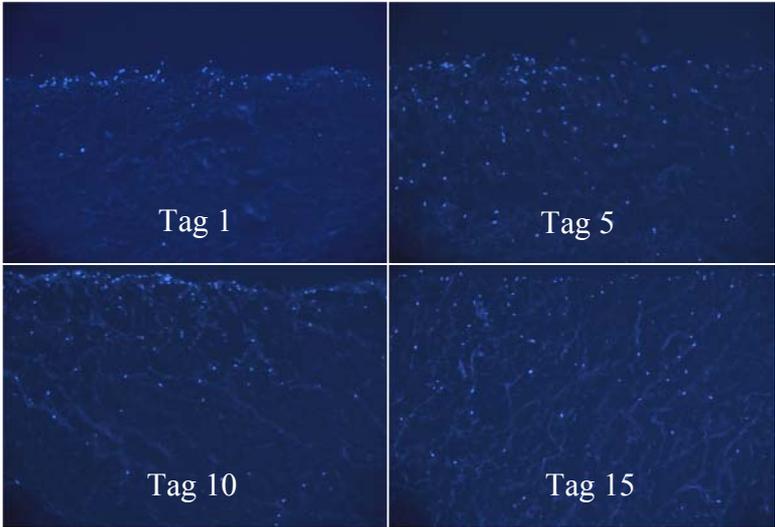
Spalt 3



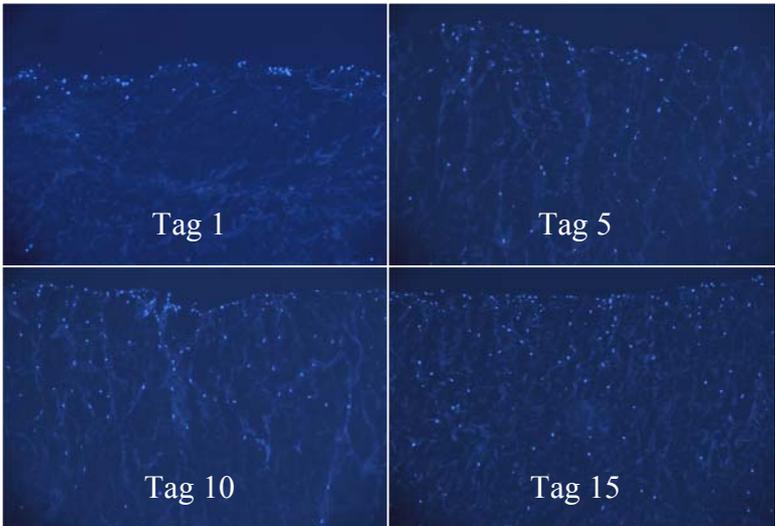
Spalt 4



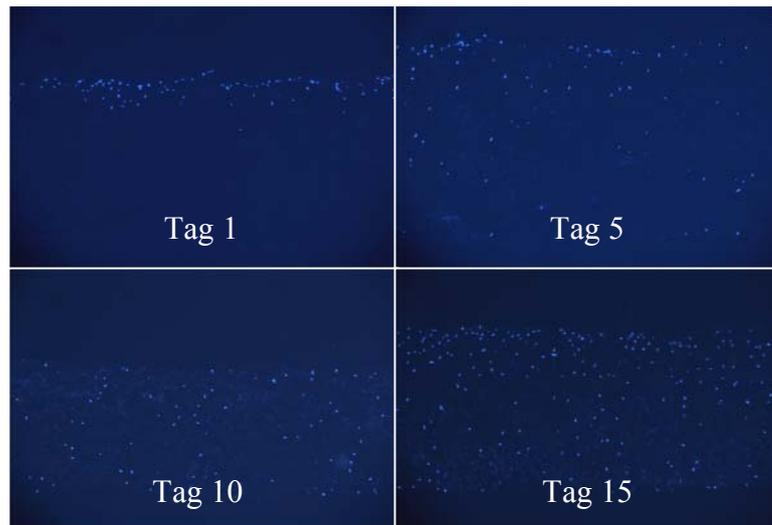
Spalt 5



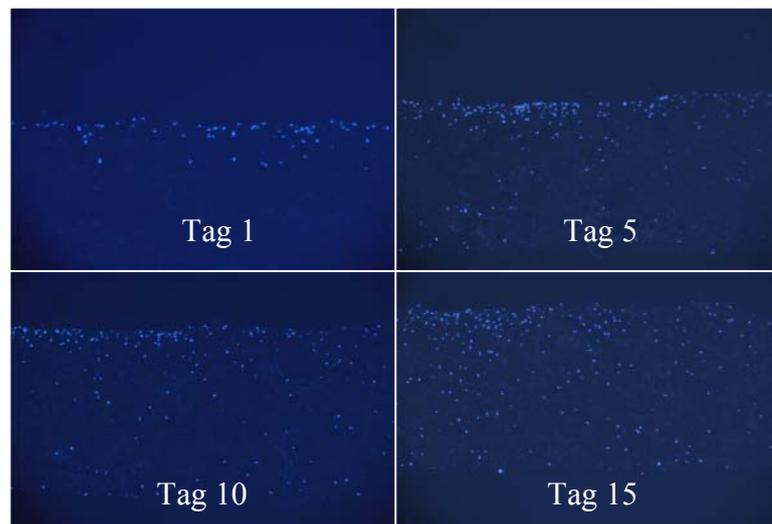
Spalt 6



Spalt 7



Spalt 8



Spalt 9

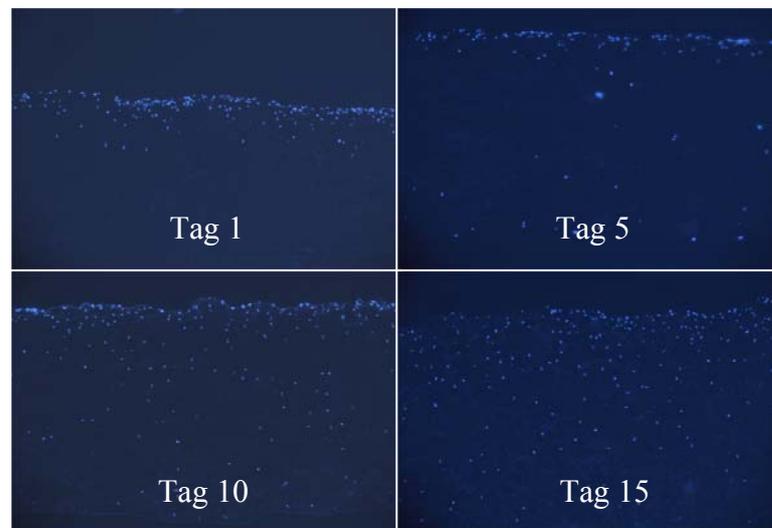
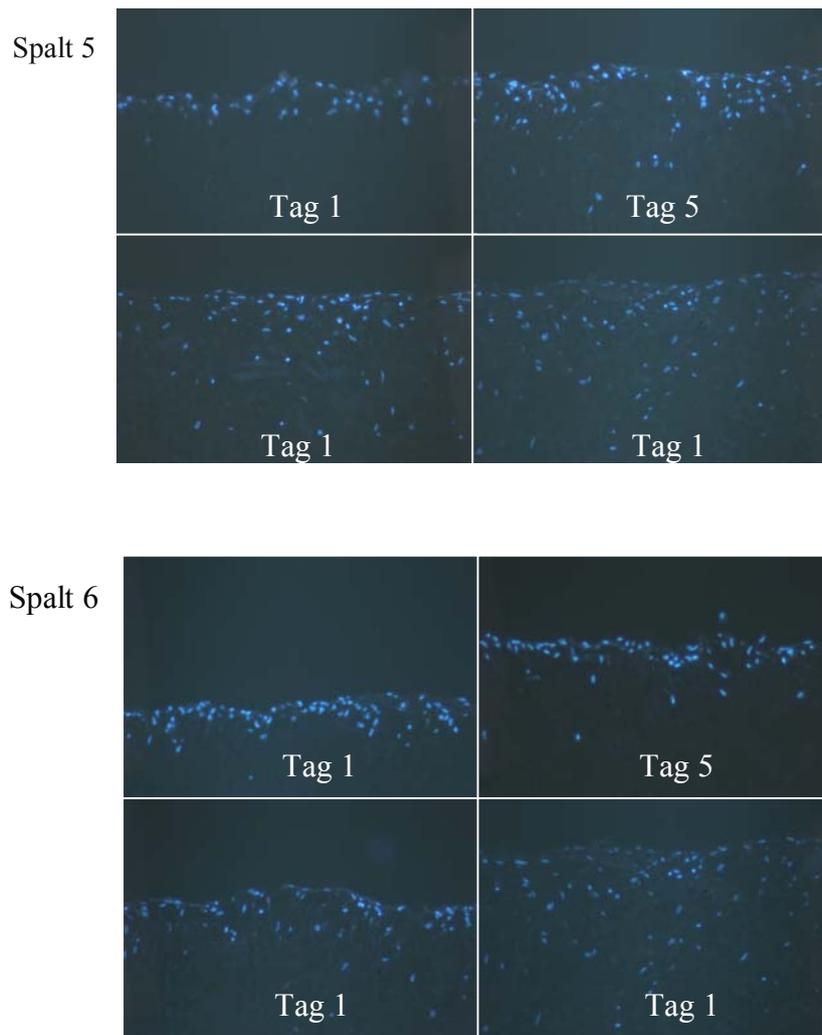


Abbildung 19: 3D-Proliferation von Fibroblasten (HSF-X1) mit Zelldichte von $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ auf MatriDerm-Spalten (Spalt 1 bis Spalt 9) unterschiedlicher Porengröße. Die Proben wurden an den Tagen 1, 5, 10, 15 fixiert und vertikal in der Mitte durchgeschnitten. Nach Aussaat erfolgte DAPI-Färbung. Bei Spalt 1 bis 6 wandern die Fibroblasten schon einen Tag nach Aussaat tief ein, bei Spalt 7 bis 9 dringen sie dagegen langsamer ein. An den Tagen 10 und 15 ist die Verteilung bei allen Spalten gleich. Blaufärbung mittels DAPI. (Vergrößerung x 6)

3.4.1.3 Migration von postmitotischen Fibrozyten in MatriDerm unter 3D-Kulturbedingungen

Da terminal ausdifferenzierte postmitotische Fibrozyten im Vergleich zu Progenitor-Fibroblasten ein um ca. 5- bis 10-fach größeres Zellvolumen aufweisen wurde die Migration und Verteilung der postmitotischen Fibrozyten ebenfalls für die MatriDerm-Spalte 1 bis 9 in gleicher Weise wie für Progenitorfibroblasten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.



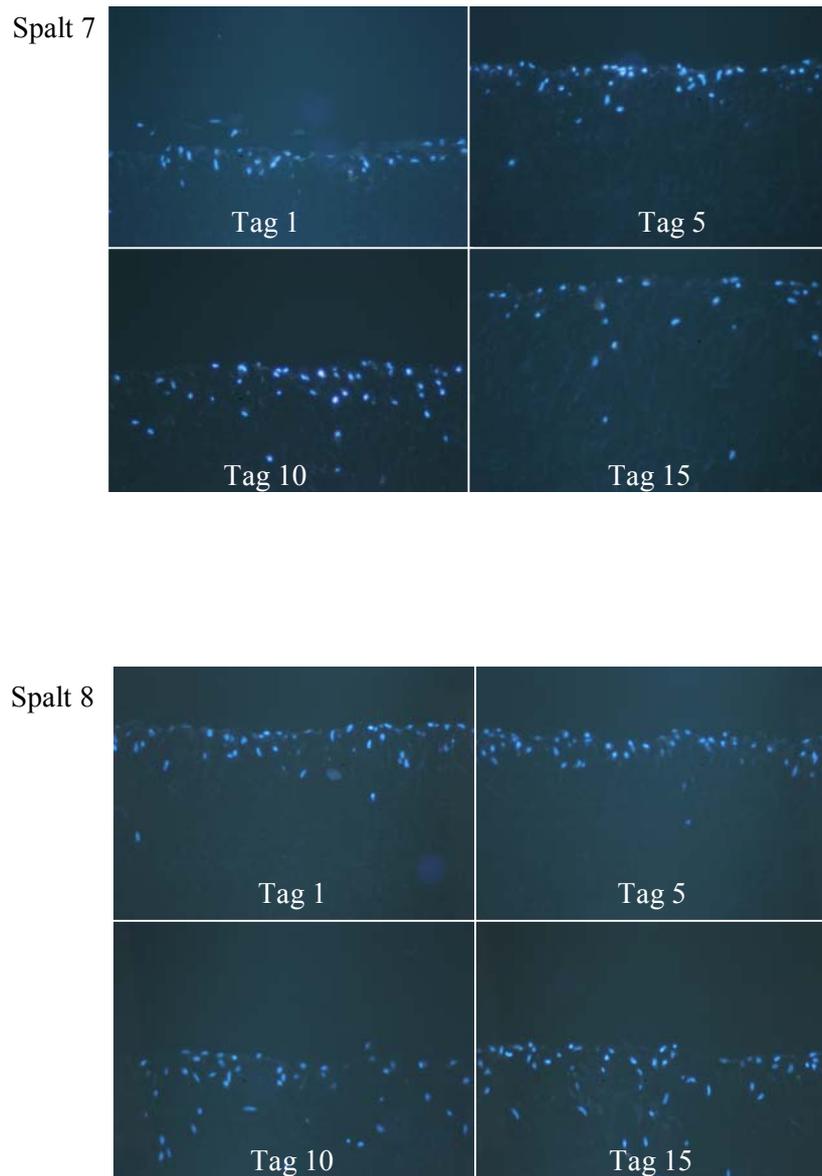


Abbildung 20: Migration von postmitotischen Fibrozyten (HSF-X1) auf MatriDerm Spalt 5 und 6 an verschiedenen Tagen nach Aussaat. Am Tag 1 befinden sich die Zellen noch auf der Oberfläche des MatriDerm, erst nach 5 Tagen wandern die Zellen in die Tiefe. Am Tag 15 sind die Zellen relativ gleichmäßig in MatriDerm verteilt. Auf MatriDerm Spalt 7 und 8 ist die Tiefewanderung von PMF-Zellen sehr stark beeinträchtigt und eingewanderte PMF-Zellen lassen sich nach 15 Tagen nur vereinzelt nachweisen. Blaufärbung der Zellen mittels DAPI. (Vergrößerung x 6)

Im Vergleich zu den Progenitor-Fibroblasten zeigen terminal differenzierte PMF-Fibrozyten ein deutlich verlangsamtes Einwandern in die MatriDerm Spalte 1-6, erreichen jedoch – wenn auch mit geringerer Zelldichte – am Tag 15 nahezu die gleiche Einwanderungstiefe. Die ist in Abb. 20 exemplarisch für Spalt 5 und 6 gezeigt.

Aufgrund ihrer Zellgröße und der geringeren Porengröße der Spalte 7-9 ist die Tiefenwanderung von PMF-Zellen jedoch in die Spalte 7 bis 9 sehr stark beeinträchtigt und nur vereinzelt lassen sich nach 15 Tagen eingewanderte PMF-Zellen nachweisen.

3.4.1.4 Proliferation von Fibroblasten auf MatriDerm in verschiedenen Zelldichten

Für die Bestimmung der Proliferationsrate von Progenitor-Fibroblasten auf MatriDerm wurden Progenitor-Fibroblasten in unterschiedlicher Zelldichte in DMEM + 10% FCS auf MatriDerm ausgesät. Zwischen den Tagen 1-9 wurde nach DAPI-Färbung eine Zellzahlbestimmung vorgenommen.

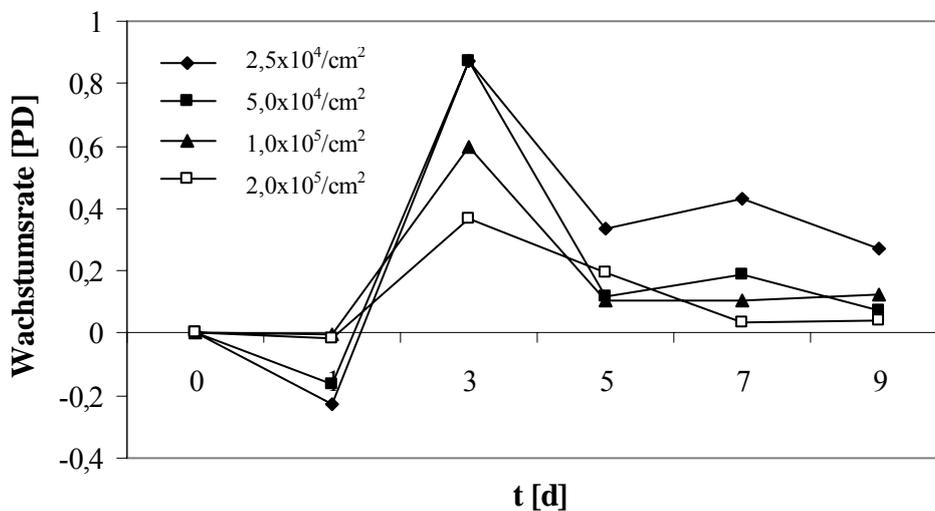


Abbildung 21: Wachstumsrate von Fibroblasten (HSF-X5, Mittelwerte der Populationsverdoppelung $n=3$) auf MatriDerm mit verschiedenen Zelldichten $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$, $5 \times 10^4/\text{cm}^2$, $1 \times 10^5/\text{cm}^2$, $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ nach 8h, 1, 3, 5, 7, 9 Tag. Obwohl die Wachstumsrate am Tag 1 abnimmt, steigt die Wachstumsrat nach 1 Tag bis zum Tag 9. Von Tag 1 bis Tag 3 wachsen die Zellen bei aller Zelldichte relative schneller.

Abb. 21 zeigt, dass die Proliferation der adhärenierten Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte mit Wachstumsraten zwischen 0,2 und 0,4 PDs/Tag bereits einen Tag nach Aussaat beginnt und bis zum 3. Tag nach Aussaat anhält. Danach fällt ebenfalls in Abhängigkeit von der Aussaatdichte die Wachstumsrate pro Tag für die Kulturzeit von Tag 3-5 stark ab und bleibt für die weitere Kulturdauer etwa auf dem gleichen Niveau.

3.4.1.5 Zelladhäsion von Keratinozyten auf MatriDerm mit Verschiedenen Zelldichten

Die Adhäsionsfähigkeit von Keratinozyten auf MatriDerm ist eine entscheidende Voraussetzung für die Verwendung von MatriDerm als zellbesiedeltes 3D-Composit zum Einsatz in der Wundheilung. Zur Bestimmung der Adhäsionsrate von Keratinozyten als

Funktion der Zelldichte wurden primäre humane Keratinozyten in drei unterschiedlichen Zelldichten in SFM:DMEM (2:1)-Medium auf MatriDerm (Spalt 5) ausgesät. 24 Stunden nach Aussaat wurde das MatriDerm mit DAPI gefärbt und die adhärenierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt.

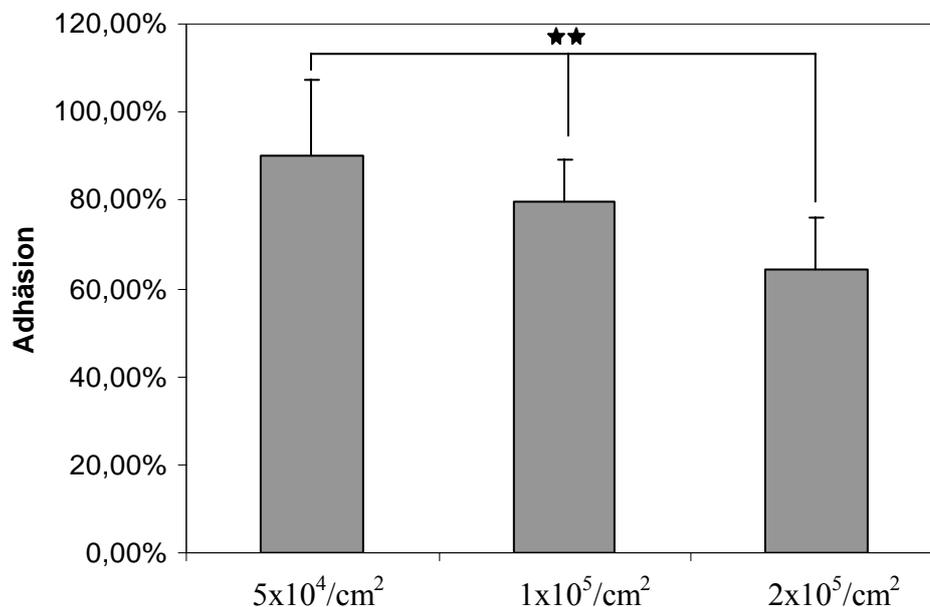


Abbildung 22: Zelladhäsion von humanen Keratinozyten (HK-19, HK-22 und HK-25, Mittelwerte der Adhäsionsrate und Standardabweichung des Mittelwerts) auf MatriDerm bei verschiedenen Zelldichten. Als Folge der Zunahme der Zelldichte sinkt die Zelladhäsionsrate ab.

Wie in Abb. 22 zu sehen ist, ist die Adhäsionsrate der primären Keratinozyten wird dabei von der Zelldichte beeinflusst. Bei niedriger Zelldichte (5×10^4 Zellen) adhärenieren relativ mehr Zellen auf der MatriDerm-Oberfläche als bei hoher Zelldichte (2×10^5 Zellen).

3.4.1.6 Proliferation von Keratinozyten auf MatriDerm mit verschiedenen Zelldichten

Um das Proliferationsverhalten der Keratinozyten auf MatriDerm zu untersuchen, wurden die Keratinozyten in unterschiedlichen Zelldichten auf MatriDerm in 2:1-SFM:DMEM Medium ausgesät. Die Zellzahlbestimmung erfolgte an unterschiedlichen Tagen nach Aussaat fluoreszenzmikroskopisch nach DAPI-Färbung.

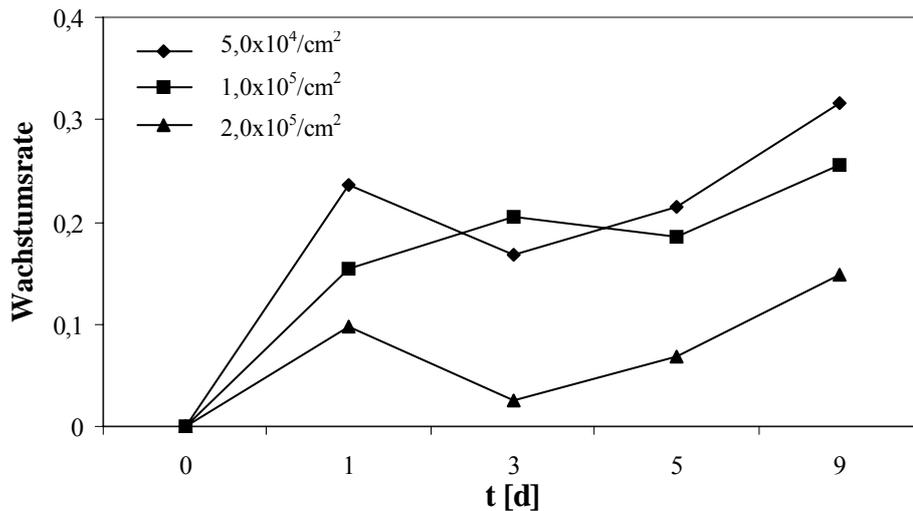


Abbildung 23: Wachstumsrate von primären Keratinozyten (HK19, HK22 und HK25, Mittelwerte der Populationsverdoppelung $n=3$) auf MatriDerm mit verschiedenen Zelldichten $5 \times 10^4/\text{cm}^2$, $1 \times 10^5/\text{cm}^2$, $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ nach 8h, 1, 3, 5, 7, 9 Tag. Der Wachstumsrat nach Aussaat steigt sofort ein. Zwischen Tag 5 und 7 senken die Wachstumsraten ab. Nachdem steigen die Wachstumsraten wieder. Es liegt keinen großen Unterschieden an Wachstumsrate bei aller Zelldichte.

Wie in Abb. 23 zu erkennen ist, steigt die Zellzahl der primären Keratinozyten bereits einen Tag nach Aussaat deutlich in Abhängigkeit von der Aussaatdichte an. Für die beiden Zelldichten (5×10^4 bzw. 1×10^5) bleibt die Wachstumsrate bis Tag 9 in etwa gleich (Wachstumsrate 0,1/Tag). Die höchste Aussaatdichte von 2×10^5 Zellen erreicht bis Tag 9 in etwa die Wachstumsrate der beiden anderen Zelldichten.

3.4.1.7 Die Bestimmung der Proliferation von Progenitorfibroblasten in MatriDerm unter 3D-Kulturbedingungen mittels BrdU-Färbung

Um die Proliferation der Progenitorfibroblasten in MatriDerm zu bestimmen, wurden proliferierende Fibroblasten in einer Zelldichte von $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ auf MatriDerm (Spalt 8) in SFM/DMEM (2:1) + 10 % FCS ausgesät. An unterschiedlichen Tagen nach Aussaat wurden die zellbesiedelten MatriDerm-Spalte fixiert und mit DAPI und Anti-BrdU gefärbt.

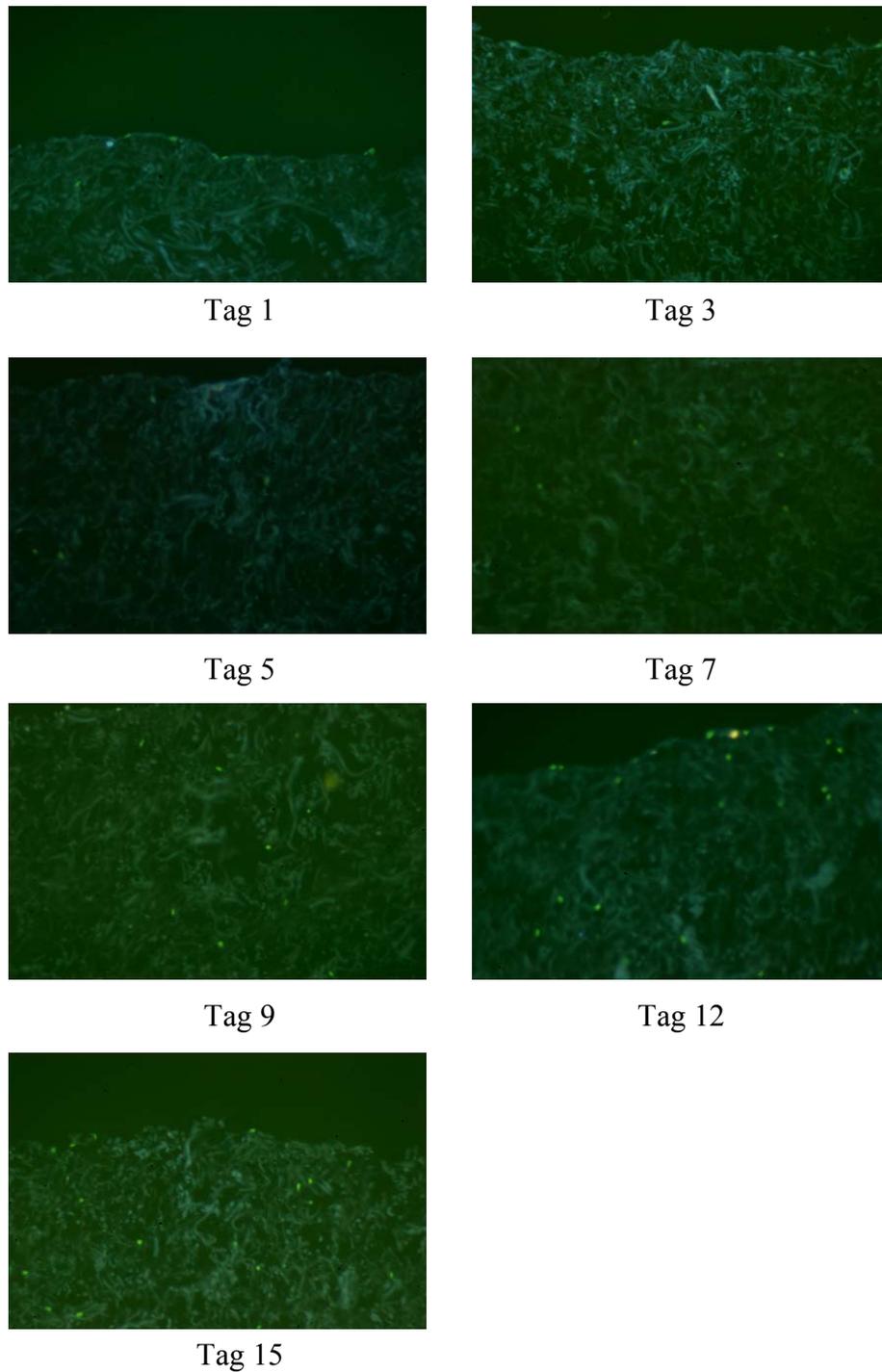


Abbildung 24: Darstellung der proliferierenden Progenitorfibroblasten (HSF-X1) an verschiedenen Tagen nach Aussaat mittels BrdU-Färbung (Gelbfärbung). Am Tag 1 nach Aussaat proliferieren die Fibroblasten auf der Oberfläche des MatriDerm, nach 3 Tagen sind sie in tiefere Schichten eingewandert, wo sie sich bis Tag 15 vermehren. (Vergrößerung x 6)

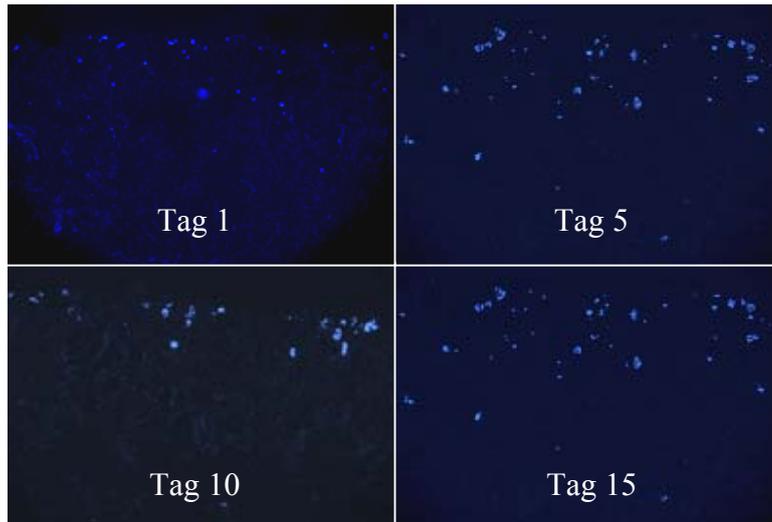
Wie in Abb. 24 zu erkennen ist, verteilen sich die Fibroblasten nach Aussaat zunächst gleichmäßig auf der Oberfläche des MatriDerm (Spalt 8) und beginnen auf der Oberfläche zu

proliferieren. Die Einwanderung von Fibroblasten in tiefere Schichten des MatriDerms ist erst ab Tag 3 zu beobachten. Aufgrund der DAPI- und BrdU-Färbung kann geschlossen werden, dass die Einwanderung und Proliferation der Zellen bis zu 15 Tage nach Aussaat anhält. Nach 15 Tage waren die MatriDerm-Spalte dicht mit Fibroblasten besiedelt.

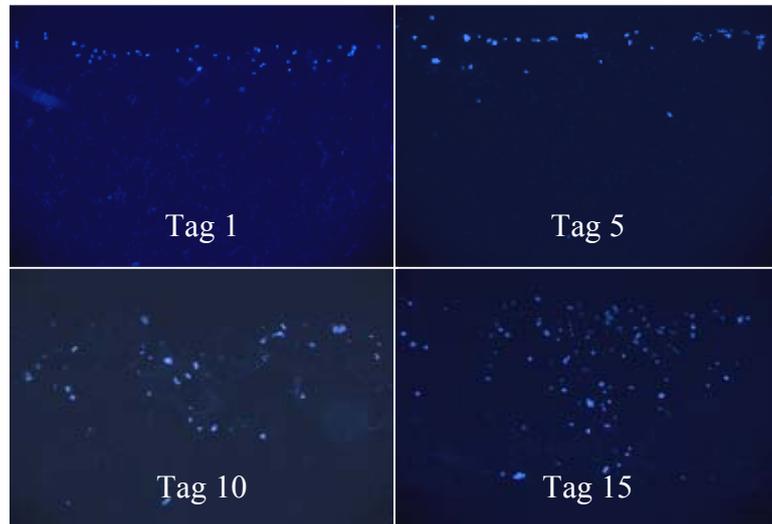
3.4.1.8 3D-Besiedelung von MatriDerm mit HaCaT-Zellen

Um die Migration und Verteilung von HaCaT-Zellen in MatriDerm zu untersuchen, wurden diese mit einer Zelldichte von $2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ auf MatriDerm-Spalten (Spalt 1 bis Spalt 9, Porengröße 56-23 μm) in DMEM + 10 % FCS ausgesät. Die MatriDerm-Spalte wurden nach unterschiedlichen Zeiten fixiert und mit DAPI gefärbt.

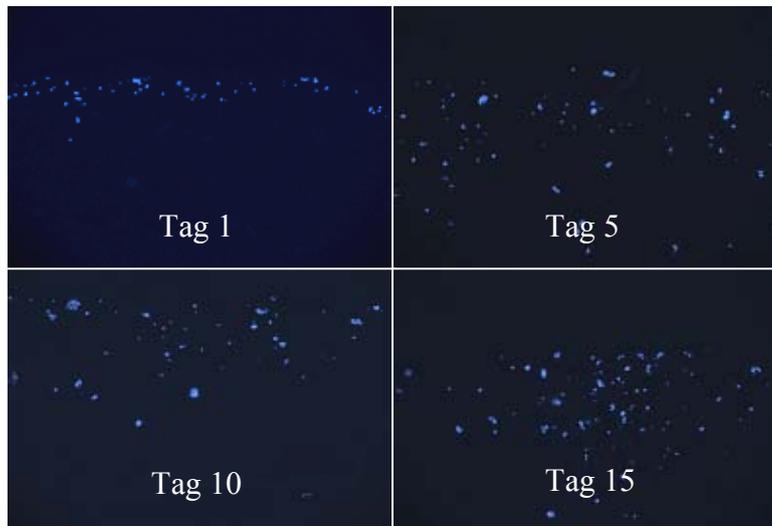
Spalt 1



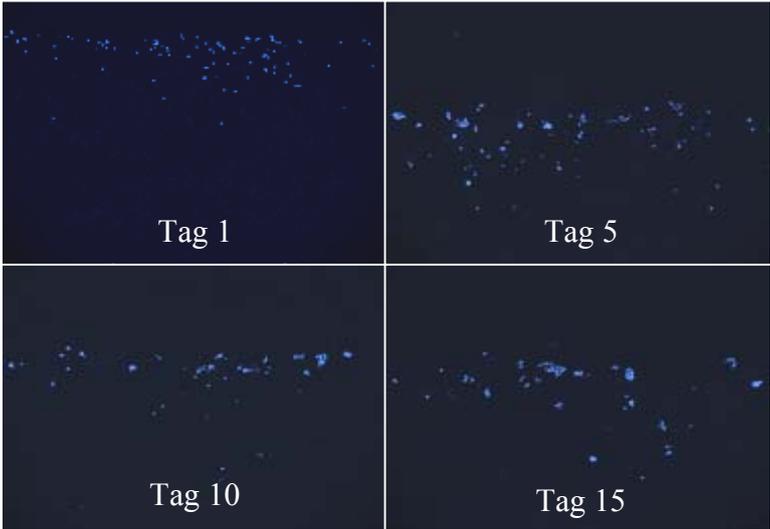
Spalt 2



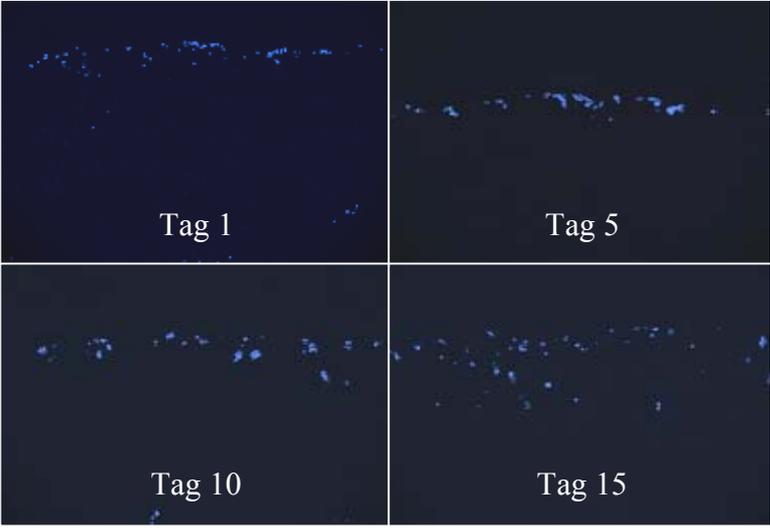
Spalt 3



Spalt 4



Spalt 5



Spalt 6



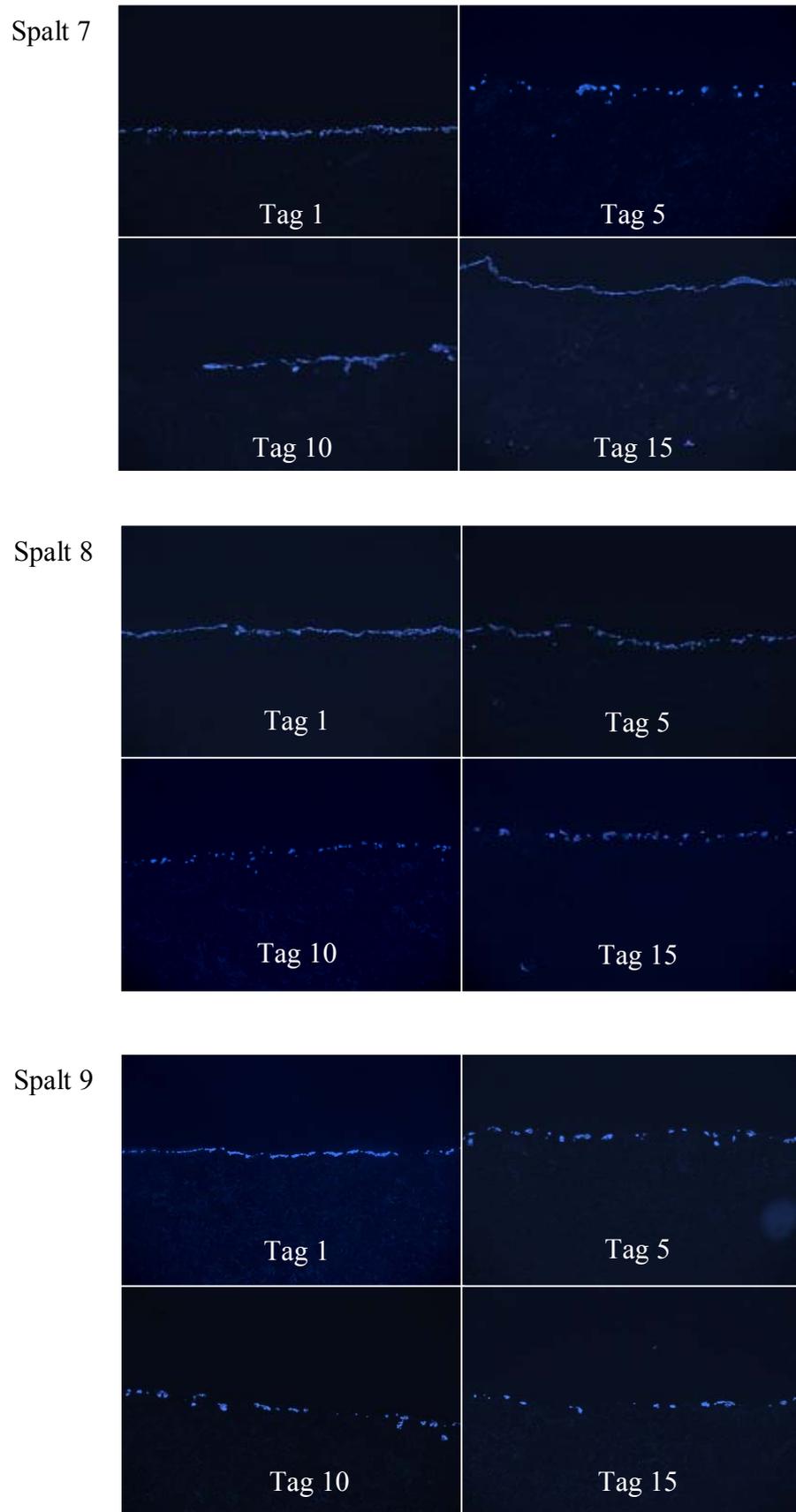


Abbildung 25: 3D-Besiedelung von MatriDerm (Spalte 1-9) mit HaCaT-Zellen (Zelldichte $2 \times 10^5 / \text{cm}^2$). Die Proben wurden an Tag 1, 5, 10, 15 fixiert und vertikal in der Mitte durchgeschnitten. Blaufärbung mittels DAPI. (Vergrößerung x 6)

Bereits einen Tag nach Aussaat verteilten sich die HaCaT-Zellen gleichmäßig auf der Oberfläche der MatriDerm-Spalte 1 bis 9. Tiefenwanderung (durch Migration und/oder Proliferation) ist danach nur bei den Spalten 1 bis 6 zu beobachten. Aufgrund der zu geringen Porengröße der Spalte 7-9 wandern die HaCaT-Zellen hier bis zum Tag 15 nicht in tiefere Schichten ein sondern bilden auf der Oberfläche einen dichten, mehrschichtigen Zell-Layer.

3.4.1.9 Die Bestimmung der Proliferation von primären humanen Keratinozyten in MatriDerm unter 3D-Kulturbedingung mittels BrdU-Färbung

Die Keratinozyten wurden mit einer Zelldichte von $2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ auf MatriDerm (Spalt 8) in 2:1-SFM:DMEM ausgesät und an unterschiedlichen Tagen fixiert. Um die Proliferation der humanen Keratinozyten in MatriDerm zu bestimmen, wurden die Keratinozyten einer Doppelfärbung mit BrdU und DAPI unterzogen.

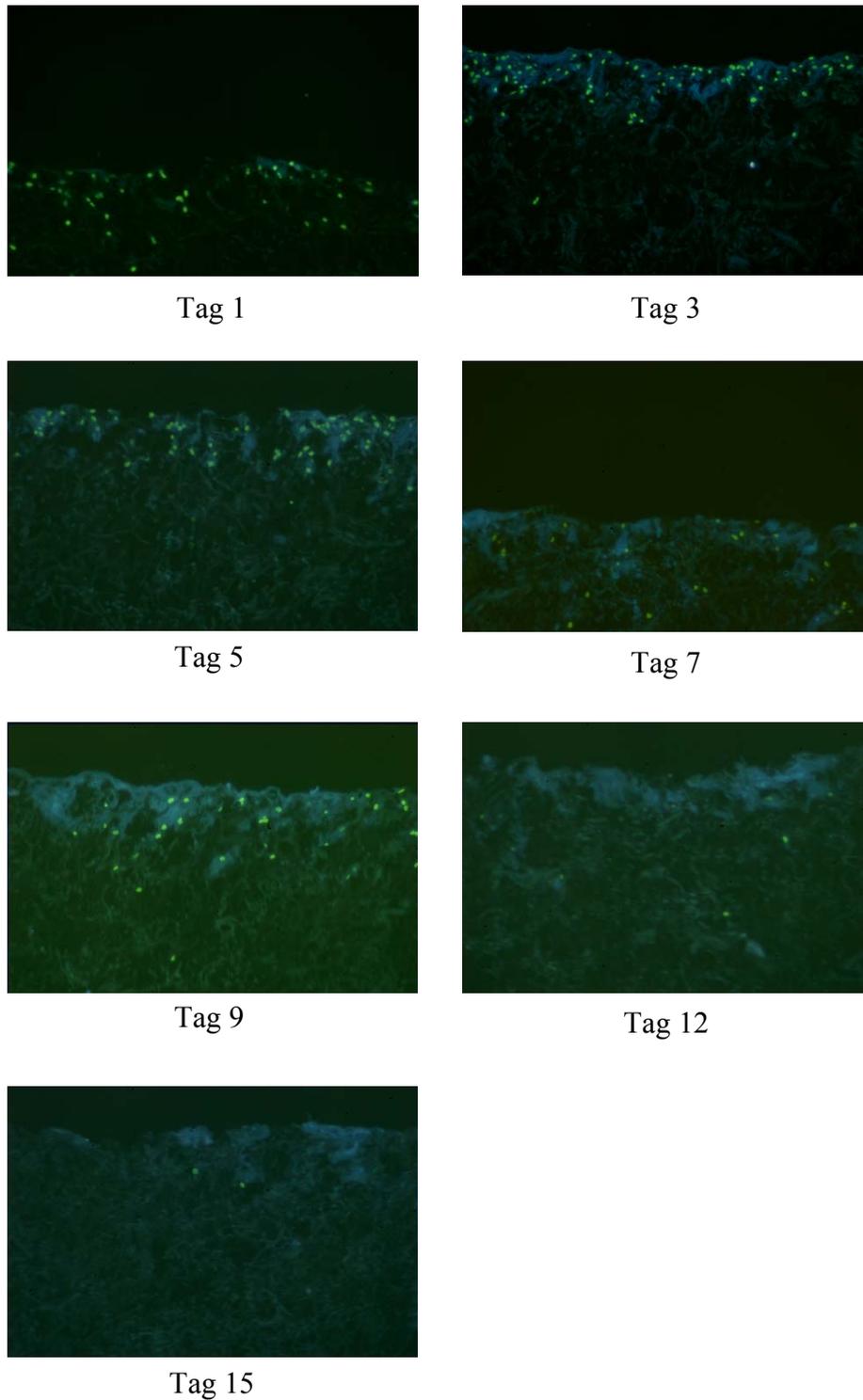


Abbildung 26: Darstellung der proliferierenden primären Keratinozyten (HK-45) an verschiedenen Tagen nach Aussaat mittels BrdU-Färbung (Gelbfärbung, Vergrößerung x 6).

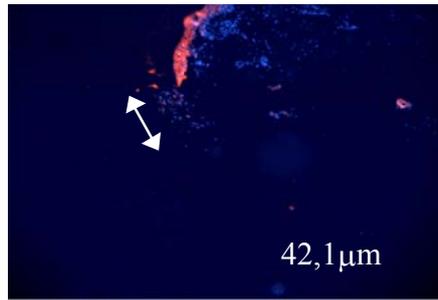
Nach Aussaat kommt es zunächst zur Oberflächenbesiedelung des MatriDerm-Spalt 8 durch die primären Keratinozyten sowohl bedingt durch Zellmigration als auch – wie aufgrund der BrdU-Färbung zu erkennen – durch Proliferation. Bis Tag 9 nach Aussaat ist die

Proliferationsrate relativ hoch und der Großteil der Keratinozyten befindet sich auf der Oberfläche des MatriDerm. Ab Tag 12 ist die Proliferation der Keratinozyten nahezu abgeschlossen. Tiefenwanderung findet nur bedingt und wenn, dann nur in den obersten Schichten des MatriDerm-Spalt 8 statt.

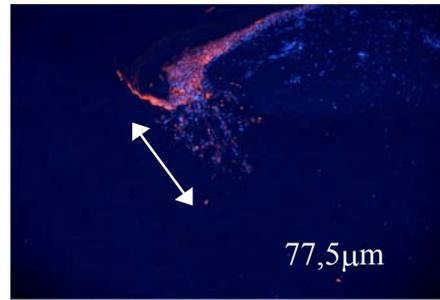
3.4.2 Spalthauttransplantate auf MatriDerm mit oder ohne Fibroblasten-Besiedelung

Mittels Spalthautpräparaten wurde die Besiedlungsfähigkeit von MatriDerm durch Keratinozyten als Funktion der Auswanderung untersucht. Dazu wurden humane Fibroblasten jeweils zwei Tage vor Auftrag der Spalthaut mit einer Zelldichte $2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ ausgesät. Nach Auftrag der Spalthaut wurden die Fibroblasten-besiedelten bzw. unbesiedelten MatriDerm-Träger (Spalt 5) in SFM/DMEM (2:1) + 10% FCS über 24 Tage kultiviert. Zur Bestimmung des Auswachsverhaltens der Keratinozyten aus der Spalthaut erfolgte die Anfärbung der Zellkerne und des Keratins mittels DAPI und Anti-pan-Cytokeratin.

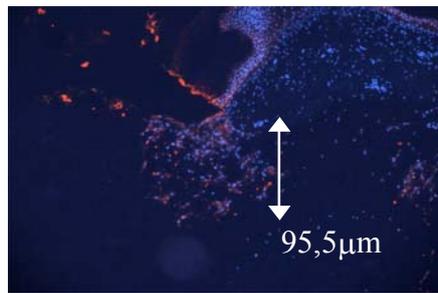
A



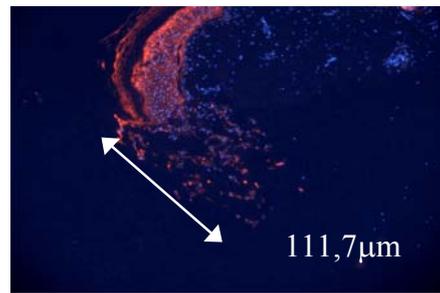
Tag 4



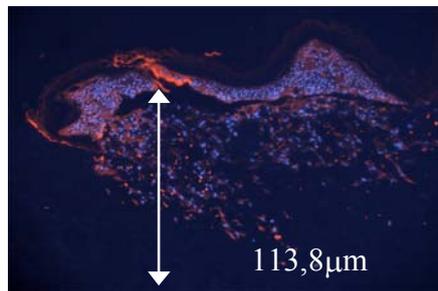
Tag 8



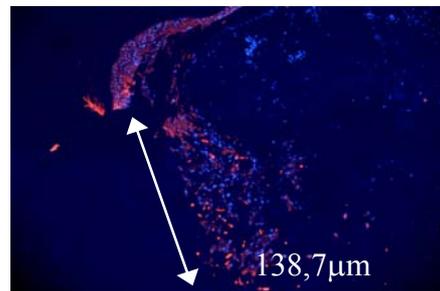
Tag 12



Tag 16



Tag 20



Tag 24

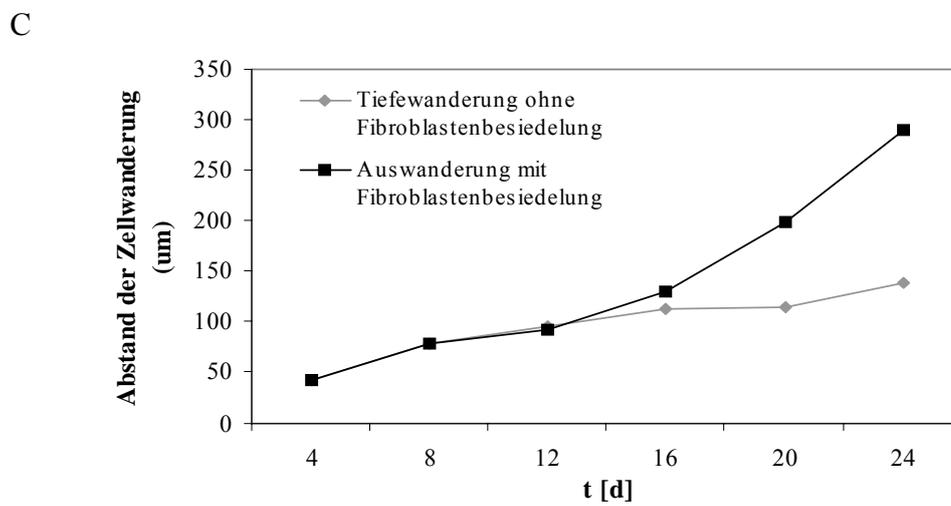
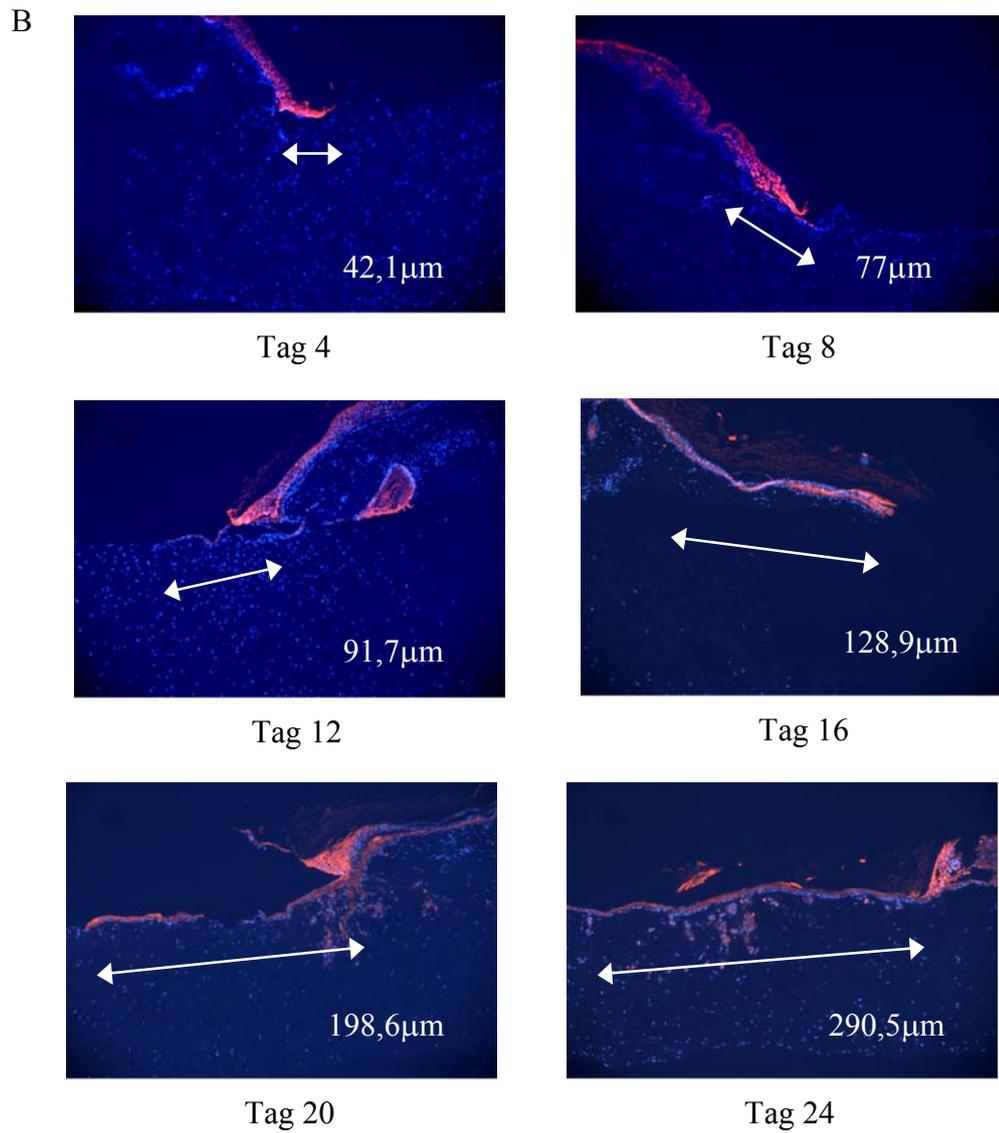


Abbildung 27: Auswachsen von Spalthaut-Keratinocyten auf MatriDerm-Trägern (Spalt 5) nach Tag 4, 8, 12, 16, 20, 24 in SFM/DMEM (2:1) + 10% FCS. (A) MatriDerm ohne Fibroblastenbesiedelung: rot gefärbten Keratinocyten wandern in tiefere Schichten des MatriDerms, Tiefeabstand ist abhängig von der Zeit, nach 24 Tage wandern die Keratinocyten bis $138,7\mu\text{m}$. (B) MatriDerm mit Fibroblastenbesiedelung: rot gefärbte Keratinocyten befinden sich ausschließlich an der Oberfläche des MatriDerms, Abstand des Auswanderung in Abhängigkeit von der Zeit, nur die blau gefärbten Fibroblasten wandern in tiefere Schichten. (C) Quantitative Darstellung von Auswanderung und Tiefwanderung der Spalthaut-Keratinocyten auf ohne oder mit Fibroblastenbesiedelung. DAPI: Blaufärbung; Cytokeratin: Rotfärbung. (Vergrößerung: $\times 6,25$)

Abb. 17 zeigt deutlich, dass die aus Spalthautgewebe auswandernden Keratinocyten auf azellulären MatriDerm-Trägern sehr stark zur Tiefenproliferation/-Migration tendieren. Hierbei ist die Tiefwanderung abhängig von der Zeit. Nach 4 Tagen wandern die Keratinocyten durchschnittlich bis zu $42,1\mu\text{m}$ tief in das MatriDerm ein; die Einwanderungstiefe nach 24 Tagen beträgt $138,7\mu\text{m}$. Auf mit Fibroblasten vorbesiedelten MatriDerm-Trägern kommt es zu keiner Tiefenwanderung der aus dem Spalthautgewebe auswandernden Keratinocyten, sondern die Zellen migrieren auf MatriDerm-Oberfläche, so dass sich eine Epithelschicht ausbildet. Innerhalb von 24 Tagen zeigen die Keratinocyten eine Oberflächenwanderung bis zu einer Entfernung vom Spalthautgewebe von durchschnittlich $290,5\mu\text{m}$.

3.4.3 Besiedlungsdynamik von Zellen auf /in MatriDerm

3.4.3.1 Besiedlungsdynamik von HaCaT-Zellen auf/in MatriDerm mit oder ohne Fibroblastenbesiedlung.

Um den Einfluss von Fibroblasten-besiedelten MatriDerm-Trägern auf die Ausbildung eines stratifizierten Epithels nach Besiedelung mit HaCaT-Zellen zu untersuchen, wurden die Fibroblasten zwei Tage vor den HaCaT-Zellen mit einer Zelldichte von $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ in SFM/DMEM (2:1) + 10% FCS auf MatriDerm ausgesät. Die HaCaT-Zellen wurden dann mit einer Zelldichte von $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ auf die mit Fibroblasten vorbesiedelten MatriDerm-Träger ausgesät und bis zu 20 Tagen kultiviert. Zur Kontrolle wurden auch HaCaT-Zellen auf MatriDerm-Träger ohne Fibroblasten ausgesät. An verschiedenen Tagen nach Aussaat der HaCaT-Zellen wurden Paraffinschnitte von jeweils 2 Proben angefertigt und mit DAPI und Anti-Cytokeratin gefärbt.

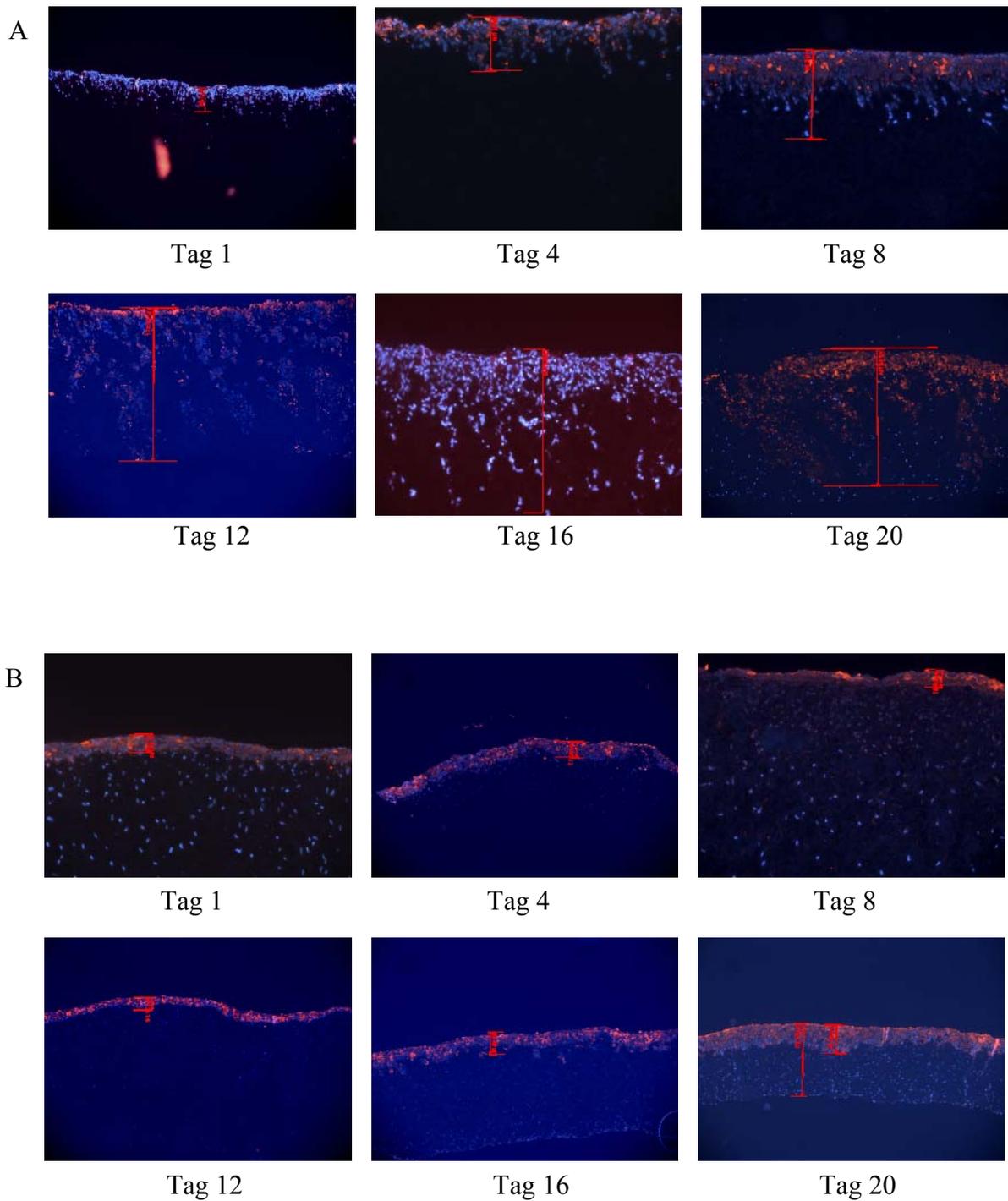


Abbildung 28: HaCaT organotypische Kultur auf Fibroblasten-besiedeltem oder unbesiedeltem MatriDerm. (A) MatriDerm ohne Fibroblastenbesiedelung: HaCaT-Zellen wandern in tiefere Schichten des MatriDerms (B) MatriDerm mit Fibroblastenbesiedelung: rot (mit pan-Cytokeratin) gefärbte HaCaT-Zellen befinden sich ausschließlich an der Oberfläche des MatriDerms, nur die blau gefärbten Fibroblasten wandern in tiefere Schichten. (Vergrößerung x 6,25)

Ein Tag nach Aussaat der HaCaT-Zellen auf nicht mit Fibroblasten vorbesiedelten MatriDerm-Trägern adhären die Zellen zunächst auf der Oberfläche des MatriDerm.

Danach wanderten die Zellen kontinuierlich von Tag 4 bis 20 in tiefere Schichten ein. Nach Aussaat der HaCaT-Zellen auf mit Fibroblasten vorbesiedelten MatriDerm-Träger ist über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Tiefenwanderung der HaCaT-Zellen zu beobachten. Die Zellen bleiben auf der Oberfläche der MatriDerm-Träger und bilden eine dünne Zellschicht aus. 20 Tage nach Aussaat bildeten die HaCaT-Zellen eine gut darstellbare Epithelschicht aus.

3.4.3.2 Besiedlungsdynamik humaner Keratinozyten auf/in MatriDerm

Um den Einfluss von Progenitorfibroblasten, postmitotischen Fibrozyten und einer Mischung von MF- und PMF-Zellen (von 2:1) besiedelten MatriDerm-Trägern auf die Ausbildung eines stratifizierten Epithels mit Basallamina-Struktur nach Besiedelung mit primären Keratinozyten zu untersuchen, wurden die Progenitorfibroblasten, die postmitotischen Fibrozyten und eine Mischung von MF- und PMF-Zellen fünf Tage vor den Keratinozyten mit einer Zelldichte von $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ in SFM/DMEM (2:1) + 10% FCS auf MatriDerm ausgesät. Die Keratinozyten wurden dann mit einer Zelldichte von $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ auf die vorbesiedelten MatriDerm-Träger ausgesät und bis zu 15 Tagen kultiviert. Zur Kontrolle wurden auch Keratinozyten auf MatriDerm-Träger ohne Fibroblasten ausgesät. An den Tagen 1, 5, 10 und 15 wurden die MatriDerm-Träger zur Anfertigung von Paraffinschnitten aus der Kultur entnommen. Für jede Kulturbedingung wurden zwei Parallel-Proben angefertigt. Die Ausbildung eines stratifizierten Epithels mit Basallamina-Struktur und der Organisation differenzierter Keratinozyten wurde mittels DAPI- sowie Antikörperfärbung für die Proteine Cytokeratin, Involucrin, Vimentin, Laminin-5 und Kollagen IV überprüft.

Die Organisation der epithelialen Struktur durch eingesiedelte primäre Keratinozyten wurde mit Fibroblasten, postmitotischen Fibrozyten und Mischung von MF- und PMF-Zellen vorbesiedelte MatriDerm-Träger im Vergleich zu den Fibroblasten-unbesiedelten Trägern untersucht. Die Ausbildung des neuen Epithels ist anhand des strukturierten Auftretens von Cytokeratin in Abbildung 29 dargestellt.

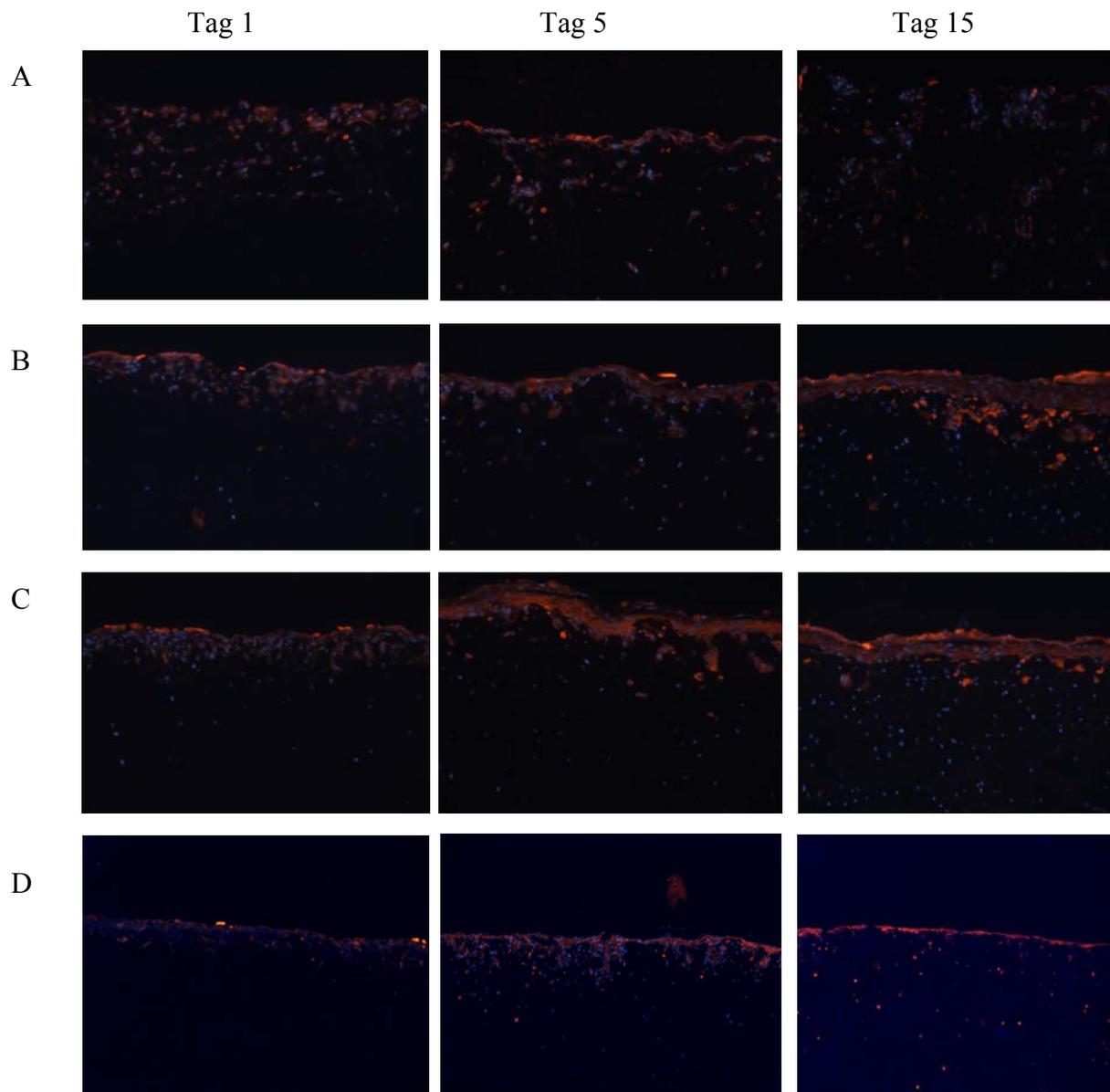


Abbildung 29: Nachweis von Cytokeratin in der Keratinozyten-spezifischen Epithelschicht. (A) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten ohne Fibroblastenvorbesiedelung: die Färbung mit einem Pan-Cytokeratin-Antikörper zeigt eine ungleichmäßige und nicht strukturierte Präsenz von Cytokeratin in der durch Keratinozyten gebildeten Zellschicht. (B) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach Fibroblastenbesiedelung: die Färbung mit einem Pan-Cytokeratin-Antikörper zeigt eine weitestgehend auf die apikale Seite begrenzte Cytokeratin-Struktur in der durch Keratinozyten gebildeten Epithelschicht. (C) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach postmitotischen Fibrozytenbesiedelung: die Färbung mit einem Pan-Cytokeratin-Antikörper zeigt eine weitestgehend auf die apikale Seite begrenzte Cytokeratin-Struktur in der durch Keratinozyten gebildeten Epithelschicht. (D) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach einer Mischung von MF- und PMF-Zellen Fibroblastenbesiedelung: die Färbung mit einem Pan-Cytokeratin-Antikörper zeigt eine weitestgehend auf die apikale Seite diffuse Cytokeratin-Struktur in der durch Keratinozyten gebildeten Epithelschicht. DAPI: Blaufärbung; Pan-Cytokeratin: Rotfärbung. (Vergrößerung x 6,25)

Die Keratinozyten auf mit postmitotischen Fibrozyten-vorbesiedeltem MatriDerm bilden nur eine dünne Schicht aus. Die Keratinozyten auf mit Progenitorfibroblasten oder einer Mischung von MF und PMF-Zellen vorbesiedelten MatriDerm-Träger bildeten eine Zellschicht aus.

Involucrin ist ein terminaler Differenzierungsmarker der Keratinozyten, die von der Basalmembran nach außen wandern. Die Expression von Involucrin wurde mit Fibroblasten, postmitotischen Fibrozyten und einer Mischung von MF- und PMF-Zellen vorbesiedelte MatriDerm-Träger im Vergleich zu den Fibroblasten-unbesiedelten Trägern untersucht. Die Expression von Involucrin in Keratinozyten ist in Abbildung 30 dargestellt. Zur Gegenfärbung wurden die Kerne mit DAPI gefärbt.

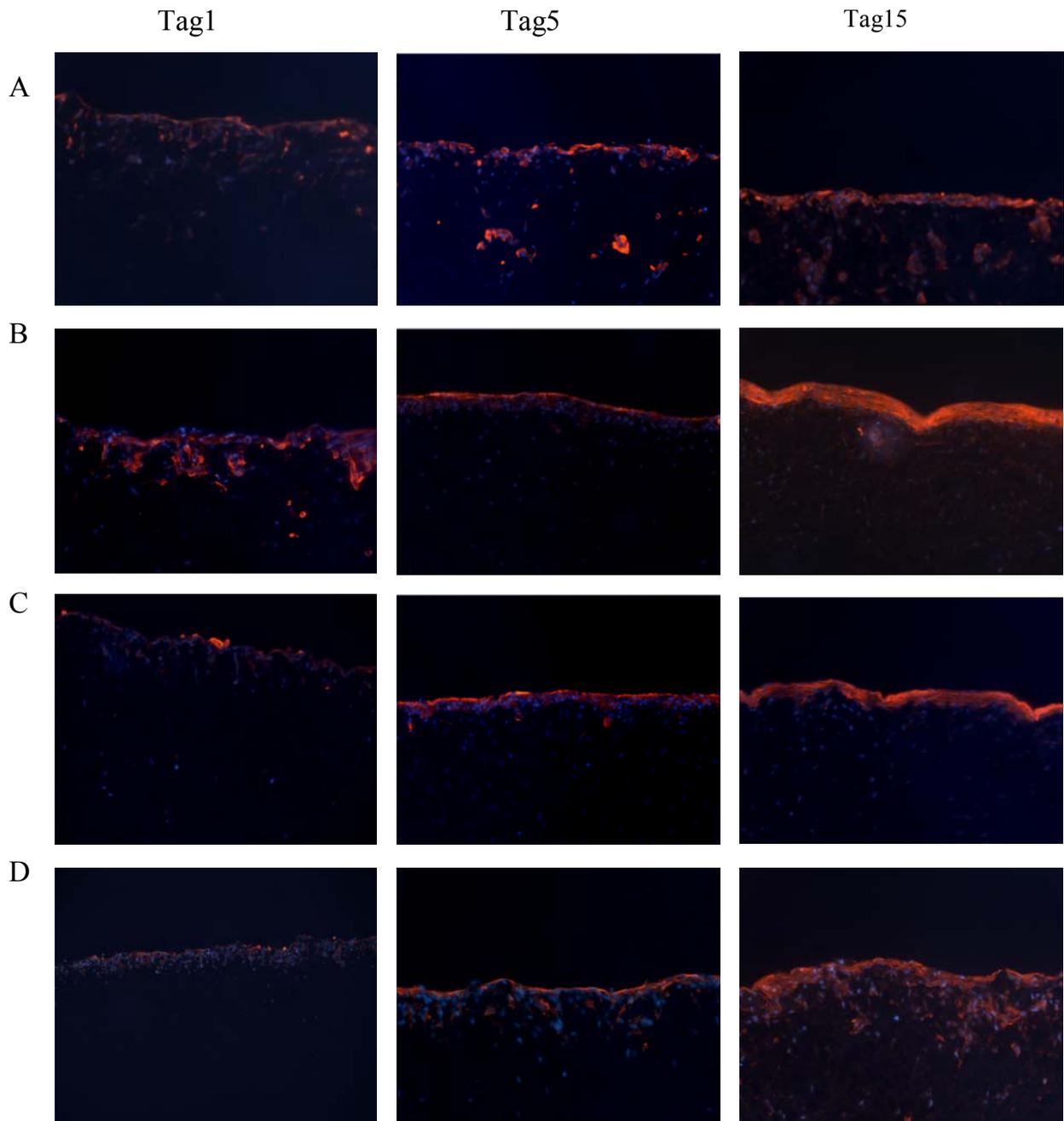


Abbildung 30: Nachweis von Involucrin in der Keratinozyten-spezifischen Epithelschicht. (A) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten ohne Fibroblastenvorbesiedelung: die strukturierte, aber geringe Präsenz von Involucrin indiziert die vorhandene, aber wenig kompakt ausgebildete Differenzierungsschicht von stratifizierenden Keratinozyten in der Epithelschicht. (B) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach Fibroblastenbesiedelung: die dichte strukturierte Präsenz von Involucrin indiziert eine kompakt ausgebildete Differenzierungsschicht von stratifizierenden Keratinozyten in der Epithelschicht. (C) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach MF- und PMF-Zellenbesiedelung: die dichte strukturierte Präsenz von Involucrin indiziert eine kompakt ausgebildete Differenzierungsschicht von stratifizierenden Keratinozyten in der Epithelschicht. (D) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach PMF-Besiedelung: die diffus strukturierte Präsenz von Involucrin indiziert eine dichte ausgebildete Differenzierungsschicht von stratifizierenden Keratinozyten in der Epithelschicht. DAPI: Blaufärbung; Involucrin: Rotfärbung. (Vergrößerung x 6,25)

Vimentin als ein zytoskelettäres Protein wird in Fibroblasten exprimiert. Die Expression von Vimentin wurde mit Fibroblasten, postmitotischen Fibrozyten und einer Mischung von MF- und PMF-Zellen vorbesiedelte MatriDerm-Träger im Vergleich zu den Fibroblasten-unbesiedelten Trägern untersucht. Die Expression von Vimentin ist in Abbildung 31 dargestellt. Zur Gegenfärbung wurden die Kerne mit DAPI gefärbt.

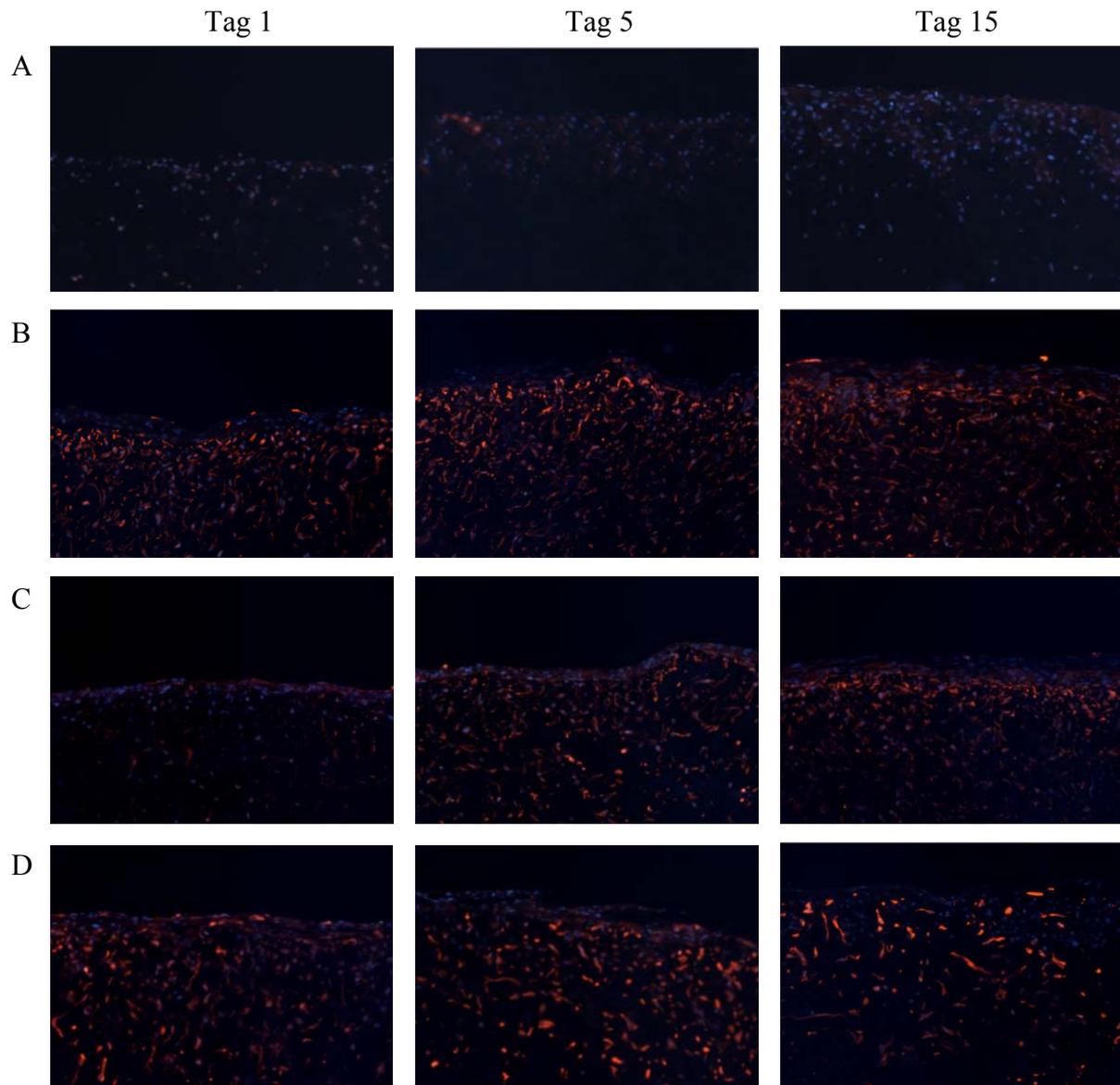


Abbildung 31: Expression von Vimentin (A) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten ohne Fibroblastenvorbesiedelung: keine Präsenz von Vimentin; (B) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach Fibroblastenbesiedelung: starke Expression von Vimentin. (C) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach Vorbesiedelung mit einer Mischung von MF- und PMF-Zellenbesiedelung: starke Expression von Vimentin. (D) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach PMF-Vorbesiedelung: relativ geringe Expression von Vimentin im Vergleich zu (B) und (C). DAPI: Blaufärbung; Vimentin: Rotfärbung. (Vergrößerung x 6,25)

Kollagen IV und Laminin 5 sind Hauptbestandteile der Basalmembran. Durch immunhistochemischer Färbung können Kollagen IV und Laminin 5 dargestellt werden. Die Expression von Kollagen IV wurde mit Fibroblasten, postmitotischen Fibrozyten und einer Mischung von MF- und PMF-Zellen vorbesiedelte MatriDerm-Träger im Vergleich zu den Fibroblasten-unbesiedelten Trägern untersucht. Die Expression von Kollagen IV ist in Abbildung 32 dargestellt. Zur Gegenfärbung wurden die Kerne der Zellen mit DAPI gefärbt.

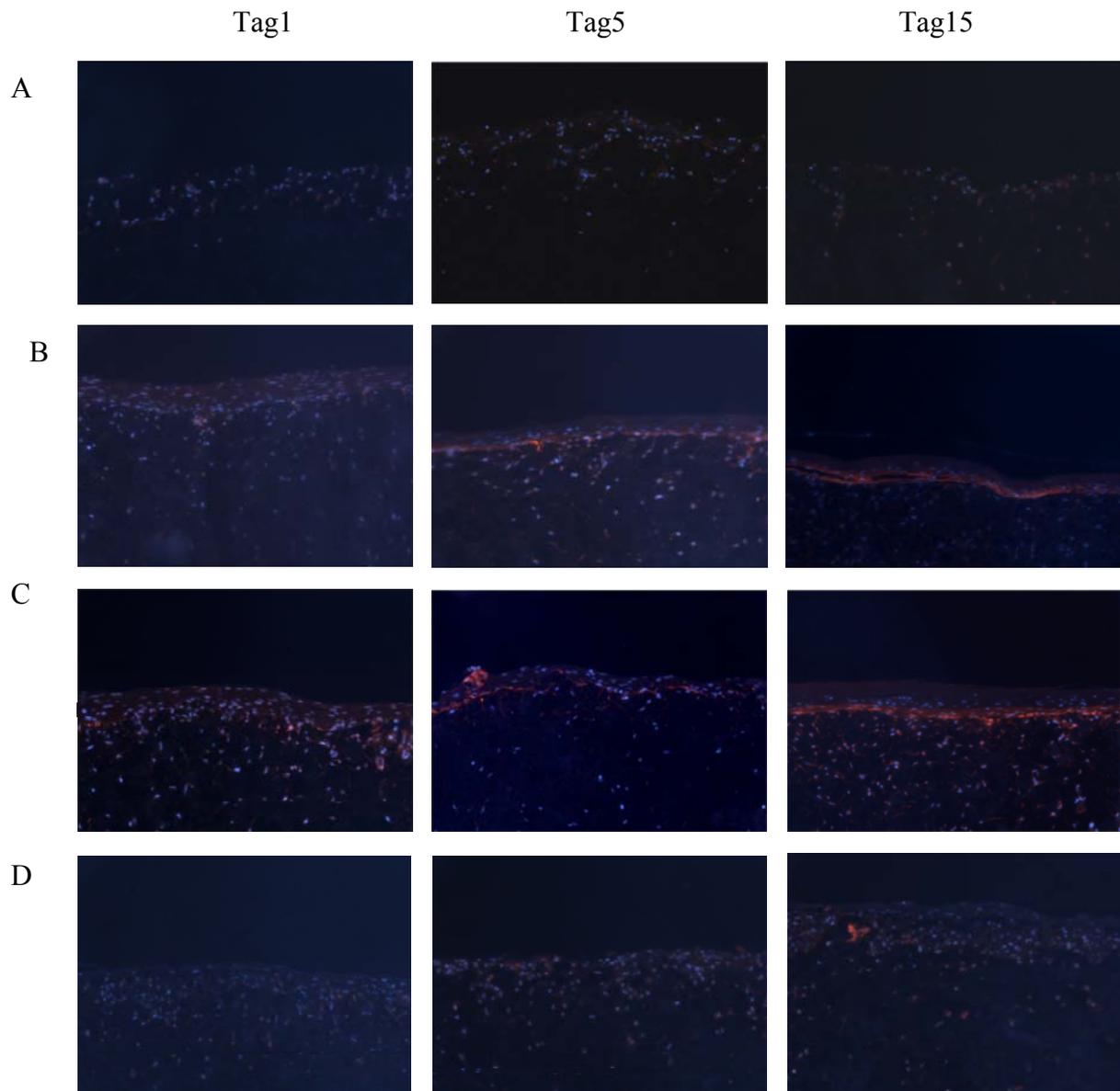


Abbildung 32: Nachweis von Kollagen IV in einer strukturierten Basallamina. (A) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten ohne Fibroblastenvorbesiedelung: diffuse zeitabhängige Verteilung der Kollagen IV-Färbung in der Keratinozytenschicht. (B) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach Fibroblastenbesiedelung: die strukturierte Akkumulation der Kollagen IV-Färbung im Grenzbereich zwischen Keratinozyten und Fibroblasten indiziert eine zeitabhängige Ausbildung einer Basallamina zwischen Keratinozyten und Fibroblasten. (C) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach einer Mischung von MF- und PMF-

Zellenbesiedelung: die strukturierte Akkumulation der Kollagen IV-Färbung im Grenzbereich zwischen Keratinozyten und Fibroblasten indiziert eine zeitabhängige Ausbildung einer Basallamina zwischen Keratinozyten und MF- und PMF-Zellen. (D) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach postmitotischen Fibrozytenbesiedelung: diffuse zeitenabhängige Verteilung der Kollagen IV-Färbung im Grenzbereich zwischen Keratinozyten und Fibroblasten indiziert eine zeitabhängige Ausbildung einer Basallamina zwischen Keratinozyten und postmitotischen Fibrozyten. DAPI: Blaufärbung; Kollagen IV: Rotfärbung. (Vergrößerung x 6,25)

MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten ohne Fibroblastenvorbesiedelung zeigte eine diffuse zeitenabhängige Verteilung der Kollagen IV-Färbung in der Keratinozytenschicht. MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach Fibroblastenbesiedelung oder einer Mischung von MF- und PMF-Zellenbesiedelung zeigte eine strukturierte Akkumulation der Kollagen IV-Färbung im Grenzbereich zwischen Keratinozyten und Fibroblasten. Dies indiziert eine zeitabhängige Ausbildung einer Basallamina zwischen Keratinozyten und Fibroblasten oder MF und PMF. MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach postmitotischen Fibrozytenbesiedelung zeigte eine diffuse zeitenabhängige Verteilung der Kollagen IV-Färbung im Grenzbereich zwischen Keratinozyten und Fibroblasten. Dies indiziert eine zeitabhängige Ausbildung einer Basallamina zwischen Keratinozyten und postmitotischen Fibrozyten. Die Anti-Kollagen IV-Färbung am 5. Tag zeigte eine deutliche und unterbrochene Anfärbung im Basalmembranbereich in mit Progenitorfibroblasten und Mischung von MF- und PMF-Zellen besiedeltem MatriDerm, am 15. Tag eine signifikante kontinuierliche Anfärbung.

Die Expression von Laminin-5 wurde mit Fibroblasten, postmitotischen Fibrozyten und einer Mischung von MF- und PMF-Zellen vorbesiedelte MatriDerm-Träger im Vergleich zu den Fibroblasten-unbesiedelten Trägern untersucht. Die Expression von Laminin-5 ist in Abbildung 33 dargestellt. Zur Gegenfärbung wurden die Kerne der Zellen mit DAPI gefärbt.

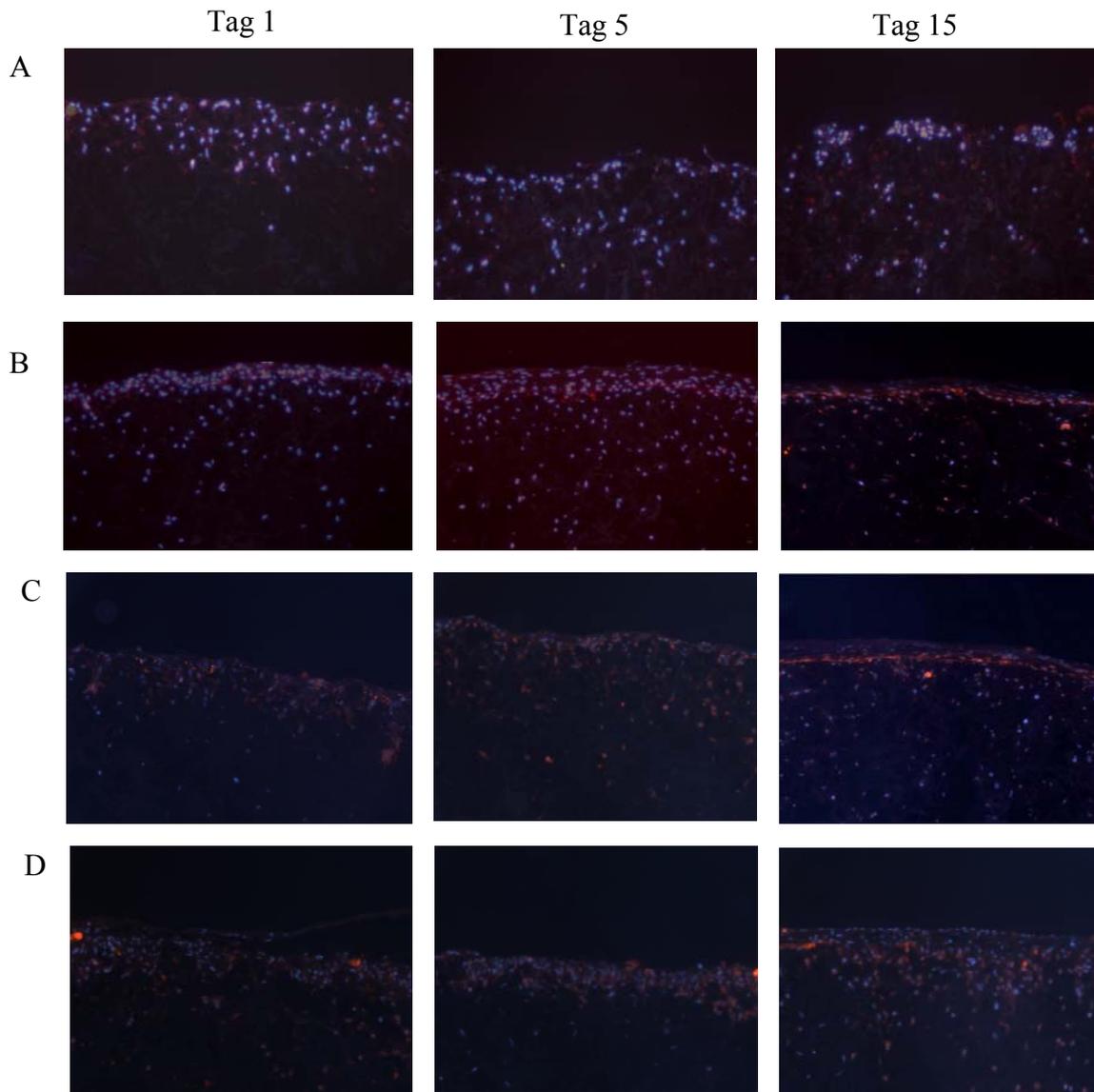


Abbildung 33: Nachweis von Laminin-5 in einer strukturierten Basallamina. (A) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten ohne Fibroblastenvorbesiedelung: diffuse Zeit-unabhängige Verteilung der Lamin-5-Färbung in der Keratinozytenschicht. (B) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach Fibroblastenbesiedelung: die strukturierte Akkumulation der Laminin-5-Färbung im Grenzbereich zwischen Keratinozyten und Fibroblasten indiziert eine zeitabhängige Ausbildung einer Basallamina zwischen Keratinozyten und Fibroblasten. (C) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten nach MF- und PMF-Zellenbesiedelung: die strukturierte Akkumulation der Laminin-5-Färbung im Grenzbereich zwischen Keratinozyten und MF- und PMF-Zellen indiziert eine zeitabhängige Ausbildung einer Basallamina zwischen Keratinozyten und Fibroblasten. (D) MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten mit postmitotischen

Fibrozytenvorbesiedelung: diffuse Zeit-unabhängige Verteilung der Laminin-5-Färbung. DAPI: Blaufärbung; Laminin-5: Rotfärbung. (Vergrößerung x 6,25)

Die Expression von Laminin-5 bei MatriDerm mit aufgesiedelten Keratinozyten ohne oder mit verschiedenen Fibroblastenvorbesiedelungen zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Expression von Kollagen IV. Die Neubildung einer Basalmembran auf MatriDerm, welches mit Progenitorfibroblasten bzw. einer Mischung von Progenitorfibroblasten und Fibrozyten in Verhältnis 2:1 vorbesiedelt wurde, konnte somit sowohl mittels Kollagen IV als auch mittels Laminin-5 Färbungen nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Die Behandlung chronischer Wunden der Haut ist bis heute ein großes medizinisches und auch ein sozioökonomisches Problem, da es bisher keine Therapieformen gibt, die länger wirksam sein können. Für die Behandlung chronischer Wunden werden oft autologe Hauttransplantationen durchgeführt. Diese Methode erfordert aber einen sehr großen Zeitaufwand, nicht nur durch die Vorbereitung des geschädigten Wundgrundes für die Transplantation, sondern auch für die Wundversorgung nach Transplantation. Das Tissue-Engineering-Verfahren bietet hier interessante Alternativen. So wird seit längerem schon versucht, vitale (d.h. zellbesiedelte) oder auch avitale biokompatible Kollagen-Matrices als Hautersatz für die Therapie chronischer Wunden zu verwenden. Dabei werden derzeit im Wesentlichen allogene Verfahren mit verschiedenen zellbesiedelten Trägern, z.B. Dermagraft oder Apligraf – wie in der Einleitung besprochen – bevorzugt, da sie grundsätzlich das Bleiben in der Wunde ermöglichen können. Somit könnte ein länger dauernder Wundverschluss bzw. eine Regeneration/Reparatur möglich sein.

Bisher hatte man zellbesiedelte 3-dimensionale biokompatible Trägersysteme verwendet, die entweder nur die dermale Komponente durch Besiedelung mit allogenen neonatalen, humanen Vorhautfibroblasten (Dermagraft) oder - wie im Falle von Apligraf - sowohl die epidermale als auch die dermale Komponente durch Besiedelung mit allogenen, neonatalen, humanen Keratinozyten und Fibroblasten der Vorhaut hatten. Da für diese Systeme für die Trägerbesiedelung gebrauchten, allogenen Zellen kryokonserviert vorgehalten werden, zeigen beide Systeme bzgl. Zellvitalität und damit bzgl. Heilungserfolg deutliche Nachteile (Supp and Boyce, 2005). Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene 3-dimensionale MatriDerm-System, das mit spezifischen Differenzierungsstadien von Progenitorfibroblasten und Funktionsfibrozyten vorbesiedelt ist, scheint gegenüber den herkömmlichen Systemen entscheidende Vorteile zu haben. Diese betreffen im Wesentlichen folgende Aspekte:

1. die gewebespezifische, in vivo-relevante Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten durch Wechselwirkung mit Progenitorfibroblasten- bzw. Fibrozyten-Differenzierungstypen
2. Ausbildung eines strukturierten epidermalen und dermalen Kompartiments mit histologisch funktioneller Basallamina im Sinne einer organotypischen Rekonstruktion
3. potentiell dauerhafte Geweberemodellierung durch in vivo adäquate zelluläre Homöostase

Im Folgenden sollen diese Aspekte durch die vorgelegten Ergebnisse im Vergleich zu vorhandenen Literaturdaten diskutiert werden.

4.1 Beeinflussung der Keratinozyten-Proliferation durch Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten im 2-dimensionalen Kultursystem

4.1.1 Monokultursystem

Wie in der Literatur oft beschrieben, ist die *in vitro* Proliferation von humanen Keratinozyten, wenn man vergleicht zu verschiedenen anderen Zellsystemen, z.B. Fibroblasten, extrem von den spezifischen Kulturbedingungen abhängig (Maciag et al., 1981). So ist bekannt, dass eine hohe für andere Zellen erforderliche Konzentration von Kalziumionen und auch Serumfaktoren die Proliferation von Keratinozyten beeinträchtigt bzw. eine direkte terminale Differenzierung zu postmitotischen Keratinozyten verursacht (Shipley et al., 1986). Für die Fragestellungen, die in dieser Doktorarbeit zu beantworten sind, ob unter 2- bzw. 3-dimensionalen Kulturbedingungen das *in vitro* Proliferationsverhalten von Keratinozyten durch Fibroblasten / Fibrozyten beeinflusst wird, war es deshalb nötig, erst im Monokultursystem und dann im Kokultursystem die optimalen Mediumbedingungen für beide Zellsysteme zu ermitteln. Darüber hinaus wurde dann die Frage beantwortet, ob unterschiedliche Differenzierungsstadien von Progenitorfibroblasten (MF) und Funktionsfibrozyten (PMF) bzw. eine *in vivo* relevante Mischung dieser beiden Zelltypen, unterschiedliche Effekte auf die Proliferation von Keratinozyten ausüben.

Wie erwartet wurde, zeigten teilungsaktive Progenitorfibroblasten-Populationen bei Fibroblasten standardisierten Mediumbedingungen (DMEM+10% FCS) wie in der Literatur beschrieben (Bayreuther et al., 1988b) das beste Wachstumsverhalten. Serumentzug oder Kultivierung in Keratinozyten-spezifischem serumfreiem SFM-Medium hatte einen sofortigen Teilungsstopp zur Folge. Überraschend und erstmalig konnte in dieser Arbeit beschrieben werden, dass Progenitorfibroblasten mit einer 2:1 Mischung aus serumfreiem Keratinozyten-Medium (SFM) und serumfreiem DMEM ein fast gleich gutes Proliferations- bzw. Koloniebildungsverhalten zeigten wie unter dem Fibroblasten-spezifischen DMEM+10% FCS.

Für die immortalisierte humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT konnte - wie in der Literatur beschrieben (Boukamp et al., 1988) - bestätigt werden, dass diese Zelllinie im Gegensatz zu

primären humanen Keratinozyten in dem Fibroblasten-spezifischen Medium+10% FCS proliferieren kann. Diese Proliferation war allerdings deutlich besser, wenn die HaCaT-Zellen in der 2:1 Mischung aus SFM und DMEM in Gegenwart von 10 % FCS kultiviert wurden. Dem Gegenüber zeigen frisch isolierte, primäre humane Keratinozyten – wie aufgrund der Literaturdaten zu erwarten war (Pittelkow et al., 1993) – in DMEM+10% FCS keinerlei Proliferationsaktivität, sondern differenzieren sofort in irreversibel postmitotische Keratinozyten (Ergebnisse nicht dargestellt). Unter dem Keratinozyten-spezifischen, serumfreien Wachstumsmedium SFM bzw. auch unter der 2:1 Mischung aus serumfreien SFM und DMEM ist ein beinahe gleichartig stabiles Wachstum der primären Keratinozyten zu beobachten (s. Abb. 11). Speziell dieses Ergebnis war für die weitere Vorgehensweise im Rahmen dieser Doktorarbeit extrem wichtig, da die direkten zellulären Wechselwirkungen von Keratinozyten und Fibroblasten nur mit Verwendung eines für beide Zellsysteme geeigneten Wachstumsmediums in 2- bzw. 3-dimensionalen Kokultursystemen analysiert werden konnten.

4.1.2 Kokultursystem

Im Kokultursystem von Fibroblasten mit Keratinozyten wurde nach der Bestimmung des optimalen Wachstumsmediums für beide Zelltypen getestet, wie die gegenseitige Beeinflussung des Proliferationsverhaltens ist. Hierzu wurde zunächst das Proliferationsverhalten von teilungsaktiven Progenitorfibroblasten analysiert als Funktion der Kokultur mit den immortalisierten HaCaT-Keratinozyten. Überraschenderweise konnte hier zum ersten Mal festgestellt werden, dass die Proliferationsaktivität von Progenitorfibroblasten deutlich durch die Kokultur mit HaCaT-Keratinozyten gesteigert werden konnte (s. Abb. 12). Auffallend war dabei, dass bei der gleichen Ausgangszelldichte die Fibroblasten als Monokultur nach ca. 9 Tagen die stationäre Phase erreichen, während sie in Kokultur mit HaCaT-Zellen bis zum Tag 15 ein deutlich logarithmisches Wachstum zeigen. Diese Ergebnisse, die bisher in der Literatur nicht beschrieben sind, sprechen dafür, dass immortalisierte HaCaT-Keratinozyten Wachstumsfaktoren produzieren, die die Proliferation von Progenitorfibroblasten stark fördern. Da dieser HaCaT-zellspezifische, interessante zellbiologische Aspekt jedoch nicht zur Ausgangsfragestellung gehörte, wurde er bei der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt, kann aber der Ausgangspunkt für eine HaCaT-zellspezifische Studie sein.

Im Zusammenhang der Arbeit und des Gesamtprojekts war die entscheidendere Fragestellung, wie unterschiedlich differenzierte Fibroblasten bzw. Fibrozytenpopulationen das Proliferationsverhalten von Keratinozyten beeinflussen können. Diese Fragestellung ergab sich aus Erkenntnissen der Fibroblastenbiologie (Bay et al., 1992; Begg et al., 1993; Rodemann et al., 1989; Toussaint et al., 2000), die aufzeigen konnten, dass das Fibroblastenzellsystem in vivo und in vitro ein differenzierendes Zellsystem ist, das in zwei Zellkompartimente aufgeteilt werden kann:

das potentiell teilungsaktive und regenerative Zellkompartiment der MF-Progenitorfibroblasten

das Kompartiment der irreversibel teilungsinaktiven und postmitotischen PMF-Funktionsfibrozyten

In den angesprochenen Arbeiten konnte im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Hayflick, 1979; Lipetz and Cristofalo, 1972; Schneider et al., 1981) gezeigt werden, dass Fibroblasten aus Hautbiopsien von adulten Spendern nach Ablauf ihrer maximalen Zellteilungskapazität von ca. 50-60 Populationsverdoppelungen nicht als so genannte seneszente Zellen absterben, sondern in ein terminal differenziertes Funktionsstadium, die so genannten Funktionsfibrozyten übergehen, die die für Fibroblasten spezifischen Syntheseleistungen, z.B. in Bezug auf spezifische Wachstums- und Differenzierungs-Faktoren bzw. extrazelluläre Matrixkomponenten, auf hohem Niveau und spezifisch ausüben (Rodemann and Bayreuther, 1986).

Das teilungsaktive und regenerative Progenitorfibroblasten-Kompartiment besteht aus den Zelltypen MF I, MFII und MFIII für die – wie bereits in der Einleitung besprochen – eine zelltypspezifische maximale Zellteilungsrate bestimmt werden konnte. Nach diesem Ablauf differenziert der jeweilige Progenitorfibroblast in den nächst höheren Zelltyp (Bay et al., 1992; Herskind and Rodemann, 2000; Lara et al., 1996; Rodemann et al., 1991a). Die zu beobachtenden, maximalen Zellteilungsrate für die drei Differenzierungstypen ergeben insgesamt die für Fibroblastenpopulationen schon früher beschriebene maximale Zellteilungskapazität von ca. 50-60 Zellteilungen (Hayflick and Moorhead, 1961). Nach Auslaufen der Zellteilungskapazität im Progenitorfibroblastentyp MFIII differenziert dieser spontan in einen irreversibel postmitotischen Fibrozyten PMF und geht damit in das Funktionskompartiment des Fibroblastenzellsystems über. Die terminal differenzierten PMF-

Zellen exprimieren im Gegensatz zu Progenitorfibroblasten den Differenzierungsmarker SA- β -Gal (Dimri et al., 1995; Hakenjos et al., 2000) und sind durch eine spezifische hohe Syntheseleistung für Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren wie z.B. TGF- β sowie für die interstitiellen extrazellulären Matrixproteine, wie z.B. Kollagen Typ I, III und V charakterisiert (Hakenjos et al., 2000; Herskind and Rodemann, 2000; Lara et al., 1996; Mollenhauer and Bayreuther, 1986; Von Pfeil et al., 2002).

Durch diese spezifischen zell- und molekularbiologischen Erkenntnisse zur Biologie des Fibroblastensystems wurden in der vorliegenden Arbeit Testsysteme entwickelt. Anhand dieser wurden die zellulären Wechselwirkungen von Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten mit Keratinozyten im Sinne der Proliferations- und Differenzierungsbeeinflussung in 2- und 3-dimensionalen Kokultursystemen in vitro untersucht. Hierzu wurden Hautfibroblasten der Differenzierungsstadien MF-Progenitorfibroblasten bzw. terminal differenzierter postmitotischen Funktionsfibrozyten selektiv nach etablierten Methoden angereichert (Rodemann and Muller, 1991) und in Kokultur mit HaCaT-Zellen einerseits bzw. primären Keratinozyten andererseits gebracht. Die dargestellten Ergebnisse der Abbildungen 13 und 14 zeigen deutlich differentielle Unterschiede in der Verhaltensweise von HaCaT-Zellen und primären Keratinozyten, was ihr Proliferationsverhalten in Kokultur mit unterschiedlich differenzierten Fibroblasten bzw. Fibrozytenpopulationen von 3 unterschiedlichen Spendern betrifft. Das Proliferationsverhalten von immortalisierten HaCaT-Zellen wird durch die Kokultur mit MF-Progenitorfibroblasten, PMF-Funktionsfibrozyten bzw. einer 2:1 Mischung aus MF und PMF Zellen zwar deutlich gegenüber der HaCaT-Monokultur gesteigert, wesentliche Unterschiede durch den jeweiligen Differenzierungszustand des Kokulturpartners sind aber nicht zu erkennen.

Im Gegensatz dazu zeigen die primären Keratinozyten auf individueller Basis der drei Fibroblastenzellstämme zwar deutliche Unterschiede bei der Funktion des Differenzierungszustandes des Fibroblasten / Fibrozytenkokulturpartners. Die zusammengefassten Daten der drei verwendeten Fibroblastenzellstämme lassen aber deutlich erkennen, dass das Fibroblasten/Fibrozyten-Kokultursystem, das aus einer 2:1 Mischung aus MF:PMF Zellen besteht, auch bei der statistischen Auswertung die stabilste Proliferationssteigerung in den primären Keratinozyten bedingt. Sowohl reine MF- als auch reine PMF-Kulturen als Kokulturpartner zeigen nur in der Tendenz eine Steigerung der Keratinozytenproliferation über 15 Tage. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass das in vivo

relevante 2:1 Verhältnis von MF-Progenitorfibroblasten zu PMF-Funktionsfibrozyten funktionelle Parameter der Keratinozyten – wie hier zumindest hinsichtlich Proliferation gezeigt – stark unterstützt. Diese Ergebnisse unterstützen auch frühere Forderungen und Untersuchungen zur akzessorischen Funktion des Fibroblasten/Fibrozytenzellensystem in vivo (Herskind and Rodemann, 2000).

4.2 Expression Keratinozyten-relevanter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren durch Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten

Schon länger ist bekannt, dass Fibroblasten für das Keratinozytensystem wichtige Wachstums- und Differenzierungsfaktoren produzieren. Beispiele dafür sind der Keratinozytenwachstumsfaktor KGF (*Keratinocyte Growth Factor*) und der Transforming Growth Factor TGF- β , der die Differenzierung zu postmitotischen Keratinozyten induziert (Gilchrest et al., 1984). Damit wurde in der vorliegenden Arbeit die Produktionsleistung von MF-Progenitorfibroblasten und PMF-Funktionsfibrozyten unter verschiedenen Kulturbedingungen mittels RealTime-PCR und ELISA-Technologie analysiert. Im direkten Vergleich der KGF-Genexpression auf mRNA-Ebene erkennt man, dass PMF-Funktionsfibrozyten ca. 3-4-mal mehr KGF-mRNA pro Zelle bilden als MF Progenitorfibroblasten (s. Abb. 16). Dieses Ergebnis wird auch durch die ELISA-Untersuchungen auf KGF-Proteinebene (s. Abb. 17) in der vorliegenden Arbeit und auch in einer parallel durchgeführten Doktorarbeit (Sonja Nolte, Dissertation, Fakultät f. Biologie, Univ. Tübingen, März 2007), bei der u.a. die einzelnen Differenzierungsstadien von MF-Progenitorfibroblasten (MFI, MFII, MFIII) mit PMF-Fibrozyten verglichen wurden, bestätigt.

Diese Ergebnisse der Differenzierungstyp-abhängigen KGF-Produktion in MF-Progenitorfibroblasten und PMF-Fibrozyten ergänzen die bisherige Datenlage zur Fibroblasten-spezifischen KGF-Produktion stark, die im Wesentlichen von der AG von Barbara Gilchrest gemacht wurde (Finch and Rubin, 2004). Weiter weisen diese Daten auf die Funktionsspezifität im Fibroblasten-Fibrozytenzellensystem hin, durch den ein wesentlicher Einfluss auf die Funktionsweise benachbarter Zellsysteme genommen wird (Rodemann and Blaese 2007). Dieser Aspekt wird auch durch frühere Untersuchungen zur differenzierungsabhängigen TGF- β -Produktion im Fibroblasten-Fibrozytenzellensystem gefestigt. Terminal differenzierte Funktionsfibrozyten produzieren ebenfalls ca. 2-3x mehr TGF- β als MF-Progenitorfibroblasten (Hakenjos et al., 2000; von Pfeil et al., 2002). Diese

Befunde machen deutlich, dass die Differenzierungstyp-spezifische Produktionsleistung des Fibroblasten/Fibrozytenzellsystems bzgl. KGF und TGF- β entscheidenden Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Keratinozyten ausüben kann. Die in der vorliegenden Arbeit dafür dargestellten Ergebnisse bzgl. KGF und die Untersuchungen zur TGF- β -Produktion (Hakenjos et al., 2000) mit Funktion des Fibroblasten/Fibrozyten-Differenzierungsgrades lassen insgesamt erkennen, dass unter dem in vivo relevanten 2:1 MF:PMF Verhältnis eine ausgewogene Balance bzgl. der Produktion von für Keratinozyten entscheidenden Wachstums- und Differenzierungs-induzierender Faktoren gegeben ist, die im Sinne der epithelialen-mesenchymalen Interaktion bei der Proliferation und Differenzierung epidermalen Keratinozyten in der Haut eine entscheidende Rolle spielen.

Diese epitheliale-mesenchymale Interaktion während des Wachstums und der Differenzierung der Keratinozyten ist schematisch in Abbildung 34 dargestellt.

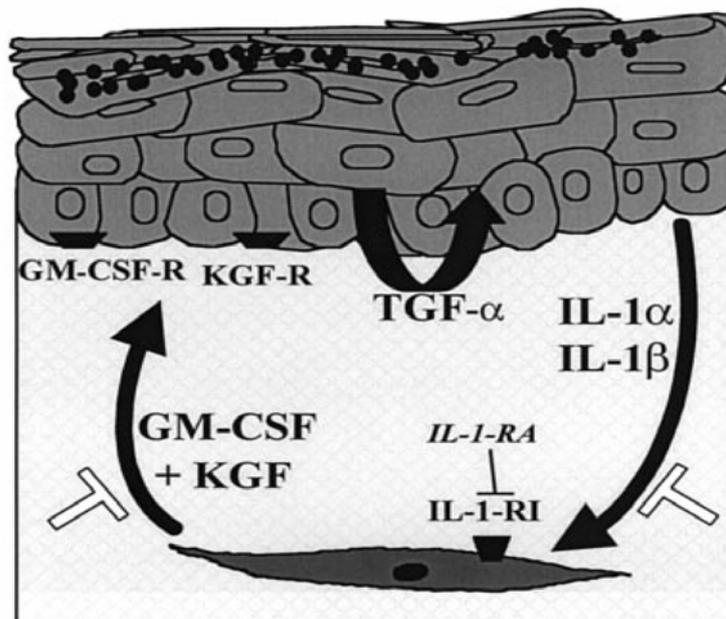


Abbildung 34: Epitheliale-mesenchymale Interaktion des Wachstum und der Differenzierung der Keratinozyten (Maas-Szabowski et al. 2001)

IL-1 induziert neben der KGF-Produktion durch Fibroblasten auch deren Syntheseleistung für GM-CSF und GM-CSF ist ebenso wie KGF eine Stimulator der Keratinozytenproliferation (Maas-Szabowski et al., 2001). Allerdings konnte von diesen Autoren anhand von *c-jun*^{-/-} Mäusen, die eine Defizienz für die Produktion von KGF und GM-CSF aufweisen, gezeigt werden, dass KGF und GM-CSF nicht die einzigen von Fibroblasten produzierten Faktoren

sind, die stimulierenden Effekte auf die Proliferation von Keratinozyten auszuüben scheinen. Zudem wurde in einer weiteren Studie von Guo *et al.* gezeigt, dass KGF-Knockout-Mäuse keine Missbildung bei epidermale Wachstum oder Wundheilung aufweisen (Guo *et al.*, 1996). Dementsprechend kann postuliert werden, dass durch das Fibroblastenzellsystem und hierbei – wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt – durch Funktionsfibrozyten produzierte Wachstumsfaktoren, wie z.B. KGF, entscheidend das Proliferationsverhalten von Keratinozyten beeinflussen und somit auch maßgeblich den epidermalen Wundheilungsprozess mitbestimmen.

4.3 Wachstumsverhalten von Keratinozyten und Fibroblasten/Fibrozyten unter 3-dimensionalen Kulturbedingungen in MatriDerm

Für die Generierung zellbesiedelter Composites wurde in dieser Studie das klinisch zugelassene, biokompatible und in vivo degradierbare Produkt MatriDerm (Collagen-Elastin) von der Dr. Suwelack Skin & Health Care AG verwendet: Die vorwiegenden Bestandteile sind Kollagen I und 3 % Elastin. MatriDerm ist ein bovines Kollagen-Elastin-Gemisch (97 % Kollagen Typ I und 3 % Elastin), das nach Entfernen der Begleitstoffe keine Antigene beinhaltet und somit keine zytotoxischen Effekte bzw. Immunreaktionen verursacht. Als Biomaterial hat MatriDerm sehr viele Vorteile bzgl. Zugfestigkeit, Wasserbindungskapazität und Flexibilität. Für die Untersuchungen wurde MatriDerm in 9 Schichten mit einer Schichtdicke von 2 mm aufgespaltet. Diese einzelnen Spalte wurden zur Sterilisation mit einer Dosis von 20 kGy Röntgenstrahlung bestrahlt. Aufgrund des Herstellungsprozesses variieren die Porengrößen des MatriDerms in horizontaler Richtung zwischen 7 und 178 µm.

Die Besiedelung von MatriDerm ist durch Fibroblasten bzw. humane Keratinozyten fast in gleicher Weise möglich, wenn auch bzgl. der Proliferationsrate und -Kinetik auf MatriDerm zwischen den beiden Zellsystemen in Abhängigkeit von der Aussaatdichte Unterschiede zu beobachten waren. Wie aus den hierzu durchgeführten zellbiologischen Analysen anhand von sekundären bzw. primären Fibroblasten- bzw. Keratinozytenkulturen hervorgeht, ist MatriDerm für beide Zellsysteme ein effizientes und funktionsfähiges Adhäsions-, Proliferations- und Migrationssubstrat. Diese Untersuchungen sind im Einklang mit 2006 publizierten Ergebnissen bzgl. der Besiedlungsfähigkeit mit Chondrozyten (Stark *et al.*, 2006). MatriDerm dient allerdings nicht nur in vitro Zellsuspensionen als gutes Adhäsions- und Proliferationssubstrat, sondern bietet vor allem auch den aus Spalthautbiopsate auswandernden humanen in vivo Keratinozyten als ein sehr gutes Substrat, welches nicht nur

die Proliferation an der Oberfläche, sondern auch die Tiefenmigration der ausgewanderten Keratinozyten unterstützt. Dies konnte anhand von MatriDerm sowohl ohne als auch mit Fibroblasten-Vorbesiedelung festgestellt werden. Ohne Vorbesiedelung mit Fibroblasten erfolgt sowohl Oberflächenproliferation als auch Tiefenwanderung der Keratinozyten; mit Fibroblasten-Vorbesiedelung erfolgt nur eine geringe Tiefenwanderung, jedoch eine starke Oberflächenproliferation und –Migration. Die hierzu erhobenen Befunde sind schematisch in Abbildung 35 zusammengefasst. Wie in Abb. 35 dargestellt, scheinen die vor Spaltaufbringung in das MatriDerm eingesiedelten Fibroblasten eine „dermale Barriere“ zu bilden, durch die die Keratinozyten an der Tiefenwanderung gehindert werden. Somit ermöglicht das mit Fibroblasten vorbesiedelte MatriDerm eine organotypische Strukturgebung in einer größerflächigen Hautwunde.

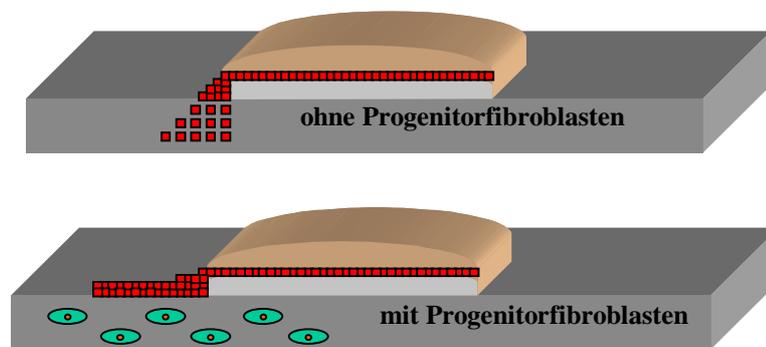


Abbildung 35: Schematische Darstellung des unterschiedlichen Auswachsens von Spalthaut-Keratinozyten auf MatriDerm-Träger mit und ohne Fibroblastenbesiedelung.

4.4 Aspekte der Wundheilung und die Bedeutung von Fibroblasten-/Fibrozyten-Differenzierungstypen

Wie in der Einleitung bereits angesprochen, läuft die Ausheilung von Hautwunden in drei aufeinanderfolgenden und von einander abhängigen Phasen ab (Clark 1993); diese sind:

1. die Entzündungsphase,
2. die Proliferationsphase
3. die Reifungsphase

Manche Autoren (Riede und Schäfer) unterteilen die Entzündungsphase in zwei Unterphasen, die exsudative Entzündungsphase und die resorptive Entzündungsphase, allerdings hat dies

keinen Einfluss auf die beiden entscheidenden Phasen der Proliferation und Reifung, die oft auch als reparative Phase bezeichnet wird (1995).

Obwohl die Fibroblasten der Dermis bereits seit langem als die „Schlüsselzellen“ der Wundheilung erkannt wurden, wurden erst in den letzten Jahren die Herkunft und phänotypischen Unterschiede der an den verschiedenen Phasen des Wundheilungsprozess beteiligten Fibroblastensubtypen identifiziert. In der Entzündungsphase kommt es zunächst zur Einwanderung von Leukozyten-ähnlichen peripheren Mononukleären Zellen (PMN) und Makrophagen in die Wunde. 1994 konnten Bucala et al. bereits aufzeigen, dass Fibroblasten, die aus zirkulierenden Progenitorzellen des Blutes stammen, sich in dem Wundbereich ansiedeln und etwa bis zu 10 % der in das Wundgebiet infiltrierenden Zellen darstellen (Bucala et al., 1994). Diese als Fibrozyten bezeichneten Zellen exprimieren sowohl haematopoietische wie auch mesenchymale Oberflächenmarker. Diese als Fibrozyten bezeichneten Zellen sind allerdings klar von dem in den früheren Arbeiten der AG Rodemann (1989, 1990, 1995, 1996, 2007) und den in der vorliegenden Arbeit als Fibrozyten bezeichneten, terminal differenzierten des Fibroblastenzellsystems. In der zellbiologischen Terminologie, die für praktisch alle Zellsysteme gilt, bezeichnet der Begriff „Zyt“ eine irreversibel teilungsunfähige Zelle. Demgegenüber wird der Begriff „Blast“ i.d.R. für teilungsfähige Zellen, u.U. auch mit Progenitorzellfunktion verwendet. Aufgrund ihrer biologischen Funktionsweise entsprechen die von Bucala et al. als Fibrozyten bezeichneten Zellen vermutlich eher den in der vorliegenden Arbeit als MF-Progenitorfibroblasten klassifizierten Zellen. Wie von Chesney et al. (Chesney et al., 1997) bzw. Yang et al. (Yang et al., 2005) beschrieben, sollen die Collagen und Vimentin positiven und CD34/CD 13/CD45 exprimierenden „Fibrozyten“ an dem normalen Wundheilungsprozess beteiligt sein und können möglicherweise auch an der Manifestation pathologischer Veränderungen, wie z.B. einem fibrotischen Gewebeumbau, oder einem hypertrophen Wundheilungsprozess beteiligt sein. Allerdings spricht auch diese Funktion der von Bucala et al. ursprünglich als „Fibrozyten“ bezeichneten Zellen aufgrund der Notwendigkeit von Teilungsaktivität eher für den von Rodemann et al. (1989, 1990, 1995, 1996, 2007) beschriebenen und als MF-Progenitor-Fibroblasten bezeichneten Zelltyp.

Wie oben diskutiert, produzieren postmitotische Fibrozyten mehr Struktur- und Funktionsproteine als mitotische Progenitorfibroblasten, was der Wundheilung zu Gute kommt. Vor dem Einsetzen der genetisch gesteuerten Apoptose können PMF-Zellen in vivo

oder in vitro mindestens 1 Jahr persistieren und auf hohem Niveau extrazelluläre Matrixproteine sowie Wachstumsfaktoren, wie z.B. KGF, TGF- β oder VEGF produzieren (Coppe et al., 2006). Auch dies ist ein Indikator, dass PMF-Zellen in vivo für die Gewebehomeostase eine wichtige Rolle spielen. Somit kommt dem konstanten und altersunabhängigen Verhältnis MF:PMF=2:1 eine entscheidende Rolle, nicht bzgl. des Erhaltes der Regenerationsfähigkeit, sondern auch hinsichtlich der biochemischen Leistungsfähigkeit des Bindegewebes zu. Das konstante 2:1 Verhältnis von MF zu PMF beeinflusst den normalen Wundheilungsprozess günstig, indem zwei Aspekte die Regenerationsfähigkeit über MF-Progenitorfibroblasten und Wachstumsfaktorenproduktion über PMF-Funktionsfibrozyten vermittelt werden. So konnte Telomeraseaktivität sehr wahrscheinlich bedingt durch MF-Progenitorfibroblasten an der Spitze des Granulationsgewebes und erhöhte Expression von KGF durch terminal differenzierte Fibrozyten nachgewiesen werden (Osanai et al., 2002). Dieses Zusammenspiel würde den Wundheilungsprozess deutlich begünstigen.

Für PMF-Funktionsfibrozyten ist allerdings auch beschrieben worden, dass sie nicht nur die o.g. Strukturproteine und Wachstumsfaktoren in erhöhter Menge gegenüber MF-Progenitorfibroblasten produzieren, sondern auch Matrix-Metalloproteinase (MMPs) (Dissertation Sonja Nolte, Fakultät f. Biologie Universität Tübingen, 2007). Allerdings spielt diese erhöhte Produktion von MMPs und damit eine erhöhte Matrix-degradierende Aktivität bei einem normalen MF:PMF-Verhältnis von 2:1 sehr wahrscheinlich keine Rolle. Vermutlich ist die erhöhte Aktivität erforderlich, um den gewebespezifischen Metabolismus von Matrixkomponenten aufrecht zu erhalten.

Eine pathophysiologische Störung des normalen MF:PMF=2:1 Verhältnisses zu Gunsten höherer Anteile von PMF-Zellen würde aber das metabolische Gleichgewicht des dermalen Bindegewebes durch die gesteigerte Produktion von MMPs deutlich stören. Dies konnte die Entstehung chronischer Wunden durch verstärkte katabole Prozesse massiv fördern. So zeigen z.B. primäre Fibroblastenpopulationen von diabetischen Patienten einen signifikant gesteigerten, höheren Anteil von PMF-Zellen, die deutlich das Verhältnis von 2:1 in Richtung 1: und 1:2 verändern (Morocutti et al., 1996). Diabetiker neigen allerdings auch zur Ausbildung von chronischen Wunden, den so genannten diabetischen Ulcera (Knighton et al., 1986). Dies lässt vermuten, dass das gestörte Verhältnis von MF zu PMF Zellen in Dermis von Diabetikern eine Ursache für die Manifestation einer chronischen Wunde sein kann.

Hierbei könnte die hohe Expression von MMPs durch PMF-Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Dies wird auch durch verschiedene Untersuchungen untermauert, die vermuten, dass eine katabole Störung in der dermalen Komponente das Einwandern von Wundrand-ständigen Keratinozyten in die Wunde dauerhaft verhindert, sodass kein Wundverschluss erfolgen kann.

4.5 Epithelialisierung im organotypischen MatriDerm-Träger

Vor diesem Hintergrund bilden die hier vorgestellten Untersuchungen zur Entwicklung eines rekonstruktiven Haut-Composites auf der Basis von zellbesiedelten 3D-Trägersystemen (z.B. MatriDerm) wesentliche Ansatzpunkte zur dauerhaften Ausheilung von chronischen Wunden. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die mit Fibroblasten und Keratinozyten besiedelten MatriDerm-Träger geeignet sind, die Ausbildung Dermis und Epidermis-äquivalenter Strukturen *in vitro* zu ermöglichen. Die hierzu in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen lassen vermuten, dass diese Strukturbildung auch unter *in vitro* Bedingungen möglich ist. So konnte in aufwendigen vergleichenden Analysen aufgezeigt werden, dass die Vorbesiedelung der MatriDerm-Träger mit reinen MF-Progenitorfibroblasten-Populationen bzw. mit einer 2:1-Mischung aus MF und PMF Zellen nach Aufbringung primärer humaner Keratinozyten innerhalb von 15 Tagen eine sehr gute, histologisch nachweisbare Epithelialisierung mit Ausbildung einer strukturierten Basallamina erlaubt. Beide Vorbesiedelungsalternativen führen bereits nach 5 Tagen nach Aussaat der Keratinozyten zu einer durch den Marker Cytokeratin erkennbaren, beginnenden Epithelschichtung, die nach 15 Tagen (Ende der Beobachtung) deutlich strukturiert vorhanden ist. Diese Epithelstrukturbildung lässt sich ebenfalls mittels des Stratifizierungsmarkers Involucrin nachweisen. Auch hier ist bereits nach 5 Tagen ein zwar geringgradiges, aber doch deutlich sichtbares Signal zu erkennen und nach 15 Tagen deutlich strukturiert ausgeprägt. Wurden die MatriDerm-Träger vor Aufsaat der primären Keratinozyten jedoch ausschließlich mit PMF-Fibrozyten vorbesiedelt, war sowohl mittels Cytokeratin als auch mittels Involucrin eine deutlich schwächere Epithelialisierung erkennbar. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass durch reine PMF-Populationen nicht nur ein hoher Spiegel an KGF, sondern auch ein hoher Spiegel an TGF- β in dem MatriDerm-System aufrechterhalten wird. Da TGF- β ein starker Inhibitor der Keratinozytenproliferation ist, ist die mangelhafte Epithelialisierung für die Differenzierungsteilung der Keratinozyten sehr wahrscheinlich dadurch bedingt.

Die Analyse der Ausbildung von Basallaminastrukturen mittels der Marker Kollagen Typ IV und Laminin-5 bestätigt im Wesentlichen die obigen beschriebenen Befunde. Die

Vorbesiedelung mit reinen MF-Progenitorfibroblasten bzw. mit einer 2:1 Mischung aus MF und PMF-Zellen ließ innerhalb der 15-tägigen Beobachtungszeit eine sehr gut erkennbare und strukturierte Basallamina als Trennschicht zwischen den dermalen Fibroblasten/Fibrozyten und epidermalen Keratinozyten erkennen. Spekuliert werden kann hier, ohne allerdings in der vorliegenden Studie eine statistische Untermauerung zu haben, dass die Ausbildung der Basallaminakomponenten möglicherweise nach Vorbesiedelung mit einer 2:1 Mischung aus MF und PMF-Zellen zeitlich schneller abläuft. Die Vorbesiedelung der MatriDerm-Träger mit reinen PMF-Fibrozyten ließ weder ein deutlich nachweisbares Signal für Kollagen Typ IV noch für Laminin-5 erkennen. Dies könnte vermutlich auch mit der von Sonja Nolte (Dissertation Sonja Nolte, Fakultät f. Biologie Universität Tübingen, 2007) beschriebenen hochgradigen Produktion von Matrix-Metalloproteinasen zu erklären sein und in Analogie zur chronischen Wunde in vivo mit der Ausbildung eines ähnlich katabolen biochemischen Milieus in dem hier untersuchten MatriDerm-System zu erklären sein.

Dementsprechend kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass die Epithelialisierung im Sinne der gerichteten Stratifizierung im Keratinozytensystem sowohl durch alle drei Vorbesiedelungsvarianten (MF, MF:PMF-2:1, PMF) induziert werden kann, wenn auch die Vorbesiedelung mit MF bzw. MF-PMF-2:1 Populationen gewisse Vorteile bietet. Dies bedeutet, dass für die Epithelialisierung des Keratinozytensystems zumindest für den Beobachtungszeitraum von 15 Tagen keine wesentlichen differentiellen Effekte als Funktion des vorbesiedelten Kokulturpartners ausgeübt werden. Im Gegensatz dazu scheint jedoch bezüglich der Ausbildung einer strukturierten Basallamina durchaus eine Abhängigkeit vom Zelltyp der vorbesiedelten Fibroblasten/Fibrozyten zu bestehen. Sowohl MF als auch eine MF:PMF-2:1 Mischung führt zu einer strukturierten Ausbildung der Basallamina, während eine Vorbesiedelung mit einer reinen PMF-Population keine Basallaminastrukturen erkennen lässt.

Die zu diesen Fragestellungen vorgestellten Ergebnisse stehen allerdings in einem Widerspruch zu kürzlich berichteten Ergebnissen von Föhn et al. (2006). Diese Arbeitsgruppe untersuchte ebenfalls die Epithelialisierung im Keratinozytensystem auf MatriDerm-Trägern nach Besiedelung der Träger mit humanen Keratinozyten und Fibroblasten. Im Gegensatz zu dem von uns verwendeten System zeigte sich in diesen Untersuchungen zwar eine räumliche Orientierung der beiden Zelltypen in der MatriDerm-Matrix, aber keine Ausbildung einer Epithelschicht innerhalb von 3 Wochen (Föhn et al. 2006). Sehr wahrscheinlich sind diese im

Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen mit deutlichen Differenzen auf zwei entscheidende experimentelle Unterschiede zurückzuführen. Zum einen wurden in der Arbeit von Föhn et al. (Föhn et al. 2006) keine spezifizierten Fibroblastenpopulationen eingesetzt, und es ist unklar, auf welchem Differenzierungsstand diese verwendet wurden. Zum anderen scheint keine Vorbesiedelung der MatriDerm-Träger mit den entsprechenden Fibroblasten erfolgt zu sein, sondern es wurde sehr wahrscheinlich eine zeitgleiche Besiedelung der Träger mit Keratinozyten und Fibroblasten gewählt. Entsprechend unserer Ergebnisse ist die Fibroblasten/Fibrozyten-Vorbesiedelung (5 Tage vor der Keratinozyten-Einsaat) allerdings ein entscheidender Aspekt. Hierdurch wird ermöglicht, dass das Fibroblasten/Fibrozyten-System nach Adhäsion und räumlicher Orientierung in die Lage versetzt wird, das MatriDerm-System mit den für die Keratinozyten wichtigen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (z.B. KGF, TGF- β u.a.) sowie Matrixproteinen (z.B. Fibronectin, Kollagen IV, Laminin) zu „beladen“. Dies führt zu einem die Keratinozyten-Proliferation und Differenzierung begünstigenden Mikromilieu, auf dessen Basis eine strukturierte Epithelialisierung erfolgen kann.

4.6 Vergleich des zellbesiedelten MatriDerm-Systems mit existenten avitalen bzw. vitalen Compositen

Die in den letzten Jahren unter regenerationsmedizinischen bzw. Tissue Engineering-Gesichtspunkten zur Behandlung chronischer Hautwunden hergestellten, verschiedenen Hautäquivalente haben bislang die in dieser Arbeit näher untersuchten, zellbiologischen Parameter des Fibroblasten/Fibrozytenzellensystem und seiner Wechselwirkung mit humanen Keratinozyten weitestgehend nicht berücksichtigt. Dementsprechend nutzen die kommerziell verfügbaren Produkte hoch proliferative Fibroblasten, die i.d.R. aus frühen Kulturpassagen von Vorhautfibroblasten (die meist von Phimosepatienten etabliert wurden) zur Herstellung von Hautäquivalenten. Dies beruht im Wesentlichen auf ersten Untersuchungen von Boyce et al. (Boyce et al., 1988), die zeigen konnten, dass eine mit Fibroblasten besiedelte Kollagen-Glucosaminoglykan-Matrix im Vergleich zu einer unbesiedelten Matrix die Proliferation von Keratinozyten nachhaltig unterstützt. Zusätzlich ist aus den grundsätzlichen Arbeiten von Rheinwald und Green (Rheinwald and Green, 1975) zur Routineetablierung von humanen Keratinozytenkulturen in vitro bekannt, dass die Adhäsion und Proliferation von primären Keratinozyten auf konventionellem Gewebekulturplastik nur dann erfolgreich abläuft, wenn als *feeder layer* durch Bestrahlung komplett teilungsinaktive und – wie von den Autoren so bezeichnet – „tote“ Fibroblasten verwendet wurden. Eingehende strahlenbiologische

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen konnten allerdings belegen, dass auch unter den von Rheinwal und Green verwendeten Dosen ionisierender Strahlung nur unwesentlich ein strahleninduzierter Zelltod, sondern überwiegend eine terminale Differenzierung von Progenitorfibroblasten in Funktionsfibrozyten induziert wird (Herskind and Rodemann, 2000; Lara et al., 1996; Niggli et al., 1989; Rodemann, 1989). Diese durch Strahlung induzierte Fibrozyten sind ebenso wie die durch spontane oder durch MMC-induzierte terminale Differenzierung entstandenen Funktionsfibrozyten (Rodemann et al. 1989; Hakenjos et al. 2000; Nolte et al. 2007) in der Lage, die für Keratinozyten wichtigen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren auf hohem Niveau zu synthetisieren (Hakenjos et al. 2000; von Pfeil et al. 2002; Nolte et al. 2007; Rodemann and Blaese 2007).

Diese grundlegenden Erkenntnisse zur Biologie des Keratinozyten- und des Fibroblastenzellsystems waren somit die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeiten gewählten Ansätze zur Optimierung von zellbesiedelten 3D-Trägern für die potentielle Verwendung als Hautäquivalent in der Regenerationsmedizin allgemein und speziell in der Therapie chronischer Wunden. Wie oben bereits erwähnt, sind für die Behandlung chronischer Wunden bislang hauptsächlich azelluläre bzw. mit undifferenzierten Fibroblasten besiedeltes Hautersatzgewebe verwendet worden. Bzgl. des Einsatzes und der Anwendung von azellulären Systeme gibt es eine Vielfalt von Arbeiten (Boyce, 2001; Kearney, 2001). In allen Arbeiten konnte zwar meist eine deutliche Wundkontraktion durch Auflage von azellulären Systemen (Sheridan et al., 1998; Wainwright, 1995), aber nie eine gewebespezifische Regeneration, insbesondere im dermalen Bereich beobachtet werden (Lamme et al., 2000). Dem gegenüber konnte von der Arbeitsgruppe um Middlekoop nachgewiesen werden, dass Fibroblasten-besiedelte Trägersysteme in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl zu einer deutlichen Verbesserung der Wundkontraktion führen können. Zudem war auch die Einwanderung von Fibroblasten des umgebenden Gewebes bei der Verwendung besiedelter Träger deutlich reduziert (Lamme et al., 1998).

Vor diesem Hintergrund sind derzeit vor allem zwei zellbesiedelte Trägersysteme von klinischem Interesse. Dies sind zum einen das Produkt Dermagraft und zum anderen das Produkt ApligrafTM (Bell et al., 1981; Cooper et al., 1991). DermagraftTM ist ein synthetischer, mit allogenen Vorhaut-Fibroblasten besiedelter biokompatibler Polylactin-Träger, während ApligrafTM ein mit allogenen Vorhaut-Fibroblasten und –Keratinozyten besiedelter Kollagen Träger ist (Supp and Boyce, 2005). Mit beiden Trägersystemen konnte

eine Stimulation der Ausheilung akuter Wunden erreicht werden und vereinzelt wurde auch für ApligrafTM eine Stimulation des Heilungsprozesses bei chronischer Wunden beschrieben (Curran and Plosker, 2002; Hanft and Surprenant, 2002; Marston et al., 2003). Inwiefern aber eine effektive dauerhafte Ausheilung bei chronischen Wunden damit zu erreichen ist, bleibt bislang offen. Zudem ist die Verwendung von allogenen Zellen (Fibroblasten und Keratinozyten) unter dem Aspekt einer Immunantwort und Abstoßungsreaktion des Empfängers immer noch problematisch. In jedem Falle ist aber zu diskutieren, dass die in diesen Studien verwendeten Systeme durch den Einsatz von entsprechend ihrer spezifischen Gewebefunktion nicht definierten Fibroblasten gegenüber dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen MatriDerm-System sehr wahrscheinlich deutliche Nachteile bzgl. nachhaltiger Unterstützung der Epithelialisierung *in vitro* und *in vivo* aufweisen. Ebenso ist zu berücksichtigen, dass sehr wahrscheinlich autologe Fibroblasten und Keratinozyten, so wie in dem Gesamtprojekt der AG Rodemann als Zielrichtung verfolgt, nicht nur aufgrund der auszuschließenden Immun- bzw. Abstoßungsreaktionen, sondern insbesondere aufgrund ihrer autologen physiologischen Spezifität für die Herstellung zellbesiedelter Trägersysteme zu bevorzugen sind. Diese Annahme wird z.T. durch Studien der Arbeitsgruppe von Steven Boyce (Boyce et al., 1995; Boyce et al., 2000; Hansbrough et al., 1989) bestätigt, die zeigen konnten, dass die Verwendung von autologen Fibroblasten und Keratinozyten für zellbesiedelte Hautäquivalente zumindest bzgl. des Heilungsprozesses von Verbrennungswunden Vorteile bieten.

Ein Vergleich der bereits klinisch verfügbaren Trägersysteme und dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten, zellbesiedeltem MatriDerm-System kann derzeit nur bzgl. der Ergebnisse *in vitro* gemacht werden. Dies zeigt jedoch, dass aufgrund der in der vorliegenden Arbeit verwendeten, spezifisch differenzierten MF-Progenitorfibroblasten bzw. einer *in vivo*-relevanten 2:1 Mischung aus MF-Progenitorfibroblasten und Funktionsfibrozyten sehr wahrscheinlich deutliche Vorteile gegeben sind. Diese betreffen die Ausbildung einer strukturierten Epithelialisierung mit durch eine Bassallamina getrennten, dermalen und epidermalen Komponenten in dem MatriDerm-Träger. Somit ist zu vermuten, dass die entsprechend optimierten zellbesiedelten MatriDerm-Träger bzw. die generelle Verwendung von Progenitorfibroblasten und Funktionsfibrozyten zusammen mit Keratinozyten eine effektives Einwachsen in die zu behandelnde Wunde und darüber hinaus einen anhaltenden Wundverschluss ermöglichen. Tierexperimentelle Studien zum Einwachsen der in der

vorliegenden Arbeit entwickelten und optimierten Trägersysteme wurden bereits begonnen, abschließende Ergebnisse liegen aber noch nicht vor.

4.7 Ausblick

Die Untersuchung in vitro an den mit unterschiedlichen Fibroblasten/Fibrozyten-Populationen vorbesiedelten MatriDerm-Trägern lassen erkennen, dass unter den optimierten Bedingungen zellbesiedelte MatriDerm-Composite sehr gute Voraussetzungen für den klinischen Einsatz zur Therapie von großen Hautwunden und insbesondere chronischen Wunden bieten können. Hierbei wäre noch zu prüfen, ob für die derartigen Applikationen die Verwendung von nur mit Progenitorfibroblasten bzw. einer 2:1 Mischung aus Progenitorfibroblasten und Funktionsfibrozyten vorbesiedelten Compositen bessere Ergebnisse bzgl. Einwachsen der Composite in den Wundbereich (dazu laufen derzeit noch Tierexperimente) als mit vergleichbaren bereits klinisch zur Verfügung stehenden Systemen erreicht werden können. Des Weiteren wäre zu prüfen, ob für den klinischen Einsatz die Verwendung von nur mit Progenitorfibroblasten/Funktionsfibrozyten bzw. von mit Progenitorfibroblasten/Funktionsfibrozyten und Keratinozyten vorbesiedelten Trägern die besseren Ergebnisse bzgl. Wundheilung bringen würde. Idealerweise sollten in jedem Falle hierbei autologe Zellen (Progenitorfibroblasten, Funktionsfibrozyten und Keratinozyten) verwendet werden, um immunologische Reaktionen ausschließen zu können.

Darüber hinaus können aufbauend auf die Ergebnisse dieser Dissertation wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussaktivitäten hinsichtlich weiterer Optimierung der vitalen Composites, z.B. durch Einbringung von Wachstumsfaktoren für mesenchymale Zellen bei der Produktion von MatriDerm sowie hinsichtlich der Indikationserweiterung, z.B. für großflächige Verbrennungswunden, fortgeführt werden.

Trotz der vorteilhaften Resultate mit den derzeit verfügbaren Hautersatz-Systemen gibt es Einschränkungen in Bezug auf Anatomie, Engraftment, Funktion und kosmetisches Resultat. Da die zur Zeit verfügbaren Hautersätze nur zwei Zelltypen (Keratinozyten und Fibroblasten) enthalten, können sie nicht alle Funktionen der ursprünglichen Haut ersetzen. In letzter Zeit hat man versucht, zusätzliche Zellarten mit Keratinozyten und Fibroblasten zusammen zu kultivieren, um die Homologie des Hautersatzes zu erhöhen und das funktionelle Resultat zu verbessern. Die zusätzliche Einbringung derartiger Zellen in das hier vorgestellte System würde u.U. zumindest kosmetisch bessere Ergebnisse erwarten lassen.

Auch könnten weiterführende Versuche die humanen embryonalen Stammzellen für die Entwicklung eines Hautersatzes mit einbeziehen. Humane embryonale Stammzellen bieten ein großes Potential für die Herstellung eines Hautersatzes und wecken große Hoffungen im Hinblick auf die Verwendung dieser Zellen zur Zelltherapie. So wurde in Studien von Ji *et al.* gezeigt (Ji *et al.*, 2006), dass die Differenzierung humaner embryonalen Stammzellen in Keratinozyten induziert werden kann. Weitere Untersuchungen haben zeigen können, dass Knochenmarkstammzellen der Maus zu epidermalen Keratinozyten, Talgdrüsenzellen, follikularen Zellen, dendritischen Zellen und endothelialen Zellen innerhalb von drei Wochen differenzieren können (Kataoka *et al.*, 2003). Unabhängig von politischen Vorgaben, eröffnen derartige Ansätze ein breites Anwendungsgebiet in der regenerativen Medizin.

5 Zusammenfassung

Die Behandlung chronischer Wunden stellt derzeit noch ein großes Problem in der Klinik dar. Verschiedene Hautersatz-Systeme stehen für unterschiedlichen Behandlungszwecke zur Verfügung. Aufgrund der biologischen Eigenschaften werden hierbei häufig Kollagenmatrizes mit oder ohne Zellbesiedelung für die Behandlung chronischer Wunden und/oder Verbrennungswunden verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene zellbiologische Ansätze zur Wechselwirkung von Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten mit primären Keratinozyten sowie zur Entwicklung eines optimierten zellbesiedelten 3D-Trägersystems für den biologische Hautersatz (Composite) auf ihr Funktionieren im Sinne der Ausbildung einer strukturierten Epithelialisierung unter in vitro Bedingungen überprüft. Als 3D-Träger wurde MatriDerm, ein Kollagen-Elastin Träger verwendet und nach Vorbesiedelung mit Progenitorfibroblasten, mit Funktionsfibrozyten, bzw. mit einer in vivo relevanten Mischung der beiden Zelltypen sowie Aufsaat von Keratinozyten hinsichtlich der Ausbildung eines histologisch strukturierten, organotypischen Hautäquivalents analysiert.

Die Analyse der Wechselwirkung von Fibroblasten und Keratinozytenpopulationen ergab, dass eine 2:1-Mischung aus SFM:DMEM-Wachstumsmedium ohne Serumzusatz für die Kultur sowohl der Keratinozyten als auch Progenitorfibroblasten verwenden kann und dass das Proliferationsverhalten von primären Keratinozyten signifikant von Funktionsfibrozyten unterstützt wird. Mittels realtime PCR bzw. ELISA-Technik konnte nachgewiesen werden, dass Funktionsfibrozyten im Vergleich mit Progenitorfibroblasten der entscheidende Zelltyp bzgl. der Produktion des Keratinozyten-Wachstumsfaktors KGF sind.

Bzgl. der optimierten Bedingungen zur Herstellung von zellbesiedelten 3D-Compositen konnte festgestellt werden, dass Keratinozyten auf einem mit reinen Progenitorfibroblasten oder einer Mischung aus Progenitorfibroblasten und postmitotischen Fibrozyten (2:1) besiedelten MatriDerm-Träger in vitro innerhalb von 15 Tagen eine normal strukturierte, differenzierte und funktionsfähige in einer luftexponierte 3D-Kulturbedingung ausbilden. Dies konnte mit dem Nachweis von Differenzierungsmarker wie Pan-cytokeratin und Involucrin für die Epithelialisierung bzw. Kollagen Typ IV und Laminin-5 für Basallamina-Strukturen nachgewiesen werden. Dementsprechend kann gefolgert werden, dass die Verwendung von Progenitorfibroblasten bzw. einer in vivo relevanten 2:1 Mischung von Progenitorfibroblasten

und Funktionsfibrozyten gegenüber herkömmlichen Systemen deutlich Vorteile in der Ausbildung eines organstypischen Hautäquivalents hat.

6 Literaturverzeichnis

- Aukhil, I. 2000. Biology of wound healing. *Periodontol* 2000. 22:44-50.
- Bay, B.H., K.H. Sit, K.P. Wong, Y.G. Chan, and A.S. Pang. 1992. Inducing macrophagic potentials in cultured human lung fibroblasts. *Kitasato Arch Exp Med*. 65:149-54.
- Bayreuther, K., H.P. Rodemann, P.I. Francz, and K. Maier. 1988a. Differentiation of fibroblast stem cells. *J Cell Sci Suppl*. 10:115-30.
- Bayreuther, K., H.P. Rodemann, R. Hommel, K. Dittmann, M. Albiez, and P.I. Francz. 1988b. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:5112-6.
- Begg, A.C., N.S. Russell, H. Knaken, and J.V. Lebesque. 1993. Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity in vitro with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol*. 64:393-405.
- Bell, E., H.P. Ehrlich, S. Sher, C. Merrill, R. Sarber, B. Hull, T. Nakatsuji, D. Church, and D.J. Buttle. 1981. Development and use of a living skin equivalent. *Plast Reconstr Surg*. 67:386-92.
- Boukamp, P., R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N.E. Fusenig. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*. 106:761-71.
- Boyce, S.T. 2001. Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes. *Burns*. 27:523-33.
- Boyce, S.T., D.J. Christianson, and J.F. Hansbrough. 1988. Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. *J Biomed Mater Res*. 22:939-57.
- Boyce, S.T., M.J. Goretsky, D.G. Greenhalgh, R.J. Kagan, M.T. Rieman, and G.D. Warden. 1995. Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. *Ann Surg*. 222:743-52.
- Boyce, S.T., A.P. Supp, R.R. Wickett, S.B. Hoath, and G.D. Warden. 2000. Assessment with the dermal torque meter of skin pliability after treatment of burns with cultured skin substitutes. *J Burn Care Rehabil*. 21:55-63.
- Bucala, R., L.A. Spiegel, J. Chesney, M. Hogan, and A. Cerami. 1994. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*. 1:71-81.
- Burke, J.F., I.V. Yannas, W.C. Quinby, Jr., C.C. Bondoc, and W.K. Jung. 1981. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*. 194:413-28.

- Castor, C.W., R.K. Prince, and E.L. Dorstewitz. 1962. Characteristics of human "fibroblasts" cultivated in vitro from different anatomical sites. *Lab Invest.* 11:703-13.
- Chesney, J., M. Bacher, A. Bender, and R. Bucala. 1997. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:6307-12.
- Clark, R.A. 1993. Basics of cutaneous wound repair. *J Dermatol Surg Oncol.* 19:693-706.
- Cooper, M.L., J.F. Hansbrough, R.L. Spielvogel, R. Cohen, R.L. Bartel, and G. Naughton. 1991. In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. *Biomaterials.* 12:243-8.
- Coppe, J.P., K. Kauser, J. Campisi, and C.M. Beausejour. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem.* 281:29568-74.
- Curran, M.P., and G.L. Plosker. 2002. Bilayered bioengineered skin substitute (Apligraf): a review of its use in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *BioDrugs.* 16:439-55.
- Dill-Muller, D., and W. Tilgen. 2005. [Established and current procedures in wound healing]. *Hautarzt.* 56:411-22.
- Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, and et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9363-7.
- Eckert, R.L., J.F. Crish, T. Efimova, S.R. Dashti, A. Deucher, F. Bone, G. Adhikary, G. Huang, R. Gopalakrishnan, and S. Balasubramanian. 2004. Regulation of involucrin gene expression. *J Invest Dermatol.* 123:13-22.
- El Ghalbzouri, A., E. Lamme, and M. Ponc. 2002. Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 310:189-99.
- Elkhal, A., L. Tunggal, and M. Aumailley. 2004. Fibroblasts contribute to the deposition of laminin 5 in the extracellular matrix. *Exp Cell Res.* 296:223-30.
- Finch, P.W., and J.S. Rubin. 2004. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair. *Adv Cancer Res.* 91:69-136.

- Finch, P.W., J.S. Rubin, T. Miki, D. Ron, and S.A. Aaronson. 1989. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*. 245:752-5.
- Fuchs, E., and D.W. Cleveland. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*. 279:514-9.
- Fusenig, N.E., A. Limat, H.J. Stark, and D. Breitkreutz. 1994. Modulation of the differentiated phenotype of keratinocytes of the hair follicle and from epidermis. *J Dermatol Sci*. 7 Suppl:S142-51.
- Gallico, G.G., 3rd, N.E. O'Connor, C.C. Compton, O. Kehinde, and H. Green. 1984. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med*. 311:448-51.
- Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science*. 285:1028-32.
- Gilchrest, B.A., W.L. Marshall, R.L. Karassik, R. Weinstein, and T. Maciag. 1984. Characterization and partial purification of keratinocyte growth factor from the hypothalamus. *J Cell Physiol*. 120:377-83.
- Grazul-Bilska, A.T., M.L. Johnson, J.J. Bilski, D.A. Redmer, L.P. Reynolds, A. Abdullah, and K.M. Abdullah. 2003. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc)*. 39:787-800.
- Guo, L., L. Degenstein, and E. Fuchs. 1996. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev*. 10:165-75.
- Hakenjos, L., M. Bamberg, and H.P. Rodemann. 2000. TGF-beta1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. *Int J Radiat Biol*. 76:503-9.
- Hanft, J.R., and M.S. Surprenant. 2002. Healing of chronic foot ulcers in diabetic patients treated with a human fibroblast-derived dermis. *J Foot Ankle Surg*. 41:291-9.
- Hansbrough, J.F., S.T. Boyce, M.L. Cooper, and T.J. Foreman. 1989. Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen-glycosaminoglycan substrate. *Jama*. 262:2125-30.
- Harding, K.G., K. Moore, and T.J. Phillips. 2005. Wound chronicity and fibroblast senescence - implications for treatment. *Int Wound J*. 2:364-8.
- Hayflick, L. 1979. The cell biology of aging. *J Invest Dermatol*. 73:8-14.
- Hayflick, L., and P.S. Moorhead. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25:585-621.

- Herskind, C., and H.P. Rodemann. 2000. Spontaneous and radiation-induced differentiation of fibroblasts. *Exp Gerontol.* 35:747-55.
- Ji, L., B.L. Allen-Hoffmann, J.J. de Pablo, and S.P. Palecek. 2006. Generation and differentiation of human embryonic stem cell-derived keratinocyte precursors. *Tissue Eng.* 12:665-79.
- Kataoka, K., R.J. Medina, T. Kageyama, M. Miyazaki, T. Yoshino, T. Makino, and N.H. Huh. 2003. Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin. *Am J Pathol.* 163:1227-31.
- Kearney, J.N. 2001. Clinical evaluation of skin substitutes. *Burns.* 27:545-51.
- Knighton, D.R., K.F. Ciresi, V.D. Fiegel, L.L. Austin, and E.L. Butler. 1986. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg.* 204:322-30.
- Lamme, E.N., R.T. Van Leeuwen, K. Brandsma, J. Van Marle, and E. Middelkoop. 2000. Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J Pathol.* 190:595-603.
- Lamme, E.N., R.T. van Leeuwen, A. Jonker, J. van Marle, and E. Middelkoop. 1998. Living skin substitutes: survival and function of fibroblasts seeded in a dermal substitute in experimental wounds. *J Invest Dermatol.* 111:989-95.
- Lara, P.C., N.S. Russell, I.J. Smolders, H. Bartelink, A.C. Begg, and J.M. Coco-Martin. 1996. Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen production. *Int J Radiat Biol.* 70:683-92.
- Limat, A., T. Hunziker, C. Boillat, K. Bayreuther, and F. Noser. 1989. Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 92:758-62.
- Lipetz, J., and V.J. Cristofalo. 1972. Ultrastructural changes accompanying the aging of human diploid cells in culture. *J Ultrastruct Res.* 39:43-56.
- Maas-Szabowski, N., A. Shimotoyodome, and N.E. Fusenig. 1999. Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J Cell Sci.* 112 (Pt 12):1843-53.
- Maas-Szabowski, N., H.J. Stark, and N.E. Fusenig. 2000. Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 114:1075-84.
- Maas-Szabowski, N., A. Szabowski, H.J. Stark, S. Andrecht, A. Kolbus, M. Schorpp-Kistner, P. Angel, and N.E. Fusenig. 2001. Organotypic cocultures with genetically modified

- mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *J Invest Dermatol.* 116:816-20.
- Maciag, T., R.E. Nemore, R. Weinstein, and B.A. Gilchrest. 1981. An endocrine approach to the control of epidermal growth: serum-free cultivation of human keratinocytes. *Science.* 211:1452-4.
- Marchese, C., M. Chedid, O.R. Dirsch, K.G. Csaky, F. Santanelli, C. Latini, W.J. LaRochelle, M.R. Torrisi, and S.A. Aaronson. 1995. Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in reepithelializing human skin. *J Exp Med.* 182:1369-76.
- Marston, W.A., J. Hanft, P. Norwood, and R. Pollak. 2003. The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care.* 26:1701-5.
- Mollenhauer, J., and K. Bayreuther. 1986. Donor-age-related changes in the morphology, growth potential, and collagen biosynthesis in rat fibroblast subpopulations in vitro. *Differentiation.* 32:165-72.
- Morocutti, A., K.A. Earle, M. Sethi, G. Piras, K. Pal, D. Richards, P. Rodemann, and G. Viberti. 1996. Premature senescence of skin fibroblasts from insulin-dependent diabetic patients with kidney disease. *Kidney Int.* 50:250-6.
- Niggli, H.J., K. Bayreuther, H.P. Rodemann, R. Rothlisberger, and P.I. Francz. 1989. Mitomycin C-induced postmitotic fibroblasts retain the capacity to repair pyrimidine photodimers formed after UV-irradiation. *Mutat Res.* 219:231-40.
- Nolte, Sonja. V., W.G. Xu, H.O. Rennekampff, H.P. Rodemann. 2007 Diversity of fibroblasts-implications for skin tissue Engineering. *Cell Tissue & Organs.* accepted pending revision.
- Nord, D. 2006. [Cost-effectiveness in wound care.]. *Zentralbl Chir.* 131 Suppl 1:185-8.
- O'Connor. 1981. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet.* 1:75-8.
- Osanai, M., T. Tamaki, M. Yonekawa, A. Kawamura, and N. Sawada. 2002. Transient increase in telomerase activity of proliferating fibroblasts and endothelial cells in granulation tissue of the human skin. *Wound Repair Regen.* 10:59-66.
- Paladini, R.D., K. Takahashi, N.S. Bravo, and P.A. Coulombe. 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. *J Cell Biol.* 132:381-97.

- Pittelkow, M.R., P.W. Cook, G.D. Shipley, R. Derynck, and R.J. Coffey, Jr. 1993. Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth Differ.* 4:513-21.
- Rheinwald, J.G., and H. Green. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 6:331-43.
- Rodemann, H.P. 1989. Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C (MMC)-induced postmitotic differentiation states in vitro. *Differentiation.* 42:37-43.
- Rodemann, H.P., and K. Bayreuther. 1986. Differential degradation of [35S]methionine polypeptides in Duchenne muscular dystrophy skin fibroblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:2086-90.
- Rodemann, H.P., K. Bayreuther, P.I. Francz, K. Dittmann, and M. Albiez. 1989. Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exp Cell Res.* 180:84-93.
- Rodemann, H.P., A. Binder, A. Burger, N. Guven, H. Loffler, and M. Bamberg. 1996. The underlying cellular mechanism of fibrosis. *Kidney Int Suppl.* 54:S32-6.
- Rodemann, H.P., and G.A. Muller. 1991. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis.* 17:684-6.
- Rodemann, H.P., G.A. Muller, A. Knecht, J.T. Norman, and L.G. Fine. 1991a. Fibroblasts of rabbit kidney in culture. I. Characterization and identification of cell-specific markers. *Am J Physiol.* 261:F283-91.
- Rodemann, H.P., H.P. Peterson, K. Schwenke, and K.H. von Wangenheim. 1991b. Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. *Scanning Microsc.* 5:1135-42; discussion 1142-3.
- Rodemann, H.P., M.A. Blaese. 2007. Responses of Normal Cells to Ionizing Radiation. *Seminar in Radiation Oncology* S81-88.
- Rousselle, P., D.R. Keene, F. Ruggiero, M.F. Champlaud, M. Rest, and R.E. Burgeson. 1997. Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol.* 138:719-28.
- Rubin, J.S., H. Osada, P.W. Finch, W.G. Taylor, S. Rudikoff, and S.A. Aaronson. 1989. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:802-6.
- Rzepka, K., G. Schaarschmidt, M. Nagler, and J. Wohlrab. 2005. [Epidermal stem cells]. *J Dtsch Dermatol Ges.* 3:962-73.

- Schneider, E.L., R. Monticone, J. Smith, K. Braunschweiger, and T. Roberts. 1981. Skin fibroblast cultures derived from members of the Baltimore longitudinal study: a new resource for studies of cellular aging. *Cytogenet Cell Genet.* 31:40-6.
- Schoop, V.M., N. Mirancea, and N.E. Fusenig. 1999. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 112:343-53.
- Schultz, G.S., R.G. Sibbald, V. Falanga, E.A. Ayello, C. Dowsett, K. Harding, M. Romanelli, M.C. Stacey, L. Teot, and W. Vanscheidt. 2003. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen.* 11 Suppl 1:S1-S28.
- Sheridan, R., R. Choucair, M. Donelan, M. Lydon, L. Petras, and R. Tompkins. 1998. Acellular allodermis in burns surgery: 1-year results of a pilot trial. *J Burn Care Rehabil.* 19:528-30.
- Shipley, G.D., M.R. Pittelkow, J.J. Wille, Jr., R.E. Scott, and H.L. Moses. 1986. Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium. *Cancer Res.* 46:2068-71.
- Smola, H., H.J. Stark, G. Thiekotter, N. Mirancea, T. Krieg, and N.E. Fusenig. 1998. Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp Cell Res.* 239:399-410.
- Stark, Y., K. Suck, C. Kasper, M. Wieland, M. van Griensven, and T. Scheper. 2006. Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. *Exp Toxicol Pathol.* 57:305-11.
- Supp, D.M., and S.T. Boyce. 2005. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin Dermatol.* 23:403-12.
- Tang, A., and B.A. Gilchrist. 1996. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 11:41-50.
- Toussaint, O., E.E. Medrano, and T. von Zglinicki. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol.* 35:927-45.
- Von Pfeil, A., L. Hakenjos, C. Herskind, K. Dittmann, M. Weller, and H.P. Rodemann. 2002. Irradiated homozygous TGF-beta1 knockout fibroblasts show enhanced clonogenic survival as compared with TGF-beta1 wild-type fibroblasts. *Int J Radiat Biol.* 78:331-9.
- Wainwright, D.J. 1995. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns.* 21:243-8.

- Watt, F.M. 1983. Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol.* 81:100s-3s.
- Watt, F.M., M.D. Kubler, N.A. Hotchin, L.J. Nicholson, and J.C. Adams. 1993. Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interactions. *J Cell Sci.* 106 (Pt 1):175-82.
- Werner, S., K.G. Peters, M.T. Longaker, F. Fuller-Pace, M.J. Banda, and L.T. Williams. 1992. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6896-900.
- Yang, L., P.G. Scott, C. Dodd, A. Medina, H. Jiao, H.A. Shankowsky, A. Ghahary, and E.E. Tredget. 2005. Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar. *Wound Repair Regen.* 13:398-404.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Peter Rodemann, Leiter der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung der Universitätsklinik für Radioonkologie, Tübingen, und Prof. Dr. H. Oliver Rennekampff, Oberarzt der Abteilung Hand-, Plastische-, Rekonstruktive und Verbrennungschirurgie der BG-Unfallklinik Tübingen, danke ich ganz herzlich für die Begutachtung und Betreuung meiner Doktorarbeit.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. Thomas Skutella, Direktor des Zentrums für Regenerationsbiologie und Regenerative Medizin, Leiter der Sektion Tissue Engineering des anatomischen Instituts der Universität Tübingen, verpflichtet, der meine Arbeit nachhaltig unterstützte.

Herrn Prof. Dr. Röcken, Ärztlicher Direktor an der Universitätshautklinik, danke ich ebenso.

H. Löffler, Dr. L. Santo-Höltje und Dr. O. Haase danke ich für die Einführung in die Zellkultur und Hilfe bei allen Fragen im Labor.

Bei allen Mitarbeitern in Tübingen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Der Firma Dr. Suwelack Skin & Health Care danke ich für die Bereitstellung des MatriDerm.