

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Norbert Kübler

**Charakterisierung von Kokultur-Modellen aus Keratinozyten  
und unrestringierten, somatischen Stammzellen aus  
Nabelschnurblut**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Miriam Faas  
2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Norbert Kübler

Zweitgutachterin: Priv.-Doz. Dr. med. Julia Kristin

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern.

## Zusammenfassung

Die Haut als schützendes Organ gegen Umwelteinflüsse und gleichzeitig stabilisierende Hülle für den Organismus ist durch die Exposition gegenüber ihrer Umgebung häufig von Verletzungen betroffen. Darüber hinaus führen auch Erkrankungen zur Beeinträchtigung der Funktionen, welche die Haut in einem gesunden Körper erfüllt. Gewebe des menschlichen Körpers sind Funktionseinheiten aus mehreren Zellarten, die in unterschiedlich zusammengesetzte extrazelluläre Matrices eingebettet sind. Auch die humane Haut ist aus einer Reihe von Schichten aufgebaut, die sich im Zusammenspiel ihrer Eigenschaften funktionell und strukturell ergänzen und auseinander hervorgehen.

Die Etablierung einer Kokultur verschiedener Zelllinien geht mit der Herausforderung einher, die Expressionsbeiträge von Genen, die untersucht werden sollen, jeweils einer der vorhandenen Zelllinien zuzuweisen. Der hier gewählte Ansatz war die Bestimmung dieser Beitragsanteile durch die Verwendung von Keratinozyten und USSCs unterschiedlichen Geschlechts. Um das Verhältnis der gleichbleibenden GAPDH-Expression des Gesamtextrakts zu einem ausschließlich in männlichen Zellen exprimierten Marker zugänglich zu machen, wurde die Ubiquitin-spezifische Peptidase 9, die auf dem Y-Chromosom codiert ist, (USP9Y) als konstitutiv exprimierter Marker gewählt. Es gelang der Nachweis, dass beide Zelllinien Beiträge aus ihrem aktiven Stoffwechsel liefern. Die quantitative Realtime PCR ist jedoch für eine Unterscheidung der Linien bei sehr ähnlichen Zellzahlen zur genauen Auflösung der Anteile nicht geeignet.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit die Expressionsmuster einer Kokultur aus Keratinozyten und USSCs im Hinblick auf die Verfügbarkeit verschiedener Signalproteine untersucht. Dabei wurden die USSCs sowohl als Suspensionskultur als auch in Mikromassenkonstrukten, also Zellagglomeraten aus 60.000 Zellen, jeweils zu einer zweidimensionalen subkonfluenten Kultur von Keratinozyten zugefügt. Es zeigte sich, dass sich die später zugegebenen USSCs jeweils in den freigebliebenen Arealen anheften konnten. Diese Areale wurden, lichtmikroskopisch sichtbar, nur von einer der beiden Linien als Wachstumsfläche genutzt. Von besonderem Interesse waren in der Untersuchung die Signalproteine TGF  $\beta$ 2, EGFR, IL1RN, AHNAK und TMEFF1. Hierfür wurden in quantitativen real time PCR-Experimenten die relativen Expressionsverhältnisse untersucht. Wie aus den Array-Analysen deutlich wurde, zeigte sich, dass in der Kokultur die Transkription sowohl der stammzelltypischen als auch der keratinozytentypischen Marker aufrechterhalten blieb. Auch ohne extrazelluläre Matrix, wie im hier untersuchten Kokulturansatz, bleiben die beiden Zelllinien vital. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob sowohl extrazelluläre Matrixmoleküle als auch andere Zellarten eine stabile Kokultur unterstützen.

## **Summary**

In its role as the main protective organ against environmental stress and at the same time as a stabilizing covering for the organism, the human skin is often affected by injuries as a consequence of its exposure to external influences. In addition, diseases also lead to an impairment of different functions which are normally assigned to skin in a healthy body. Human skin tissue consists of functional units comprising of several cell types which are embedded in extracellular matrices. The human skin is built from a set of layers which complement each other in functional as well as structural aspects and emerge from one another.

The establishment of cocultures consisting of different cell lines is connected to the task of assigning expressions of the genes of interest to a certain cell line within the total extract. In this work the approach to determine contributions to expression levels of different cell lines was to coculture keratinocytes and USSCs of different gender. In order to evaluate the ratio of expression levels from the housekeeping gene of glyceraldehyde dehydrogenase in the total extract in relation to a solely in male cells expressed marker was chosen. The ubiquitin-specific peptidase 9 which is encoded on the Y-chromosome (USP9Y) was detected in the quantitative real time polymerase chain reaction due to its constitutive expression in keratinocytes. Nonetheless this type of analysis is not suitable to determine the exact ratio of the different cell types when they are present in similar quantities.

In addition, expression patterns of a coculture consisting of keratinocytes and USSCs were investigated in this study. For these analyses USSCs were added either as a suspension culture or as micromass constructs to a twodimensional subconfluent keratinocyte culture. Micromass is a term which refers to cell agglomerates consisting of 60,000 cells in this study. As a result, from this mode of combining the cultures, the USSCs which had been introduced to the coculture adhered to the unoccupied areas and did not mingle with the keratinocytes as visible in phase contrast microscopy. Of special interest in the gene expression experiments were signaling proteins like transforming growth factor beta (TGF-beta). In quantitative real time PCR experiments relative expression levels were determined. From array analyses of cocultures the findings emerged that within cocultures transcriptions of stem cell as well as keratinocyte markers were continued. These results indicate that in the absence of extracellular matrix as provided in the conducted experiments both cell lines stay intact. Further studies should be carried out in order to determine whether extracellular matrix molecules as well as other cell types to be combined in a stable coculture may enhance tissue-like features.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>BMP</b>	<i>Bone morphogenetic protein</i>
<b>CaCl</b>	Calciumchlorid
<b>CD45</b>	<i>Cluster of Differentiation 45</i>
<b>cDNA</b>	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>DCs</b>	Dendritische Zellen
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>DPBS</b>	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ECM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>EGFR</b>	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
<b>EMT</b>	Epithelialer-mesenchymaler Übergang
<b>FCS</b>	Fötale Kälberserum
<b>g</b>	Erdschwerebeschleunigung: 9,81 m/s <sup>2</sup>
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HBV</b>	Hepatitis-B-Virus
<b>HCV</b>	Hepatitis-C-Virus
<b>HEPES BSS</b>	<i>HEPES Buffered Saline Solution</i>
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus
<b>HLA</b>	Humanes Leukozytenantigen
<b>HTLV</b>	Humanes T-lymphotropes Virus
<b>hUSP9Y</b>	<i>Ubiquitin-specific Protease 9 gene on the Y</i>
<b>IL1RN</b>	Interleukin 1-Rezeptor-Antagonist
<b>Kera</b>	Keratinozyt/en
<b>MiMa</b>	Mikromasse/n
<b>min</b>	Minute
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase
<b>MSCs</b>	Mesenchymale Stammzellen
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter

<b>NHEK</b>	<i>Normal Human Epidermal Keratinocytes</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>qRT-PCR</b>	Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>sek</b>	Sekunde
<b>s.u.</b>	siehe unten
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor beta
<b>TMEFF1</b>	<i>Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1/Tomoregulin-1</i>
<b>TNS</b>	<i>Trypsin Neutralizing Solution</i>
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>USSC</b>	unrestringierte, somatische Stammzelle aus Nabelschnurblut
<b>Wdh</b>	Wiederholung
<b>°C</b>	Grad Celsius

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die intakte Haut .....	1
1.2 Wundheilung in der Chirurgie .....	3
1.2.1 Epithelialer-mesenchymaler Übergang (EMT).....	4
1.3 Keratinozyten .....	5
1.4 Pluripotente Zellen: unrestringierte, somatische Stammzellen aus Nabelschnurblut .....	5
1.5 Die Rolle mesenchymaler Stammzellen bei der Narbenbildung .....	7
1.5.1 Die Phasen der Wundheilung .....	7
1.6 Ziele der Arbeit .....	8
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1 Material .....	10
2.1.1 Chemikalien und Lösungen .....	10
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	11
2.1.3 Geräte .....	12
2.1.4 Proteine und Enzyme .....	13
2.1.5 Medien und Puffer .....	13
2.1.6 Kits und Arrays.....	14
2.1.7 Primer mit Sonden .....	14
2.1.8 Zellen .....	15
2.1.8.1 Unrestringierte, somatische Stammzellen.....	15
2.1.8.2 Keratinozyten.....	15
2.2 Methoden .....	16
2.2.1 Auftauen kryokonservierter Zellen.....	16
2.2.1.1 USSC .....	16
2.2.1.2 Keratinozyten.....	17
2.2.2 Mediumherstellung .....	17
2.2.2.1 USSC .....	17
2.2.2.2 Keratinozyten.....	17
2.2.3 Kokultur .....	17
2.2.4 Zellpassagierung .....	18
2.2.4.1 USSC .....	18
2.2.4.2 Keratinozyten.....	18
2.2.5 Zellzählung .....	19
2.2.5.1 Automatische Zellzählung .....	19
2.2.5.2 Zählung mittels Neubauerzählkammer .....	20
2.2.6 Mediumwechsel .....	20
2.2.7 Kryokonservierung .....	20
2.2.7.1 USSC .....	20
2.2.7.2 Keratinozyten.....	21

2.2.8	Kokulturen .....	21
2.2.8.1	Mikromassen-Modell.....	21
2.2.8.1.1	Zellkultivierung .....	21
2.2.8.1.2	Mikromassen-Herstellung.....	22
2.2.8.2	Scratch-Assay .....	23
2.2.8.2.1	Zellkultivierung.....	24
2.2.8.2.2	Kokultivierung.....	25
2.2.9	Mikroskopie in Phasenkontrast.....	25
2.2.10	RNA-Extraktion.....	25
2.2.11	cDNA-Herstellung .....	26
2.2.12	qRT-PCR .....	27
2.2.12.1	qPCR mit Sonde aus Universal ProbeLibrary .....	27
2.2.12.2	Genspezifischer Array für den humanen epithelialen zu mesenchymalen Übergang .....	29
2.3	Statistische Methoden .....	31
2.4	Ethikvotum.....	31
<b>3.</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>32</b>
3.1	Expression von geschlechtsspezifischer Aktivität humaner, männlicher Zellen.....	32
3.2	Kokulturen von Keratinozyten und USSCs im mikroskopischen Phasenkontrast .....	33
3.3	Evaluierung von Genexpressionen mittels RT <sup>2</sup> Profiler PCR Array .....	36
3.3.1	Relevante Expressionsänderung der Mikromassen-Kokultur.....	40
3.3.1.1	AHNAK Nukleoprotein (AHNAK).....	40
3.3.1.2	Epidermal growth factor receptor (EGFR) .....	42
3.3.1.3	Interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) .....	43
3.3.1.4	Transforming growth factor, beta 2 (TGF $\beta$ 2).....	45
3.3.1.5	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1 (TMEFF1).....	47
3.3.2	Scratch-Versuch-Kokultur .....	48
<b>4.</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>49</b>
4.1	Zur Rolle relevant veränderter Expression von Genen in der Kokultur im Zusammenhang mit Wundheilungsvorgängen.....	49
4.1.1	Die Rolle des AHNAK Nukleoproteins.....	50
4.1.2	Die Rolle des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors .....	50
4.1.3	Die Rolle des Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten .....	51
4.1.4	Der Transforming Growth Factor $\beta$ in Geweben und in der Kokultur mit USSCs .....	52
4.1.5	Die Rolle von Tomoregulin-1 .....	53
4.2	Schlussfolgerung.....	53
4.3	Ausblick .....	54
<b>5.</b>	<b><i>Literatur- und Quellenverzeichnis</i></b> .....	<b>55</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hautschichten von Subkutis bis Epidermis (modifiziert nach Aumüller et al. 2010, S. 1165) .....	2
Abbildung 2: Mikromassenherstellung schematisch und als lichtmikroskopische Aufnahme.....	23
Abbildung 3: Scratch-Assay schematisch dargestellt.....	24
Abbildung 4: Aufbau und Bestückung eines PCR-Arrays (modifiziert nach Qiagen, 2012) .....	31
Abbildung 5: Keratinozyten (ungefärbt) in Phasenkontrast, in 100facher Vergrößerung .....	34
Abbildung 6: USSC-Mikromasse (ungefärbt) in Phasenkontrast, in 100facher Vergrößerung.....	34
Abbildung 7: 3D-USSC-Mikromasse auf 2D-Keratinozytenlayer (ungefärbt) in Phasenkontrast, in 100facher Vergrößerung.....	35
Abbildung 8: Scratch-Versuch (ungefärbt) in Phasenkontrast, in 100facher Vergrößerung.....	35
Abbildung 9: Kokultur aus USSCs und 2D-Keratinozytenlayer (ungefärbt) im Scratch-Versuch, in 100facher Vergrößerung.....	36
Abbildung 10: Delta-CT-Werte vom AHNAK Nukleoprotein .....	40
Abbildung 11: $2^{-\Delta\Delta CT}$ vom AHNAK-Nukleoprotein.....	41
Abbildung 12: Delta-CT-Werte für EGFR.....	42
Abbildung 13: $2^{-\Delta\Delta CT}$ für EGFR.....	43
Abbildung 14: Delta-CT-Werte für IL1RN .....	43
Abbildung 15: $2^{-\Delta\Delta CT}$ für IL1RN.....	44
Abbildung 16: Delta-CT-Werte von TGF $\beta$ 2 .....	45
Abbildung 17: x-fache Änderung von TGF $\beta$ 2.....	46
Abbildung 18: Delta-CT-Werte von TMEFF1 .....	47
Abbildung 19: x-fache Änderung von TMEFF1 .....	48

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sinneszellen der Haut mit Lokalisation und Funktion (modifiziert nach Kirsch et al. 2011).....	3
Tabelle 2: Chemikalien und Lösungen .....	10
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien .....	12
Tabelle 4: Geräte.....	13
Tabelle 5: Proteine und Enzyme .....	13
Tabelle 6: Medien und Puffer .....	14
Tabelle 7: Kits und Arrays.....	14
Tabelle 8: Primer mit Sonden .....	14
Tabelle 9: Mastermix 1 zur cDNA-Synthese.....	27
Tabelle 10: Mastermix 2 zur cDNA-Synthese.....	27
Tabelle 11: Rezeptur zur Herstellung des Mastermixes für die PCR-Wells .....	28
Tabelle 12: Primer und dazugehörige Sequenz .....	28
Tabelle 13: Gen und dazugehörige Sondennummer.....	29
Tabelle 14: Anleitung zur Herstellung des Reverse-transcription-Mix zur cDNA-Umwandlung.....	29
Tabelle 15: Gene des EMT-Arrays der Firma Qiagen (modifiziert nach Qiagen 2013) 40	
Tabelle 16: $\Delta\text{CT}$ , $\Delta\Delta\text{CT}$ und $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ vom AHNAK-Nukleoprotein .....	41
Tabelle 17: $\Delta\text{CT}$ , $\Delta\Delta\text{CT}$ und $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ für EGFR .....	42
Tabelle 18: $\Delta\text{CT}$ , $\Delta\Delta\text{CT}$ und $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ für IL1RN .....	44
Tabelle 19: $\Delta\text{CT}$ , $\Delta\Delta\text{CT}$ und $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ für TGF $\beta$ 2.....	46
Tabelle 20: $\Delta\text{CT}$ , $\Delta\Delta\text{CT}$ und $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ von TMEFF1 .....	47

## 1. Einleitung

Gewebedefekte stellen in vielen Bereichen der interventionellen Medizin, sowie im Zusammenhang mit Traumata und chronischen Erkrankungen eine noch nicht vollständig gelöste Herausforderung für Mediziner und das Gesundheitssystem dar. Die durch jeden transdermalen Eingriff ausgelösten, körperlichen Heilungsprozesse führen unweigerlich zu mehr oder weniger ausgeprägter Narbenbildung. Neben der offensichtlich kurativen Absicht spielen gerade in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie auch die hiermit verbundenen ästhetischen Herausforderungen für die physische und psychische Gesundheit der Patienten eine entscheidende Rolle. Da die hier exponierten Körperstellen für den Großteil der Patienten von entscheidender Bedeutung für eine angemessene Lebensqualität sind, kann eine narbenlose Abheilung einen erheblichen Teil zur psychischen Krankheitsverarbeitung beitragen.

Die Erforschung von dermalen Heilungsprozessen erfordert die Zuordnung zeitlicher Abläufe von Zellmigrationen und interzellulären Wechselwirkungen, wie sie durch direkten Zell-Zell-Kontakt und auch über lösliche Faktoren zustande kommen. Die Wundheilung ist ein biologisch-dynamischer Prozess mit komplexen Wechselwirkungen, welche es auf molekularer Ebene zu verstehen gilt.

### 1.1 Die intakte Haut

Zum Erhalt der Gesundheit trägt eine intakte Haut (*Integumentum commune*) maßgeblich bei und hat vielfältige Eigenschaften und Aufgaben. Sie dient dem Schutz des Wirtes vor äußeren Einflüssen, wie zum Beispiel mechanischen Verletzungen, Bakterien und Viren, dem Schutz vor Wasserverlust, der Thermoisolation und dem Strahlenschutz (Fuchs 2008). Zudem ist die Haut durch das Vorhandensein des Unterhautfettgewebes ein wichtiger Energiespeicher. Als größtes menschliches Sinnesorgan, welches etwa 15% unseres Körpergewichts ausmacht und mit einer Dicke von circa 1,0-2,0mm (Aumüller et al. 2010, S.1164), spielt die Haut eine außergewöhnlich wichtige Rolle als organische Barriere zwischen der äußeren Umwelt und dem restlichen menschlichen Organismus.

Dabei zeigten wissenschaftliche Schätzungen, dass die Haut eine weitaus größere Oberfläche als bisher berechnet wurde aufweist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Epithelauskleidung Haarfollikel, ekkrine und apokrine Drüsen und Talgdrüsen enthält. Diese Epithelien stehen in engem Kontakt mit Mikroben. Daher sollten diese Oberflächen mitgerechnet werden. Sie stellen Schnittstellen in der Kommunikation zwischen den Mikroben und dem Wirt dar. Es kann angenommen werden, dass das Hautmikrobiom somit maßgeblich zum Erhalt der Gesundheit beiträgt. Werden diese Oberflächen

mitgerechnet, kann eine Hautoberfläche von bis zu 25m<sup>2</sup>, statt der bisher angenommenen 2m<sup>2</sup>, angegeben werden (Gallo 2017).

Das Sinnesorgan Haut besteht aus drei Schichten. Der Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Epidermis, als äußerster Hautteil, bildet sich aus mehrschichtig verhornendem Plattenepithel, mit kleinen Blutgefäßen und zahlreichen Rezeptoren (Kirsch et al. 2011). Sie lässt sich weiter in ein Stratum corneum, Stratum lucidum, Stratum granulosum und Stratum basale unterteilen (Nguyen and Soulika 2019). Das mehrschichtige Epithel, welches die Haut bedeckt, enthält enddifferenzierte Zellen, die sich fortlaufend von der Haut ablösen und im Verlauf des ganzen Lebens von basal nach apikal ersetzt werden. Da vollständig ausdifferenzierte Zellen sich nicht teilen, hängt dieser Prozess von weniger differenzierten Zellen ab, die eine hohe Selbsterneuerungskapazität besitzen, den epidermalen Stammzellen. Dabei gibt es drei beschriebene Haut-Stammzellnischen: Die am besten charakterisierten dermalen Stammzellen liegen im Bereich der Haarfollikel im Haarbalg. Es befinden sich aber auch Stammzellen in der interfollikulären Epidermis und möglicherweise im Bereich der Talgdrüsen. In der normalen Epidermis neigen Stammzellen dazu sich nicht zu teilen. Im Falle von Zellschädigung oder in Kultur sind sie allerdings in der Lage sich nachhaltig zu erneuern (Watt et al. 2006).

Die Dermis besteht aus dem Stratum papillare und reticulare. Sie ist gut vaskularisiert und innerviert und besitzt kollagenes, elastisches Bindegewebe, sowie zahlreiche Rezeptoren. Die Subkutis besteht aus Fett- und lockerem Bindegewebe (Kirsch et al. 2011).

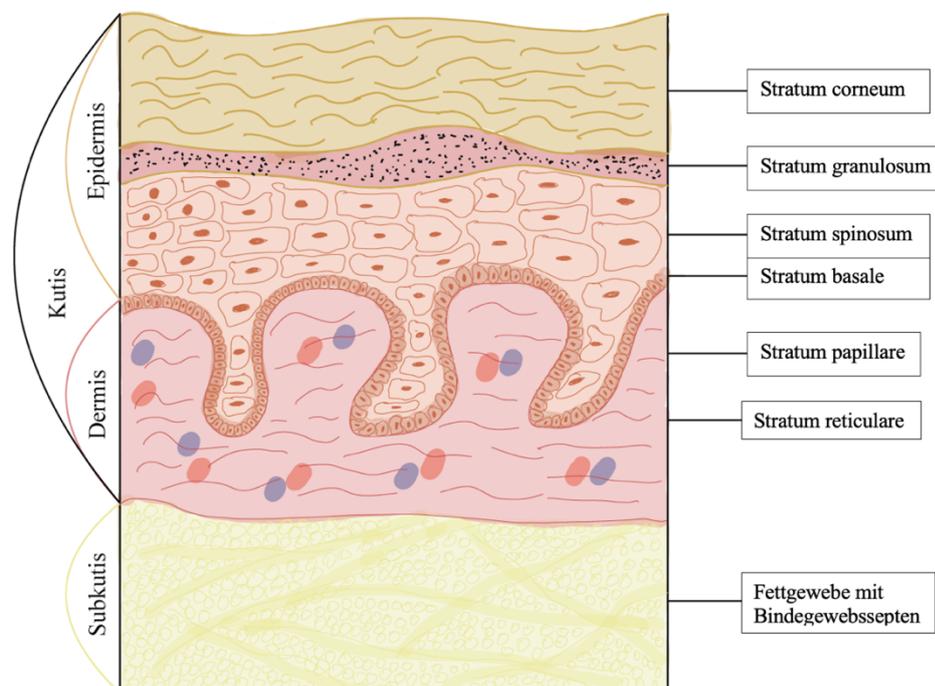


Abbildung 1: Hautschichten von Subkutis bis Epidermis (modifiziert nach Aumüller et al. 2010, S. 1165)

Zur Erkennung mechanischer und thermischer Reize, sowie Nozizeption werden folgende Rezeptoren benötigt:

<b>Lokalisation</b>	<b>Sinneszelle</b>	<b>Funktion</b>
Epidermis - Stratum basale	Merkel-Zellen	Druckwahrnehmung
Epidermis und Dermis	Freie Nervenendigungen	Thermische-, mechanische-, Schmerzreize
Dermis - Stratum papillare - Stratum reticulare	Meissner-Tastkörperchen Ruffini-Körperchen	Tasten Dehnung
Subcutis	Vater-Pacini-Körperchen	Vibration

*Tabelle 1: Sinneszellen der Haut mit Lokalisation und Funktion (modifiziert nach Kirsch et al. 2011)*

Zu den Immunzellen der Dermis gehören die Langerhanszellen und dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen und Monozyten, Mastzellen, Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten (Nguyen und Soulika 2019).

Entsteht ein Schaden an diesem wichtigen Organ, kommt es im Rahmen der Regenerierungsprozesse in der Regel zu Narbenbildung. Das ideale langfristige Ziel der dermalen Regenerationsforschung ist den Ursprungszustand wiederherstellen zu können.

## 1.2 Wundheilung in der Chirurgie

Unter Wundheilung versteht man einen komplexen Prozess, welcher ein präzises Zusammenspiel aus einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Signalmolekülen, verschiedenen Geweben und multiplen Zellreihen erfordert (Edwards et al. 2018; Martin 1997). Diese Komplexität der Wundheilung gilt es zu verstehen und in den klinischen Alltag, zur Heilung der Patienten, zu übertragen. Den aktuellen Goldstandard in der Versorgung von Hautdefekten stellt die Autoplastik mittels Transplantaten, wie der Spalthaut, dar. Trotzdem stößt auch diese Methode, zum Beispiel bei der Versorgung ausgedehnter Brandverletzungen und dem Fehlen von ausreichend gesunder Haut, an ihre Grenzen oder kann bei chronischen Wundheilungsstörungen, wie häufig durch den Diabetes mellitus bedingt, kontraindiziert sein. Hieraus ergibt sich ein Bedarf an weiteren Hautersatzmöglichkeiten (Edwards et al. 2018). Ein Ziel der Forschung ist es, in Kultur gezüchtete autologe Transplantate herstellen zu können. Chronische Wunden stellen eine erhebliche Belastung für Patienten dar und verursachen hohe Kosten für das Gesundheitssystem. Im Jahr 2014 wurden beispielsweise in den Vereinigten Staaten von Amerika über 32 Milliarden US-Dollar für die Behandlung von Wundheilungsstörungen benötigt. Dabei fiel der Großteil der Kosten im ambulanten Sektor an (Nussbaum et al.

2018; Clark et al. 2007). In der alternden Bevölkerung ist eine prognostische Zunahme des Versorgungsbedarfs chronischer Wunden zu erwarten.

### 1.2.1 Epithelialer-mesenchymaler Übergang (EMT)

Eine alternative Quelle für Fibroblasten und Myofibroblasten während der Gewebereparatur in der Haut und Fibrose könnte durch die Erzeugung von mesenchymalen Zellen aus Epithelzellen bereitgestellt werden. Dieser Prozess wird als epithelialer-mesenchymaler Übergang bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle während der Entwicklung (Postlethwaite et al. 2004; Eming et al. 2007).

Epithelzellen sorgen für eine Kohäsion der Zellen, was der Zelllagerung dienlich ist. Zudem besitzen sie drei Membrandomänen, *tight junctions* und sind nicht mobil. Im Gegensatz dazu sind mesenchymal aufgebaute Zellen u.a. durch lockere oder nicht vorhandene Interaktion zwischen den Zellen, sowie freie Beweglichkeit und invasive Eigenschaften charakterisiert (Pinkert 2008).

Ein Merkmal des EMT stellt die Herabregulation des Zelladhäsionsmoleküls, E-Cadherin, dar, welches typisch für sowohl embryonale als auch adulte Epithelzellen ist (Grille et al. 2003). Der EMT kann auch reversibel sein und findet während der Entstehung des Mesoderms in der Gastrulationsphase statt (Sanders und Prasad 1989). Später trägt dieser auch zur weiteren Entwicklung u.a. der Neuralleiste, des Herzens und des Gaumens bei (Larue und Bellacosa 2005). Er kann aber auch durch Erkrankungen, wie zum Beispiel Nierenfibrose, aktiviert werden (Postlethwaite et al. 2004; Eming et al. 2007). Im Gegensatz dazu kann bei chronischen Wundheilungsstörungen, wie sie bei Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie oder bei Tumorpatienten postradiogen vorliegen, eine Reduktion des EMT beobachtet werden (Toker 2000).

Epithelzellen, die sich dem EMT unterziehen, verlieren ihre Epithelzellpolarität und nehmen einen mesenchymalen Phänotyp an, der schließlich Fibroblasten und Myofibroblasten als Reaktion auf TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ) und andere Wachstumsfaktoren bildet (Postlethwaite et al. 2004). Dieser Mechanismus wurde als allgemeine Möglichkeit postuliert, Fibroblasten bei Fibrose bereitzustellen. Bisher liegen allerdings keine schlüssigen Daten über die Relevanz von EMT bei normaler Wundheilung vor (Abraham et al. 2007).

Diese mesenchymalen Fibroblasten scheinen eine Rolle bei der normalen Bindegewebsbildung, -homöostase und -reparatur und die Hauptrolle bei pathogener Narbenbildung und Fibrose zu spielen. Bei der Wundheilung und Gewebereparatur liefern Fibroblasten proinflammatorische Signale und synthetisieren interstitielle Kollagene, Fibronectine und andere Matrixkomponenten, um das geschädigte Gewebe zu reparieren. Fibroblasten können zu Myofibroblasten differenzieren, einem

spezialisierten kontraktilen Zelltyp, der für Wundverschluss, Gewebekontraktion und Narbenbildung verantwortlich ist (Abraham et al. 2007).

### 1.3 Keratinozyten

Keratinozyten stellen einen wichtigen zellulären Bestandteil der Epidermis dar. Somit spielen sie eine tragende Rolle bei der Wundheilung. Sie sind wesentlich am Wundverschluss durch Epithelisierung beteiligt, haben eine Barrierefunktion und spielen eine essenzielle Rolle bei der Kommunikation vieler, an der Wundheilung mitwirkender, Zellen. Multiple Regulatoren, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Integrine, Keratine, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Chemokine und extrazelluläre Matrices modulieren dabei die Zellmigration der Keratinozyten beim Wundverschluss. Epithelisierung ist definiert als ein Verschließen einer offenen epithelialen Oberfläche. Dieser Prozess ist wesentlich an der Wundheilung beteiligt (Pastar et al. 2014). Keratinozyten entspringen der basalen Epidermis und proliferieren, sowie migrieren in die oberen Hautschichten, wo sie differenzieren und die Haut vor Verletzung und Stress schützen. Bei intakter Haut liegen die Keratinozyten einer speziellen Matrix, der Basallamina, auf (Martin 1997). Basale Keratinozyten exprimieren eine Reihe von extrazellulären Matrixrezeptoren der Integrinfamilie. Diese umfassen sowohl  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha 2 \beta 1$ , den Fibronektin-Rezeptor, einen Rezeptor für Kollagen und Laminin,  $\alpha 3 \beta 1$ , einen Rezeptor für Laminin und Epigrilin,  $\alpha v \beta 5$ , den Vitronektin-Rezeptor und  $\alpha 6 \beta 4$ , einen Bestandteil von Hemidesmosomen. Keratinozyten haben Kontakt zur Zellmembran und scheinen auch eine Rolle in den Zell-Zell-Kontakten zu spielen (Watt et al. 1993).

Eine Dysregulation der Differenzierung und Proliferation kann zu verschiedenen Krankheiten wie Psoriasis, Dermatitis, Angio-Ödemen, makulopapulösen Ausschlägen und Hautkarzinomen führen (Sah et al. 2017; Popp et al. 2014; Ambler und Määttä 2009; Proksch et al. 2008). Das Verständnis dieser Prozesse ist für die Entwicklung zukünftiger Therapiemöglichkeiten von zentraler Bedeutung.

### 1.4 Pluripotente Zellen: unrestringierte, somatische Stammzellen aus Nabelschnurblut

Unrestringierte, somatische Stammzellen aus Nabelschnurblut (*unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood* = USSCs) gehören zur Gruppe der mesenchymalen Stammzellen. Embryonale Wunden im ersten, zweiten und frühen dritten Trimester besitzen die Eigenschaft der narbenlosen Heilung (Redd et al. 2004). Daher sind Stammzellen wiederholt Gegenstand von Therapieversuchen mit chronischen, nicht heilenden Wunden.

Embryonale Stammzellen haben die Fähigkeit zur facettenreichen Keimzellschichtdifferenzierung (Raghuram et al. 2020) und somit das breiteste Differenzierungspotential (Thomson et al. 1998). Mit diesen Fähigkeiten der Selbsterneuerung können Stammzellen die existierenden Zellpopulationen in chronischen Wunden unterstützen, um die Barrieren der Wundheilung zu überwinden. Darüber hinaus können Stammzelltherapien verwendet werden, um das Anwachsen, die Signalübertragung und die Aktivität von Zellen zu verstärken und somit den Behandlungserfolg am Patienten zu verbessern (Raghuram et al. 2020).

Unrestringierte, somatische Stammzellen aus Nabelschnurblut sind pluripotente Zellen, die CD45-negativ, sowie HLA-Klasse-II-negativ sind und vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstmals nachgewiesen wurden. Sie werden aus der mononukleären Zellfraktion des plazentarem Nabelschnurblutes gewonnen, zeigen ein normales Karyogramm (46XX oder 46XY) und stellen Vorläuferzellen der mesenchymalen Stammzellen dar. So können sie in endodermale, ektodermale und mesodermale Richtung differenzieren. In der Zellkultur können sie auf eine Population von bis zu  $10^{15}$  Zellen expandiert werden, ohne ihre Pluripotenz zu verlieren. Die Kultivierung kann dabei für bis zu 20 Passagen erfolgen, was 40 Populationsverdoppelungen entspricht, ohne dass es zu einer spontanen Differenzierung kommt. In vitro zeigten USSCs eine Differenzierung in Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten, hämatopoetische und neuronale Zellen, einschließlich Astrozyten und Neurone, welche Neurofilamente, Natriumkanäle und verschiedene Neurotransmitter-Phänotypen exprimieren. In vivo konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine Differenzierung der Zellen in mesodermale und endodermale Linien möglich ist. All diese Faktoren der in-vitro-Proliferationsfähigkeit, ohne spontane Differenzierung, aber mit einem intrinsischen und lenkbaren Potenzial zur Entwicklung zu mesodermalen, endodermalen und ektodermalen Zellen, gaben den Zellen ihren Namen der *unrestricted somatic stem cell* (USSC), zu deutsch unbeschränkte, somatische Stammzellen (Kögler et al. 2004).

Da die Zellgewinnung keinerlei Risiken für den Spender birgt, könnten diese Zellen zukünftig in großer Zahl gewonnen werden. Durch die Stammzeleigenschaften können sie Epithelien formen (Duscher et al. 2016). So sezernieren sie Wachstumsfaktoren zur Wundheilung und besitzen die Fähigkeit zu Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen zu differenzieren. Es konnte bereits eine verbesserte Regeneration und Wundheilung in Kombination von mesenchymalen Zellen (Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells) und azellulären amniotischen Membrangerüsten, in chronischen nicht heilenden Wunden, nachgewiesen werden. So wurden diabetische Fußulcera erfolgreich über neun Tage mit mesenchymalen Stammzellen behandelt (Hashemi et al. 2019).

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass der Einsatz dieser Stammzellen bei der Wundheilung zur Narbenreduktion beitragen kann (Jackson et al. 2012).

## 1.5 Die Rolle mesenchymaler Stammzellen bei der Narbenbildung

Narben stellen eine Folge normaler Wundheilung dar. Das so entstehende Gewebe bildet sich durch Ablagerungen von extrazellulärem Matrixgewebe aus Fibroblasten und Myofibroblasten (Jackson et al. 2012, Martin 1997), um die Hautbarriere wiederherzustellen. Narbenbildung stellt jedoch keinen notwendigen Prozess dar, um Hautläsionen zu reparieren. Vielmehr ist die Narbe Folge spezifischer Mechanismen, als Antwort auf Entzündungsreaktion an der Verletzungsstelle. Adulte mesenchymale Stammzellen aus dem Gewebe, die an der normalen Wundheilung beteiligt sind, sind trophische Mediatoren dieser Gewebereparatur. Sie beteiligen sich an der Abschwächung der Entzündungsreaktion und an der Umprogrammierung der residenten Immun- und Wundheilungszellen, um die Geweberegeneration zu begünstigen und die Bildung von fibrotischem Gewebe zu hemmen. Somit könnten die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) die Gewebsfibrose und die damit verbundene Narbenbildung hemmen (Jackson et al. 2012).

Narbiges Gewebe entsteht bei Verletzungen welche tiefer als die Epidermis reichen. Nachteilig dabei ist im Gegensatz zum ursprünglichen Gewebe der veränderte Phänotyp sowie die beeinträchtigte Funktionalität. Dies resultiert aus einem veränderten Verhältnis der Zellzusammensetzung. Die Dermis enthält normalerweise unter anderem Drüsen, Haarfollikel und sensorische Nervenzellen, welche in dem heilenden Gewebe nicht mehr neu ausgebildet werden. Um die Inflammationsphase zu verkürzen, wird zur Narbenvermeidung häufig lokal antibiotisch und antiseptisch therapiert, um schneller in die Zellproliferations- und Remodellierungsphase zu gelangen (Martin 1997).

Wird die Inflammationsphase beispielsweise durch das Anfallen nekrotischen Gewebes verlängert produzieren die wundheilenden Zellen, wie Myofibroblasten und Fibrozyten, vermehrt nicht-funktionales, wundfüllendes Gewebe, welches eine Narbe formt (Jackson et al. 2012).

### 1.5.1 Die Phasen der Wundheilung

Der Wundheilungsprozess kann in die drei Phasen der Inflammation, Proliferation und Remodellierung unterteilt werden. Dabei findet die letzte Phase unter der Epidermis statt und soll funktionell regenerieren. Aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) ist die direkte Differenzierung in verschiedene Zellen wie Hautfibroblasten, Keratinozyten und vaskuläre endotheliale Zellen möglich (Jackson et al. 2012, Sasaki 2008).

Sie beeinflussen die Hautregeneration dabei durch folgende verschiedene Zellfunktionen (Jackson et al. 2012):

1. T-Zell-Modulation
2. Neutralisation Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)
3. Anti-Fibrosefaktoren: Hemmung des Übergangs von inaktiven Fibrozyten zu (Myo-)Fibroblasten. Diese produzieren die extrazelluläre Matrix.
4. Inhibierung wundheilender Fibroblasten
5. Förderung der Angiogene

Es zeigte sich in Versuchen, dass Knochenmarkstammzellen *in vitro* zu Keratinozyten differenzieren können, indem sie Keratin 14 exprimierten. Außerdem können sie auch zu anderen Hautzellen wie Endothelzellen, Makrophagen und Perizyten werden. MSCs haben zudem das Potential in Entzündungsregionen zu akkumulieren. Sie exprimieren Chemokinrezeptoren wie CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 und CXCR6. Die zirkulierenden MSCs werden durch spezifische Chemokine wie SLC/CCL21 und Chemokinrezeptoren wie CCR7 induziert. Bei *in-vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass die intradermale Injektion von SLC/CCL21 einen signifikant schnelleren Wundverschluss zur Folge hatte (Sasaki et al. 2008).

## 1.6 Ziele der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist die Untersuchung kokultivierter humaner Zellen aus USSCs und Keratinozyten, im Hinblick auf die gegenseitige Einflussnahme zum Verständnis möglicher dermalen Differenzierungsabläufe. Die zentrale Fragestellung der Arbeit fokussiert sich auf die zellulären Mechanismen, welche auf Wundheilungsprozesse Einfluss nehmen könnten. Hierbei werden Genexpressionen der Kokultur, wie sie in humanen Hautschichten und daran angrenzend zu finden sind, analytisch betrachtet und kritisch beurteilt.

In der Fachliteratur wird beschrieben, dass Stammzellen nicht nur ein Regenerationspotential besitzen, sondern auch umliegende Zellen, wie Fibroblasten, positiv beeinflussen können. So ist beispielsweise eine endodermale Differenzierung der USSCs in Herzzellen und Hepatozyten beschrieben (Kögler et al. 2004). Auch aus hiesigem Labor stammen einige wissenschaftliche Arbeiten, bei denen *adipose derived stem cells*, also Fettstammzellen, gemeinsam mit Keratinozyten in Kokultur gebracht wurden und sich eine gegenseitige Beeinflussung zeigte.

In dieser Arbeit soll nun der Effekt der Nabelschnurblutstammzellen auf Keratinozyten, mittels Darstellung der Expressionsmuster, dargestellt werden. Hierzu musste zunächst

ein Kokulturmodell etabliert werden, in dem beide Zellen vital bleiben. Nach zahlreichen Vorversuchen wurden der Scratch-Assay als zweidimensionales, und der Mikromassenversuch als dreidimensionales Modell untersucht. Die Expressionmuster der Kokultur wurden anhand der exprimierten Gene in einem PCR-Array des epithelialen zum mesenchymalen Übergang dargestellt. Die dabei verwendeten USSCs stammen aus der hiesigen José Carreras Stammzellbank des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Uniklinik Düsseldorf. Die Untersuchungen sollten die Form von Änderungen in Expressionsprofilen der dermalen Zellen kartieren. Kulturen von Keratinozyten, die kommerziell erhältlich sind und von Nabelschnurblutstammzellen (USSCs) wurden zur Standardisierung der Untersuchungsparameter einzeln und gemeinsam in Kokultur analysiert. Da die Wundheilung beim Vorliegen chronischer Erkrankungen gestört sein kann, sollte hier nach Dysregulation im EMT gesucht werden, da dieser einen Teil der Wundheilung darstellt.

Die Sekretion löslicher, interzellulär wirksamer Faktoren wurde im zeitlichen Verlauf der Kultur dargestellt, wobei als Methode unter anderem die Messung von Proteinen und von interzellulären Verbindungen zum Einsatz kam. Ebenfalls wurde die Stabilität von Kokulturen unterschiedlicher Zellsorten untersucht, wobei ein kinetisches Zellkulturmodell genutzt wurde.

Das Vorhandensein dermalen Stammzellen ist der Schlüssel zur Hautregeneration. Trotzdem kann die intrinsische Wundheilung nach dermalen Schädigung nicht ausreichend sein, um einen suffizienten Verschluss der Wunden zu gewährleisten. Eine persistierende Wunde stellt eine Prädilektionsstelle für den Flüssigkeitsverlust und das Eintreten von Erregern in den Körper dar. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten zum sekundären Wundverschluss im klinischen Alltag. Narbenfreie Heilung ist dabei allerdings meist nicht zu erzielen. Ein möglicher Vorteil der USSCs kann sein, dass eine Eigenspende, zum Zeitpunkt der Geburt, möglich wäre und Abstoßungen somit minimiert werden könnten.

Das Grundziel dieser Arbeit war somit, im Sinne der Grundlagenforschung, zu eruieren, ob eine Kokultivierung möglich ist, in der beide Zelllinien mittelfristig vital bleiben, um die Effekte der Zellen untereinander darstellen und wissenschaftlich analysieren zu können. Da es sich bei den Keratinozyten um den Hauptbestandteil der Hautzellen handelt, könnte diese Arbeit einen Grundstein für ein erweiterbares Hautmodell bieten, um so weitere Möglichkeiten des *Tissue Engineerings* aufzuzeigen. Der Bedarf danach ist in der Literatur vielfach beschrieben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Im Folgenden sind die verwendeten Materialien tabellarisch aufgeführt.

#### 2.1.1 Chemikalien und Lösungen

<b>Chemikalie; Lösung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Agarose	Fa. Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Invitrogen™ UltraPure™, DNase/RNase-freies destilliertes Wasser	Fisher Scientific GmbH	Hagen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Dimethyl Sulphoxide Hybri- Max (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Ethanol 100%	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Fetal calf serum (FCS)	PAN Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Linde AG	Pullach, Deutschland
L-Glutamin (200mM)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin (10000 U / 10000 µg/ml)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
SYBR Green Fluor qPCR Mastermix	Qiagen	Hilden, Deutschland
Trypan Blue solution 0,4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland

*Tabelle 2: Chemikalien und Lösungen*

Die verwendeten Chemikalien weisen den Reinheitsgrad pro analysi auf.

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Blunt Fill Needle	BD	Heidelberg, Deutschland
Cell Counting Slides für TC-10, dual-chamber	Bio-Rad	Feldkirchen, Deutschland
Cell Scraper	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Cell View Slides	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen 24x50mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH	Edermünde, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock microcentrifuge tubes	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
EU Wide Optical 8-cap strip natural	BIOplastics BV	Landgraaf, Niederlande
Falcon Tubes 25 und 50ml	BD Biosciences	Erembodegem, Belgien
Greiner Bio-One Cell Scraper 28cm	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Injekt Luer Solo 2ml	B. BRAUN	Melsungen, Deutschland
Kryoröhrchen 1ml (steril)	STARLAB	Hamburg, Deutschland
Küvette: UVetten	Eppendorf	Wesseling, Deutschland
Mini Spin Column	Qiagen	Hilden, Deutschland
Mr. Frosty Freezing container	Nalgene	München, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Objektträger SuperFrost Plus 26x76x1mm	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Petrischalen Falcon ®	Corning	Ariziona, USA
Pipettenspitzen Mikroliterpipette Research	Eppendorf	Wesseling, Deutschland

Pipette elektrisch: accu-jet pro-Pipettierhelfer	BrandTech Scientific Inc.	Essex, USA
Pipettenspitzen TipOne (1, 5, 10ml)	STARLAB	Hamburg, Deutschland
StemMACS MSC Expansion Media Kit XF	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Untersuchungshandschuhe	Mai Med	Neuenkirchen, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 und 175cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
96-well plates für iCycler iQ®	Eurogentec	Seraing, Belgium

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

## 2.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller	Firmensitz
Autoklav D-65	Systec GmbH	Linden, Deutschland
BioPhotometer 6131	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Bio-Rad iQ5	Bio-Rad	Feldkirchen, Deutschland
Brutschrank Cytoperm 2 Heracell 240	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Feinwaage Chyo JL-180	A. Hartenstein GmbH	Würzburg, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Liebherr GmbH	Ochsenhausen, Deutschland
iCycler Thermal Cycler Base, iQ5 (Real Time PCR Detection System)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Kühlschrank -4°C	Liebherr GmbH	Ochsenhausen, Deutschland
Mikroskop DM5000B	Leica	Wetzlar, Deutschland

Mikroskop-Kamera DFC420C	Leica	Wetzlar, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland
Stoppuhr	neoLab	Heidelberg, Deutschland
TC 10 Automated Cell Counter von BIO-RAD	Bio-Rad	Feldkirchen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf	Wesseling, Deutschland
Vinitex Airflow Abzug nach DIN EN 14175	Vinitex Laboreinrichtungen GmbH und Co KG	Coswig, Deutschland
Wasserbad Typ 3047	Köttermann GmbH & Co KG	Ütze, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 1S-R mit Sorvall 75002000- Ausschwingrotor	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Deutschland

Tabelle 4: Geräte

#### 2.1.4 Proteine und Enzyme

<b>Proteine, Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
SuperScript II Reverse Transcriptase (200U/l)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Trypsin 2,5%	Lonza	Verviers, Belgien

Tabelle 5: Proteine und Enzyme

#### 2.1.5 Medien und Puffer

<b>Medium, Puffer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1,0g/L Glucose, ohne L- Glutamin	Lonza	Verviers, Belgien
Dulbecco's Phosphate- Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe, Deutschland

HEPES buffered saline (PBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Keratinocyte Growth Medium 2 (Ready-to-use)	Promocell	Heidelberg, Deutschland

Tabelle 6: Medien und Puffer

## 2.1.6 Kits und Arrays

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Cytoselect 24 Well Wound healing Assay	CellBiolabs	San Diego, CA, USA
DetachKit 2	PromoCell	Heidelberg, Deutschland
PAHS-090ZA-6 RT <sub>2</sub> Profiler™ PCR Array Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
RT2 First Strand Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland

Tabelle 7: Kits und Arrays

## 2.1.7 Primer mit Sonden

<b>Primer, Sonde</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> (5000g/ml)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Primer	Eurofins MWG Operon	Ebersberg, Deutschland
Sonden	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland

Tabelle 8: Primer mit Sonden

### 2.1.8 Zellen

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene in-vitro-Zellsorten verwendet. Zum einen unrestringierte, somatische Stammzellen und zum anderen Keratinozyten. Bei den USSCs wurden zwei verschiedene Linien eingesetzt.

#### 2.1.8.1 Unrestringierte, somatische Stammzellen

Die in den Versuchen verwendeten USSCs wurden von der José Carreras Stammzellbank unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Gesine Kögler am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Gewonnen wurden diese pluripotenten Zellen aus dem Nabelschnurblut von anonymen Spendern. Die Zustimmung wurde durch die jeweilige Mutter erteilt. Anschließend wurden sie speziell kultiviert und kryokonserviert (Kögler et al. 2004).

Für diese Arbeit wurden drei verschiedene, zur Forschung freigegebene, Zellreihen verwendet:

- USSC 18 (weiblich) - für Vorversuche
- USSC 5/73 (weiblich)
- USSC 8/77 (männlich).

Zur Forschung mit diesen Zellen liegt ein Ethikvotum vom 06.04.2017, mit der Studiennummer 5872R, welches die Zellen als ethisch unbedenklich für die Forschung einstuft, der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, vor.

Die adhärennten Zellen sind CD45-negativ und können als pluripotente Linie zehn bis fünfzehn Mal expandiert werden (Kögler et al. 2004).

#### 2.1.8.2 Keratinozyten

Für die Versuche wurden *Normal Human Epidermal Keratinocytes* (NHEK) der Firma PromoCell verwendet. Dabei handelt es sich um juvenile Zellen, welche aus der Epidermis, gewonnen wurden. Diese männlichen Zellen stammen alle von demselben Spender ab, der zur Zeit der Spende drei Jahre alt war. Die Zellen wurden in  $5 \times 10^5$  Portionen als Kryokonzentrate in Passage zwei geliefert, zunächst bei  $-196^\circ\text{C}$  gelagert, anschließend kultiviert und expandiert. Bis zu 15 Verdopplungszyklen sind so möglich

gewesen. Eine Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  ist langfristig nicht ausreichend, da dies zu irreversiblen Zellschäden führen kann (siehe 2.2.7).

Diese Zellen wurden auf die Negativität von HIV-1, HIV-2, HBV, HCV, HTLV-1, HTLV-2 und einen Befall von anderen Viren, Bakterien und Pilzen getestet (PromoCell GmbH 2021).

Epidermale Keratinozyten stellen mit etwa 90% den Großteil der Hautzellen dar. Sie entspringen in dem Stratum basale und unterliegen Differenzierungsprozessen bis sie im Stratum corneum, als kernlose, flache Hornhautzellen untergehen.

## 2.2 Methoden

Die Zellkultur wurde unter der Sterilbank bearbeitet.

### 2.2.1 Auftauen kryokonservierter Zellen

Die Zellen zu dieser Arbeit wurden in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) gelagert und für die Versuche jeweils aufgetaut. Der Ablauf des Auftauens wird im Folgenden beschrieben.

#### 2.2.1.1 USSC

Zum Auftauen der USSCs muss zunächst ein Nährmedium angesetzt werden (siehe 2.2.2.1).

Man beginnt mit dem Vorlegen von 10ml  $4^{\circ}\text{C}$  kaltem Medium in ein 50ml Falcon Tube. Danach werden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoffbehälter entnommen und sofort im vorbereiteten  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad aufgetaut, bis zum Verbleib eines etwa 3mm großen Eisrestes in der Mitte. Hierbei muss auf minimale Bewegung des Kryoröhrchens geachtet werden. Nach dem Auftauen der Zellsuspension, zuletzt durch Raumtemperatur, überführt man, nach Desinfektion des Kryoröhrchens, die Zellen mittels 1000 $\mu\text{l}$  Pipette in das vorbereitete Falcon Tube. Anschließend zentrifugiert man dieses für 7 Minuten bei 470xg oder 1500U/min und  $4^{\circ}\text{C}$ , um das Absinken der Zellen herbeizuführen. Der Überstand wird anschließend abpipettiert. Das Zellpellet wird dann in 15ml Medium gelöst. Dabei nutzt man die Scherkräfte der Pipettenspitze, um die Zellen voneinander zu trennen. Zuletzt wird diese Zellsuspension in eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  und Umgebungsatmosphäre mit 5%  $\text{CO}_2$ , 21%  $\text{O}_2$  und einer Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert. Es kann auch eine Mikroskopie zur Kontrolle erfolgen. Nach 24 Stunden sollte dann der erste Mediumwechsel erfolgen.

### 2.2.1.2 Keratinozyten

Zum Auftauen der Keratinozyten der Firma PromoCell werden 9ml *Keratinocyte Growth Medium 2 (Ready-to-use)* in eine 75cm<sup>2</sup> Flasche vorgelegt und für 30min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen werden nach dem Transport in flüssigem Stickstoff sofort auf Eis gestellt und anschließend im Wasserbad bei 37°C für 2 Minuten aufgetaut, ohne den Deckel unter Wasser zu halten. Anschließend wird der Deckel unter der Sterilbank mit 70%igem Ethanol desinfiziert und die Zellen zur Inkubation in die aufgewärmte Zellkulturflasche überführt. Der erste Mediumwechsel erfolgt dann nach 16-24 Std, das erste Passagieren bei Erreichen einer Konfluenz von 70-90%.

### 2.2.2 Mediumherstellung

Verwendet wurden drei verschiedene Medien. Die Lagerung erfolgte jeweils bei 4°C.

#### 2.2.2.1 USSC

Das USSC-Medium (510ml) wurde aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt:

- 350ml DMEM (aus einer 500ml Flasche wurden 150ml entfernt)
- 150ml FCS
- 5ml Penicillin/ Streptomycin
- 5ml L-Glutamin.

#### 2.2.2.2 Keratinozyten

Für die Keratinozyten wurde das *Keratinocyte Growth Medium 2 (Ready-to-use)* der Firma PromoCell verwendet. Dem Medium wurde zu Beginn die mitgelieferten 60µl CaCl-Lösung und die 12,3ml Supplement-Mix hinzugefügt.

### 2.2.3 Kokultur

Für die Zeit der Kokultur im Scratch-Versuch wurde das serumfreie Stem-MACS-Medium der Firma Miltenyi Biotec verwendet.

Dieses wird als Kit geliefert und muss vor der ersten Verwendung angesetzt werden. 100ml Stem MACS werden dazu mit 1,4ml des mitgelieferten Supplements versetzt. Dieser Mix hat dann eine Haltbarkeit von 7 Tagen.

#### 2.2.4 Zellpassagierung

Beide Zellreihen werden bei einer Konfluenz von 80-90% gesplittet, um ein Ausdifferenzieren der Zellen zu verhindern und optimale Kultivierungsbedingungen zu gewährleisten.

##### 2.2.4.1 USSC

Zum Passagieren der USSCs wird zunächst das Medium aus den 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen abgenommen. Danach werden die adhärennten Zellen mit 15ml 37°C warmer phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült, da Mediumrückstände die Trypsin-wirkung abschwächen können.

Zum Ablösen der Zellen werden 7,5ml einer auf 37°C temperierten 0,25%igen Trypsinlösung verwendet. Diese wurde zuvor aus:

- 5ml 2,5%igem Trypsin und
- 45ml phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS)

hergestellt.

Anschließend inkubieren die trypsinierten Zellen bei 37°C für etwa 7 Minuten. Vor dem eigentlichen Ablösen wird unter dem Mikroskop der Ablöseprozess eruiert und gegebenenfalls durch ruckartiges Beklopfen der Zellkulturflasche beschleunigt. Eine zu lange Einwirkzeit des Trypsins ist zu verhindern, um Zellschädigungen zu vermeiden. Zum Stoppen der Trypsinwirkung wird im Verhältnis 1:1 Medium zugesetzt (je 7,5ml). Das darin enthaltene Serum führt zu einem Abstoppen der Trypsinwirkung. Zum Abnehmen der Zellen wird wiederholt der Flaschenboden mit der Zellsuspension gespült. Nun zentrifugiert man die Zellen für 7 Minuten bei 470xg und 4°C. Das Zellpellet wird vom Überstand getrennt und mit 20ml Medium wieder resuspendiert. Je nach Splitratio verteilt man nun die Zellen entsprechend auf Zellkulturflaschen mit vorgelegtem 37°C warmen Medium, um auf ein Endvolumen von 15ml zu kommen. Nach Zugabe der Zellen sollte jede Kulturflasche schleifenförmig bewegt werden, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erzielen. Die Inkubation erfolgt bei 37°C, 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 90%iger Luftfeuchtigkeit. Am Folgetag erfolgt der erste Mediumwechsel. Weitere erfolgen danach in Abhängigkeit der Konfluenz.

##### 2.2.4.2 Keratinozyten

Zum Ablösen der Keratinozyten wird das PromoCell DetachKit2, bestehend aus:

- Hepes BSS (phosphatgepufferte Salzlösung)
- Trypsin/ EDTA
- Trypsin neutralisierende Lösung

verwendet. Dieses muss zuvor mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgewärmt werden. Das alte Medium wird abgenommen und durch mindestens 100µl Hepes BSS pro 1cm<sup>2</sup> ersetzt, welches die Zellen für 15 Sekunden wäscht. Nach Abnahme des Hepes BSS gibt man 100µl Trypsin-EDTA-Lösung pro 1cm<sup>2</sup>, bei einer Flaschengröße von 75cm<sup>2</sup> 7,5ml, auf die Zellen und inkubiert bei Raumtemperatur oder bei 37°C für 7 Minuten. Das Ablöseverhalten wird anschließend lichtmikroskopisch überprüft und gegebenenfalls, mittels Beklopfens der Flasche, forciert. Sind die Keratinozyten größtenteils abgelöst stoppt man die Reaktion mit gleicher Menge an Trypsin neutralisierender Lösung. Die so erhaltenen 15ml, inklusive abgelöster Zellen, werden abgenommen und für 3 Minuten bei 220xg zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Zellen in 1ml Medium resuspendiert und in 5x10<sup>5</sup> Portionen wieder auf neue vorgewärmte Zellkulturflaschen mit 14ml Medium verteilt und bei 37°C inkubiert.

### 2.2.5 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl ist entscheidend zur Beurteilung der Kultivierungsbedingungen. Zu dicht wachsende Stammzellen müssen gesplittet werden, um ein Ausdifferenzieren zu vermeiden. Zu dünn ausgesäte Kulturen wachsen dagegen kaum. Grobe Abschätzungen gelingen unter dem Lichtmikroskop durch Betrachtung der Zellkulturflaschen. Um genauere Aussagen zur Zellzahl treffen zu können, zum Beispiel vor dem Passagieren, müssen genauere Methoden herangezogen werden. Dazu müssen die Zellen abgelöst werden und eine automatische Zellzählung oder Zählung mittels Neubauerzählkammer erfolgen. Als Vorbereitung werden die Zellen abzentrifugiert und in 1-3 ml Medium resuspendiert. Anschließend nimmt man 20µl Zellsuspension ab und vermischt diese im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau.

#### 2.2.5.1 Automatische Zellzählung

Zu der elektronischen Zellzählung wurde der *TC 10 Automated Cell Counter* von Bio-Rad eingesetzt. Jede Zählplatte ist dabei mit zwei Kammern bestückt. Beide sind zu befüllen, um das Ergebnis mitteln zu können. Nach der Zählung erhält man Daten zur Zahl und zum vitalen Anteil der Zellen, sowie eine Übersichtsaufnahme.

### 2.2.5.2 Zählung mittels Neubauerzählkammer

Diese manuelle Methode der Zellzahlbestimmung erfolgt unter Zuhilfenahme einer Neubauerzählkammer. Dazu befüllt man die Kammer zunächst mit 0,9µl gefärbter Zellsuspension und bedeckt sie mit einem Deckplättchen. Dieses sitzt richtig auf, wenn der Newtonring, beziehungsweise die Newtonschen Interferenzfarben, zu sehen sind. Nun sollte das Deckgläschen nicht mehr verrutschen. Die Kammer besteht aus neun 1mm<sup>2</sup> großen Quadraten mit 0,1mm Tiefe, wovon jedes in 16 einzelne, kleinere Quadrate unterteilt werden kann. Zur sicheren Zellzahlbestimmung zählt man mindestens 4 Quadrate aus und mittelt den Wert anschließend. Man betrachtet ein Quadrat bei einer 100-fachen Vergrößerung und zählt es von links oben nach rechts unten aus, wobei beim Wechsel der Zeile jeweils an dem Rand weitergezählt wird, an dem man angekommen ist. Um Doppelzählungen zu vermeiden, zählt man Zellen auf Linien nur aus dem jeweiligen Kästchen mit, wenn diese auf der linken oder Oberseite liegen.

### 2.2.6 Mediumwechsel

Ein Mediumwechsel erfolgte jeweils einen Tag nach dem Auftauen der Zellen und nach dem Splitten.

### 2.2.7 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung von Zellen kann für kürzere Zeit bei -80°C erfolgen. Strebt man eine langfristige Konservierung an sollten die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert werden.

#### 2.2.7.1 USSC

Das Einfriermedium (30ml) muss zunächst angesetzt werden. Dieses besteht aus:

- 50% FCS (20ml)
- 30% DMEM ohne Zusätze (6ml)
- 20% DMSO (4ml).

Eine Lagerung des fertigen Einfriermediums ist bei -4°C möglich.

Das Medium der Zellkultur wird abgenommen und verworfen. Anschließendes Waschen der Zellen mit 15ml PBS. Nach Zugabe von frischem PBS werden die Zellen für 7 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abnahme des PBS gibt man nun 7,5ml 0,25%ige Trypsinlösung auf die USSCs und inkubiert sie bei 37°C für etwa 7 Minuten. Diese

Reaktion muss dann schnell mit 7,5ml Medium abgestoppt werden. Bei Abnahme der Zellen muss der Flaschenboden gut gespült werden, um die letzten adhärenen Zellen zu lösen. Die Zentrifugation erfolgt in einem 50ml Falkontube bei 470xg für 7 Minuten. Nach Abnahme des Überstandes resuspendiert man die Zellen in Medium und stellt sie auf eine Konzentration von  $2,0 \times 10^6$  pro 1ml ein. Danach mischt man die Zellen im Verhältnis 1:1 mit Einfriermedium und stellt dieses für 24h, in einer Einfrierhilfe, wie den Mr. Frosty, in einen  $-80^\circ\text{C}$  Kühlschrank. Im Mr. Frosty werden die Zellen schonend um  $1^\circ\text{C}$  pro Stunde herabgekühlt. Anschließend lagert man die Zellen in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$ .

### 2.2.7.2 Keratinozyten

Zum Kryokonservieren der Keratinozyten wurde ein Einfriermedium aus folgenden Komponenten hergestellt:

- 50% FCS
- 20% DMSO
- 30% Keratinozytenmedium (serumfrei).

Bei einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro 1ml wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 10ml Medium aufgenommen und vermischt.

### 2.2.8 Kokulturen

Verschiedene Modelle der Kokultivierung wurden ausgetestet. Davon wurden zwei etabliert. Die Zellkulturen wurden aus humanen unrestringierten, mesenchymalen Stammzellen und humanen Keratinozyten angelegt.

#### 2.2.8.1 Mikromassen-Modell

Als Mikromassen werden hier Zellagglomerate aus USSCs bezeichnet.

##### 2.2.8.1.1 Zellkultivierung

Diese Versuchsreihe begann mit dem Auftauen von Keratinozyten 7 bis 9 Tage vor dem eigentlichen Kokultur-Beginn. Einen Tag nach dem Auftauen erfolgte ein Mediumwechsel der Keratinozyten, sowie die Inkulturnahme der USSCs. Nach einem Mediumwechsel der USSCs am Folgetag folgte die Inkubation. Bei den USSCs erfolgte

bei einer Zelldichte von 70-90% ein 1:2 Split der Zellen. Einen Tag vor der Kokultivierung wurden dann 1.500.000 Keratinozyten auf eine Petrischale ausgesät und Mikromassen hergestellt (siehe Kapitel 2.2.8.1.2). Die Kokultur begann am Tag 0, an welchem 30 Mikromassen à 60.000 USSCs auf die nun adhärennten Keratinozyten umgesetzt wurden. Am Tag 1 wurden 5ml Medium hinzugegeben. Es erfolgten Bildaufnahmen an den Tagen 1, 2 und 5. Das Ablösen aller Zellen erfolgte an Tag 6. Zum Ablösen der Kokultur wird das DetachKit2 der Keratinozyten verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 3 Minuten bei 220g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Beim Ablösen der Monokultur aus USSCs auf einer Petrischale wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 7,5ml DPBS gespült. Dieses wurde nach einer Einwirkzeit von etwa 15 Sekunden abgenommen und durch 7,5ml 0,25%iges Trypsin ersetzt. Dieses inkubierte für 6-7 Minuten im Brutschrank, bis sich der Großteil der Zellen vom Boden der Petrischale abgelöst hatte. Ein Stopp der Trypsinwirkung wurde durch die Zugabe von 7,5ml Medium erreicht. Mittels eines 28cm Cell Scrapers wurden die letzten, noch adhärennten Zellen, abgelöst und in ein 50ml Falcon Tube überführt. Dieses wurde nun für 7 Minuten bei 1500min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen bei -80°C eingefroren oder direkt zur RNA-Extraktion und der cDNA-Synthese eingesetzt, um eine (qRT-)PCR anzuschließen.

### 2.2.8.1.2 Mikromassen-Herstellung

Mikromassen wurden aus je 60.000 USSCs hergestellt. Dafür wurden die Zellen auf Agarose in 96-Well-Platten ausgesät, was ihnen die Bildung der typischen kugeligen Struktur ermöglicht (siehe Abb. 2).

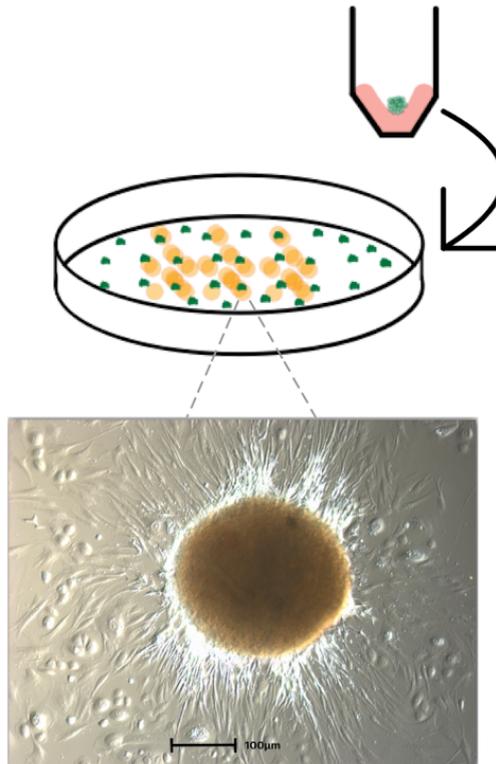
Dazu wurden in eine sterile 100ml Flasche 60ml DMEM (Lonza) und 1,2g Plaque-Agarose ohne Zusätze (Biozym) vermischt und anschließend bei 115°C für 20 Minuten im Autoklav erhitzt und dann bei 80°C bis zur Verwendung temperiert gelagert.

Je 60µl Agarose wurden pro Well pipettiert. Dabei war darauf zu achten Luftblasen zu vermeiden, da diese die Form der Mikromassen beeinflussen können. Das Abkühlen erfolgte bei Raumtemperatur, unter der Sterilbank, für mindestens 2 Stunden.

Die USSCs wurden abgelöst, gezählt und auf 333.333 Zellen pro 1ml eingestellt. 60.000 USSCs wurden pro Well in je 180µl Medium pipettiert, ohne die Agarose mit der Pipettenspitze zu berühren. Dem folgte die Inkubation im Brutschrank bis zum Umsetzen am Folgetag.

Etwa 24 Stunden nach der Mikromassenherstellung konnte ein Umsetzen auf die Petrischalen erfolgen. Dazu wurden 10-15ml des USSCs-Mediums vorgelegt und im Brutschrank inkubiert. Mithilfe einer 1ml Pipette wurden die Mikromassen einzeln aus jedem Well angesaugt und in die vorgewärmten Petrischalen umgesetzt. Insgesamt wurden 30 Mikromassen à 60.000 Zellen entweder auf native Platten oder auf 1,5x10<sup>6</sup>

2D-Keratinocyten, welche am Vortag ausgesät wurden, umgesetzt und anschließend für 24 weitere Stunden inkubiert. Nach dem Wiegen der Petrischalen zeigte sich, dass weniger als 4% FCS mit den USSCs auf die Keratinocytenzellen pipettiert wurden. Am Folgetag erfolgt ein Mediumwechsel der Zellen mit Keratinocytenmedium bei den Kokulturen oder mit USSC-Medium bei den reinen Mikromassenkulturen.



*Abbildung 2: Mikromassenherstellung schematisch und als lichtmikroskopische Aufnahme*

*oben: in grün sind die Mikromassen aus USSCs dargestellt, im Well und auf der Petrischale*

*unten: lichtmikroskopische, ungefärbte Aufnahme einer Mikromasse in Phasenkontrast, aus USSCs.*

Hier ist der Tag 0 dargestellt, an dem die Zellen, aus 2D Keratinocyten und 3D USSC-Mikromassen, in Kokultur gebracht wurden. Auf der Petrischale, mit einem Durchmesser von 10cm, befanden sich seit einem Tag 1,5 Millionen Keratinocyten (in grün dargestellt) welche nun adhären auf dem Flaschenboden lagen. Darauf wurden dann 30 der Mikromassen aus USSCs ausgesät.

#### 2.2.8.2 Scratch-Assay

Bei dem Scratch-Assay handelt es sich um eine gängige Methode um das Migrationsverhalten von Zellen zu untersuchen (Cory 2011). Vorbereitend auf den

Kratzversuch wurden auf Petrischalen jeweils Keratinozyten oder USSCs ausgesät. In die dichten Kulturen werden dann mit einer Pipettenspitze Zellen gerade weggestrichen und abgenommen (siehe Abb. 3). Dabei wurde sich für je 10 *Scratches* über die Horizontale und Vertikale der Petrischale entschieden. Bei engeren Verletzungen lösten sich ganze Quadrate beim Spülen mit PBS ab.

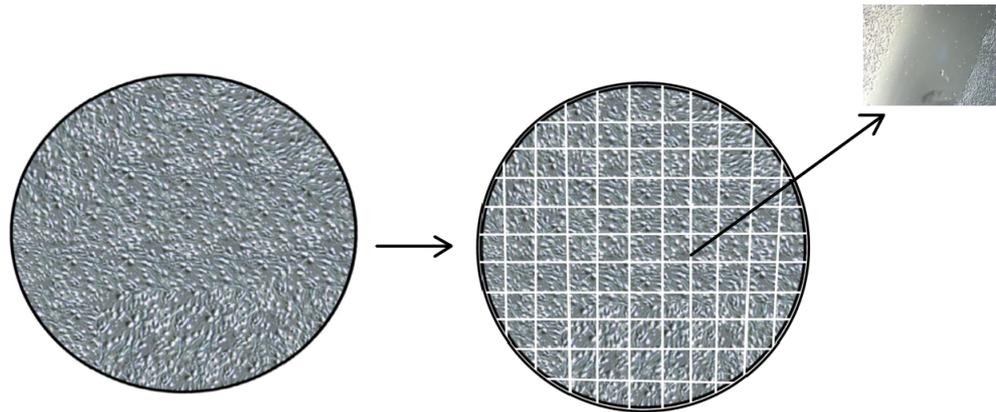


Abbildung 3: Scratch-Assay schematisch dargestellt

Links ist eine Petrischale mit den Keratinozyten schematisch dargestellt. Auf der rechten Platte sind 10x10 Scratches dargestellt. Diese wurden mit einer Pipettenspitze erzeugt. Das dritte Bild stellt einen mikroskopischen Ausschnitt eines Scratches dar.

#### 2.2.8.2.1 Zellkultivierung

Die Zellkultur begann mit der Aussaat der Keratinozyten der Passage vier (P4). Am Tag eins nach der Aussaat erfolgte stets ein Mediumwechsel. Die Zellkultur wurde dann für weitere vier Tage, bis zum nächsten Mediumwechsel, fortgeführt. Am siebten Tag erfolgte ein Ablösen der Zellen.  $0,5 \times 10^6$  Keratinozyten wurden in 1ml Medium auf einer zehn Quadratcentimeter Petrischale mit 9ml Medium ausgesät. Am Folgetag erfolgt ein weiterer Mediumwechsel. Nach vier weiteren Tagen der Inkubation begann der eigentliche Versuch, der als Tag null gezählt wurde.

Parallel zu den Keratinozyten wurden ab dem achten Tag USSCs aufgetaut und ausgesät. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel, gefolgt von weiteren drei Tagen Inkubation, bis zum gemeinsamen Tag null der Kokultur.

#### 2.2.8.2.2 Kokultivierung

Vorbereitend musste das StemMACS MSC Expansion Media Kit XF zusammengesetzt werden. Dazu wurden 100ml StemMACS MSC Expansion Media XF, basal mit 1,4ml 37°C warmem StemMACS MSC Expansion Media XF Supplement vermengt. Das fertige Medium ist so eine Woche bei 2-8°C Lagerung haltbar.

Am Tag 0 erfolgte die Aussaat von  $0,5 \times 10^6$  Keratinozyten P4 auf eine  $10\text{cm}^2$  Petrischale. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel. Am sechsten Tag war eine Konfluenz von 95-100% erreicht, sodass nun sowohl in die vertikale als auch horizontale Richtung jeweils 10 *Scratches*, mit einer 20µl Pipette, erfolgten. Danach wurden die gelösten Zellen abgenommen, die Platte mit DPBS gespült, und das serumfreie (xeno-freie) StemMACS MSC Expansion Media Kit XF human (5ml pro Platte für die Kokultur, 10ml für die nativen Kontroll-Platten) hinzugegeben. Auf die nun *gescratchten* Platten wurden dann  $0,5 \times 10^6$  USSCs je einer Sorte (5/73 oder 8/77) in 1ml Medium ausgesät. Dann folgte ein Auffüllen der Platten mit 4ml StemMACS-Medium (Gesamtmenge von 10ml Medium). Am Tag 1 erfolgte ein Mediumwechsel und am Tag 2 das Ablösen und Einfrieren der Zellen. Danach wurde RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben.

#### 2.2.9 Mikroskopie in Phasenkontrast

Mit dem inversen Mikroskop konnten bei der entsprechenden Blenden- und Objektiveneinstellung Bilder von Zellen in verschiedenen Auflösungen in Phasenkontrast erstellt werden. Diese Mikroskopier-Methode erlaubt eine färbungsfreie Betrachtung der Zellen und liefert unbeeinträchtigte Aufnahmen, da keine weiteren Farbstoffe angewendet werden müssen. Hierdurch lassen sich Artefakte vermeiden, die durch chemische Einflüsse, ein verändertes Bild der Zellen hervorrufen könnten.

#### 2.2.10 RNA-Extraktion

In Vorbereitung zur PCR wurde, sowohl aus den verschiedenen USSCs, als auch aus den Keratinozyten, RNA isoliert, um diese anschließend in cDNA umzuschreiben.

Dazu wurde für beide Zellsorten das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Diese Art der RNA-Extraktion basiert auf der Arbeit von Chomczynski und Sacchi aus dem Jahr 1987. Hierbei werden die Zellen denaturiert, lysiert und homogenisiert.

Diese Methode der RNA-Extraktion eignet sich für Zellpellets bestehend aus maximal  $1 \times 10^7$  Zellen.

In Vorbereitung wurden ein RLT-Gemisch aus je 0,5ml Lysispuffer mit 5µl β-Mercaptoethanol hergestellt. Zu den Zell-Proben mit maximal  $5 \times 10^6$  Zellen wurden 350µl RLT-Gemisch pipettiert. Dieser Schritt dient der Inaktivierung der RNasen. Für

eine bessere Bindung der RNA an die Membran wurde zu der Probe 350µl 70%iger Ethanol gegeben und mit einer Spitze homogenisiert. Das Auswaschen der Kontamination erfolgte nun in mehreren Schritten.

1. Transfer der Probe in eine RNeasy Mini spin column in einem 2 ml collection tube und Zentrifugation, mit verschlossenem Deckel, bei 8000xg, 4°C, für 15 Sekunden. Überstand verwerfen.
2. Für die Arrays mit DNase:
  - 350µl RW1-Puffer in RNeasy column geben. Den Deckel verschließen. Zentrifugation für 15sek bei 8000xg. Den Durchfluss verwerfen.
  - 10µl DNase I stock solution zu 70µl RDD-Puffer hinzufügen. Dies vorsichtig vermischen und zentrifugieren.
  - DNase I incubation mix (80µl) direkt auf die Membran geben, für 15min bei Raumtemperatur (20-30°C) belassen.
  - 350µl RW1-Puffer in RNeasy column geben. Anschließendes Zentrifugieren für 15sek bei 8000xg. Den Durchfluss verwerfen.
3. 700µl RW1-Puffer zugeben und bei 8000xg für 15sek. Durchfluss verwerfen.
4. 500µl RPE-Puffer zugeben und bei 8000xg für 15sek. Durchfluss verwerfen.
5. 500µl RPE-Puffer zugeben und bei 8000xg für 2min. Durchfluss verwerfen.
6. Überführen der RNA in ein 1,5 ml Eppendorf Tube und 30µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran geben und bei 8000xg für eine Minute zentrifugieren, um die RNA zu eluieren. Im collection tube befindet sich nun die RNA, welche in ein neues 1,5ml Eppendorf Tube überführt wird, um diese direkt in cDNA zu überführen oder bei -80°C zu lagern.

Um die Gesamtmenge an gewonnener RNA zu ermitteln, wurden jeweils 5µl RNA mit 95µl aqua dest (Verhältnis 1:20) vermischt und im BioPhotometer analysiert. Die Werte werden auf die zweite Dezimalzahl gerundet.

### 2.2.11 cDNA-Herstellung

Zur cDNA-Herstellung wurde die zuvor gewonnene RNA benötigt. Daraus wird die RNA-Menge in µg/µl berechnet. Dazu wurde der „Nucleic Acids Calculator“ der Internetseite <http://www.kenkyuu.net/js/nacalc.html> verwendet. Nach dieser Bestimmung wurde die Probenmenge, welche 2µg RNA enthält in ein 1,5ml Eppendorf Tube überführt. Die Differenz zu 8µl wurde mit RNase freiem Wasser aufgefüllt.

Die Synthese erfolgte mit Hilfe des Enzyms Superscript II von Invitrogen und zwei zuvor vorbereiteten Mastermischen.

**Mastermix 1:**

Chemikalie	Menge pro Reaktion
Oligo(dT) <sub>12-18</sub>	1 µl
dNTP (jeweils 10 mM)	1 µl
H <sub>2</sub> O (RNase frei)	2 µl
Gesamtmenge	4 µl

Tabelle 9: Mastermix 1 zur cDNA-Synthese

**Mastermix 2:**

Chemikalie	Menge pro Reaktion
5 x first strand buffer	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl
Gesamtmenge	7 µl

Tabelle 10: Mastermix 2 zur cDNA-Synthese

Vorbereitend wurden alle Bestandteile der Mastermixe, bis auf die RNaseOUT, auf Eis aufgetaut und für wenige Sekunden zentrifugiert.

Die RNA wurde mit dem Mastermix 1, in einem 1,5ml Eppendorf Tube, vermengt. Diese 12 µl Volumen wurden nun für 5 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt und zentrifugiert. Nun erfolgte das Zufügen der 7 µl des Mastermixes 2 und die Inkubation bei 42°C für 2 Minuten, um das *Annealing* zu erreichen. Zuletzt erfolgte das Vermischen von 1 µl Superscript II und die erneute Inkubation bei 42°C für 50 Minuten. Die gleiche Probe wurde danach für 15 Minuten bei 70°C inkubiert, um die Inaktivierung des Ansatzes zu erzielen.

Die fertige cDNA wurde dann bei -20°C oder -80°C, bis zur Verwendung in einer qPCR, gelagert.

### 2.2.12 qRT-PCR

Es erfolgten sowohl individuell geplante PCRs mit genspezifischen Sonden, als auch mit Array-Platten der Firma Qiagen.

#### 2.2.12.1 qPCR mit Sonde aus Universal ProbeLibrary

Die Primer mit passenden Sonden wurden mit dem Assay Design Center der Firma Roche geplant (siehe untenstehende Tabelle). Es erfolgte zunächst ein Auftauen der Primer bei Raumtemperatur, die Sonden tauten auf Eis auf. Der Mastermix der Firma Eurogentec

blieb bis zur Verwendung gefroren. Die cDNA wurde, im Reinraum, aufgetaut und abzentrifugiert. Es erfolgte eine 1:4 Verdünnung, bestehend aus 1µl cDNA und 4µl sterilem Wasser. Danach wurde ein Mastermix mit Sonden und Primern der Firma Eurogentec, für einen Ansatz, aus untenstehenden Substraten erstellt. Pro Probe wurden 12,5µl Mastermix benötigt. Diesem wurden je 1µl des ersten und zweiten Primers hinzugegeben, sowie 0,5µl der dazugehörigen Sonden und 5µl steriles H<sub>2</sub>O.

20µl des fertigen Mastermixes wurden, nach dem Zentrifugieren, je Well in die PCR-Platte vorpipettiert. Danach wurden 5µl der verdünnten cDNA oder H<sub>2</sub>O zur Kontrolle, in das entsprechende Well pipettiert und mit einer 25µl Pipette vermischt. Pro Well befanden sich nun 25µl Lösung. Die Platte wurde mit Deckelstrips verschlossen. Zur PCR wurde im Bio-Rad IQ5 ein Basisprotokoll für den Lauf ausgewählt.

Substrat	Menge (µl)
Mastermix	12,5
Primer 1	1
Primer 2	1
Sonde	0,5
H <sub>2</sub> O	5
gesamt	20

*Tabelle 11: Rezeptur zur Herstellung des Mastermixes für die PCR-Well*

Primer	Primersequenz
GAPDH	GAPDH (5' Primer): GCT CTC TGC TCC TCC TGT TC (20mer) GAPDH (3' Primer): ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC (20mer)
hUSP9Y	hUSP9Y (5' Primer): ACC TTG CAA CCT ACA TGA ATA GC (23mer) hUSP9Y (3'-Primer): GCC TCA CTG TTT GTG GAT CA (20mer)

*Tabelle 12: Primer und dazugehörige Sequenz*

*In der linken Spalte befinden sich die verwendeten Primer. Rechts ist die dazugehörige Sequenz aufgeführt. Firma Eurogentec, Köln (D). Verschiedene Primer wurden ausprobiert und GAPDH und hUSP9Y als funktionierende ausgewählt.*

Gen	Sondennummer
GAPDH	60
hUSP9Y	67

Tabelle 13: Gen und dazugehörige Sondennummer

Links sind die verwendeten Sonden mit rechts den dazugehörigen Sondennummern. Firma Eurofins Genomics, Ebersberg (D).

### 2.2.12.2 Genspezifischer Array für den humanen epithelialen zu mesenchymalen Übergang

Vorbereitend für die PCR mit den QIAGEN RT<sup>2</sup> Profiler™ Arrays (PAHS-090ZA) musste ebenfalls RNA wie oben beschrieben extrahiert und in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA-Umwandlung unterschied sich darin, dass die Extraktion mit dem dazugehörigen RT<sup>2</sup> First Strand Kit (QIAGEN), wie unten aufgeführt, erfolgte.

Für eine Arrayplatte wurde zunächst ein Reverse-transcription-Mix bestehend aus den folgenden Substraten angesetzt:

Menge in $\mu$ l	Substrat
4	5x Buffer BC3
1	Control P2
2	RE3
3	H <sub>2</sub> O
10	Gesamtmenge

Tabelle 14: Anleitung zur Herstellung des Reverse-transcription-Mix zur cDNA-Umwandlung

1. Es wurden pro Platte 0,5 $\mu$ l RNA eingesetzt. Die RNA wurde dann mit RNase- und DNase-freiem Wasser auf 8 $\mu$ l aufgefüllt. Dann wurden 2 $\mu$ l GE-Puffer hinzugegeben. Die 10 $\mu$ l wurden mit einer Pipette gemischt und zentrifugiert.
2. Probe für 5 Minuten bei 42°C erhitzen. Danach sofort für mindestens eine Minute auf Eis legen.
3. Reverse-transcription-Mix zum Mischen pipettieren.
4. Exakt 15 Minuten bei 42°C halten.
5. Auf 95°C erhitzen und für 5 Minuten halten.
6. 91 $\mu$ g RNase-freies Wasser zum Mischen hinzu pipettieren.
7. Reaktion auf Eis stellen.
8. Bei -20°C lagern oder sofort zur PCR einsetzen.

Für den Arraylauf wurde cDNA und der RT<sub>2</sub>-Mastermix auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde beides abzentrifugiert. Ein 50ml steriles Falcon Tube wurde bereitgelegt, um anschließend 102µl der cDNA vorzulegen. Danach wurde der RT<sub>2</sub>-Mastermix mit 2x675µl dazu pipettiert und mit 2x624µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Aus den 2700µl wurden 96 Mal je 25µl pro Well abpipettiert. Das Verschließen der Platte erfolgte mit flachen 8-Cap Strips. Nach der Zentrifugation der Arrayplatte für eine Minute bei 1200xg begann die PCR.

Das hierzu gewählte Programm begann zur Aktivierung der Polymerase mit einem Zyklus bei 95°C für 10min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für jeweils 15 Sekunden. Dem folgte ein Zyklus bei 60°C für eine Minute (zur Datengewinnung). Anschließend wurde eine Schmelzkurve generiert.

Die verwendeten RT<sub>2</sub> Profiler Arrays der Firma Qiagen enthalten Gene des epithelialen zum mesenchymalen Übergang (EMT), welche den TGFβ/BMP-Signalweg abbilden. Dabei handelt es sich um sensitive Genexpressions- und Profilierungswerkzeuge zur Analyse von fokussierten Gen-Panels in Signaltransduktion unter Verwendung von Echtzeit-PCR. Jeder Array enthält eine Liste der Pathway-fokussierten Gene sowie fünf Housekeeping-Gene (Referenzgene) im Array. Darüber hinaus enthält jedes Array eine Reihe proprietärer Kontrollen zur Überwachung der genomischen DNA-Kontamination, sowie der Erststrangsynthese und der Echtzeit-PCR-Effizienz (Abbildung 4) (Qiagen, 2012).

Die 96-Well PCR Platten waren mit je 84 signalwegspezifischen Genen, fünf *Housekeeping* Genen, einer genomischen DNA-Kontaminations-Kontrolle und je drei Kontrollen der Reversen Transkription und positiven PCR-Kontrollen bestückt.

Hierbei handelt es sich um Gene des epithelialen zum mesenchymalen Übergang (EMT).

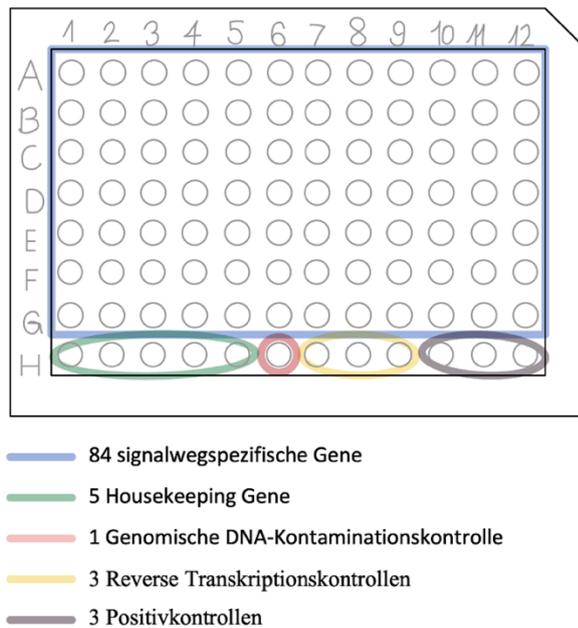


Abbildung 4: Aufbau und Bestückung eines PCR-Arrays (modifiziert nach Qiagen, 2012)

### 2.3 Statistische Methoden

Zur Auswertung der PCR wurden die Werte gegen ihre jeweilige GAPDH normiert. Dann wurde das Delta-Delta-CT bestimmt, um den Unterschied der Expression zwischen den Kulturen angeben zu können. Zur Veranschaulichung der Expressionsänderung um den Faktor  $x$  wurde die Formel  $2^{-\Delta\Delta CT}$  verwendet. Dabei handelt es sich um eine gängige Methode zur Analyse von relativen Expressionsänderungen in einer PCR (Livak und Schmittgen 2001).

Als signifikant verändert definierten wir die Werte, welche mindestens einen Zyklus Abstand, sprich  $2^x$  erfüllten.

### 2.4 Ethikvotum

Ein Ethikvotum der Nummer 5872R der Heinrich-Heine-Universität liegt vor. Dieses wurde am 06.04.2017 erteilt. Die Registrierungsnummer im Studienregister lautet 2017044237.

### 3. Ergebnisse

Um die beiden Zellsorten in Kokultur zu bringen erfolgten zahlreiche Voruntersuchungen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Einzel- und Kokulturen dargestellt. Dabei wurden solche Gene berücksichtigt, bei denen es im Vergleich zu den Einzelkulturen zu einer Hoch- oder Herabregulierung des CT-Wertes in der PCR, normiert auf GAPDH, gekommen war, sodass dies auf den Einfluss der Kokultivierung zurückgeführt werden konnte. Keine Genexpression wurde gänzlich unterdrückt, sodass auf ein Überleben der einzelnen Zelllinien geschlossen werden kann. Die Auswertung erfolgte anhand der Vorgehensweisen die im Kapitel “Material und Methoden“ aufgeführt sind.

#### 3.1 Expression von geschlechtsspezifischer Aktivität humaner, männlicher Zellen

##### USSCs

Es zeigte sich in der PCR durch den Einsatz des Y-chromosomal-spezifischen Primers hUSP9Y (Ubiquitin-specific Protease 9 gene on the Y), eine Überexpression in den Proben der USSC 8/77, wohingegen in den USSC 5/73 keine Antwort nachweisbar war. Somit lässt sich darauf schließen, dass die USSC 8/77 von einem männlichen Spender stammen und die USSC 5/73 von einer weiblichen Spenderin.

##### Keratinocyten

Bei dieser Zellsorte handelt es sich um Keratinocyten (*Normal Human Epidermal Keratinocytes*) eines einzelnen Spenders. Diese wurden von der Firma PromoCell mit einer Zellzahl von je  $> 500000/1\text{ml}$ , eingekauft. Es ist bekannt, dass die Zellen im Rahmen einer Zirkumzision gewonnen wurden, sodass sich auf ein männliches Geschlecht der Zellen schließen lässt.

Es zeigte sich in Vorversuchen, dass ein Beschichten der Petrischalen mit Agarose zur fehlenden Anheftung und Aussprossung der Zellen führt. Somit wurden stets native Platten verwendet.

### 3.2 Kokulturen von Keratinozyten und USSCs im mikroskopischen Phasenkontrast

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich Mikromassen aus USSCs hergestellt, da die Keratinozyten wiederholt keine stabilen Mikromassen bildeten und sich somit nicht umsetzen ließen. Damit war das ursprüngliche 3D-Modell nicht tragfähig. Es wurden daher Keratinozytenlayer erstellt.

Der Scratch-Versuch zielte darauf ab, beiden Zellsorten Kontakt zur Platte zu ermöglichen. Keratinozyten erfüllen diese Aufgabe der Adhäsion durch ihre *tight junctions*.

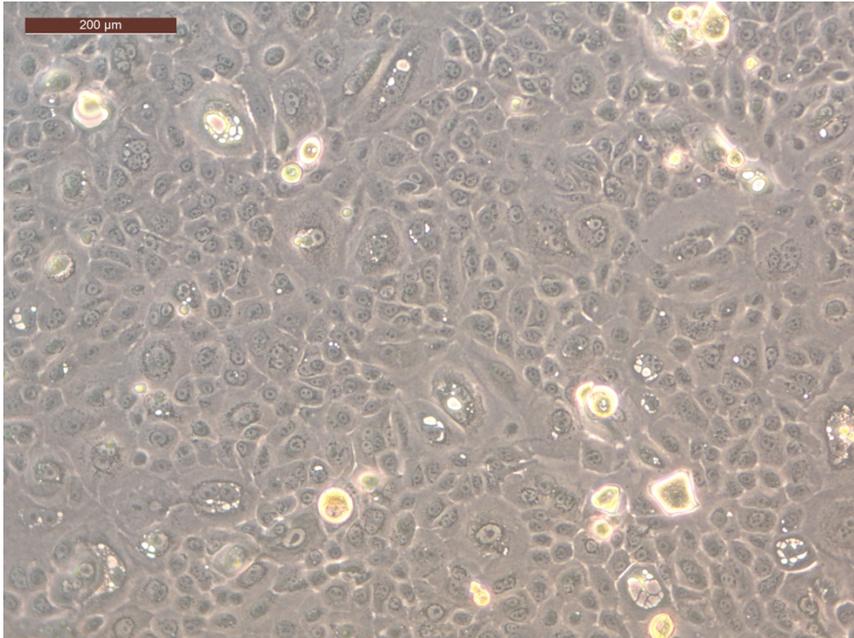
Eine lichtmikroskopische, native Bildaufnahme in Phasenkontrast der Zellkulturen erfolgte jeweils an Tag 0, 1 und 5.

Die Keratinozyten und USSC-Mikromassen sind nach jeweils einem Tag nach der Aussaat adhärent an Ihrem Untergrund. Die Mikromassen können sich sowohl auf den nativen Petrischalen immobilisieren als auch auf den, einen Tag zuvor ausgesäten, Keratinozyten-Schichten.

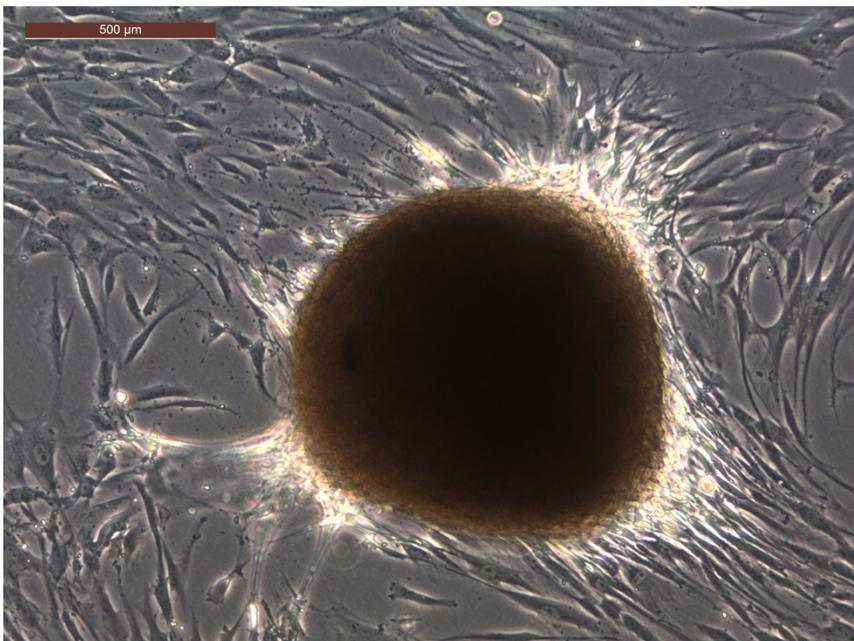
Am Tag 1 des Versuchs ist bereits ein Aussprossen der USSCs aus den Mikromassen zu beobachten. Mikromassen, welche nicht auf Keratinozyten liegen, scheinen am Tag 1 stärker und weiter auszusprossen. Es ließ sich beobachten, dass USSCs der Sorte 5/73 (weiblich) zum Teil weiter aussprossen als Zellen der Sorte 8/77 (männlich).

USSCs sprossen, auf nativem Untergrund, zum Teil kreisrund und zum Teil nur an einer Seite aus. Dies kann auf die Freiräume auf der Petrischale zurückzuführen sein. Die Zellen verschließen Lücken, ehe sie sich übereinanderlegen.

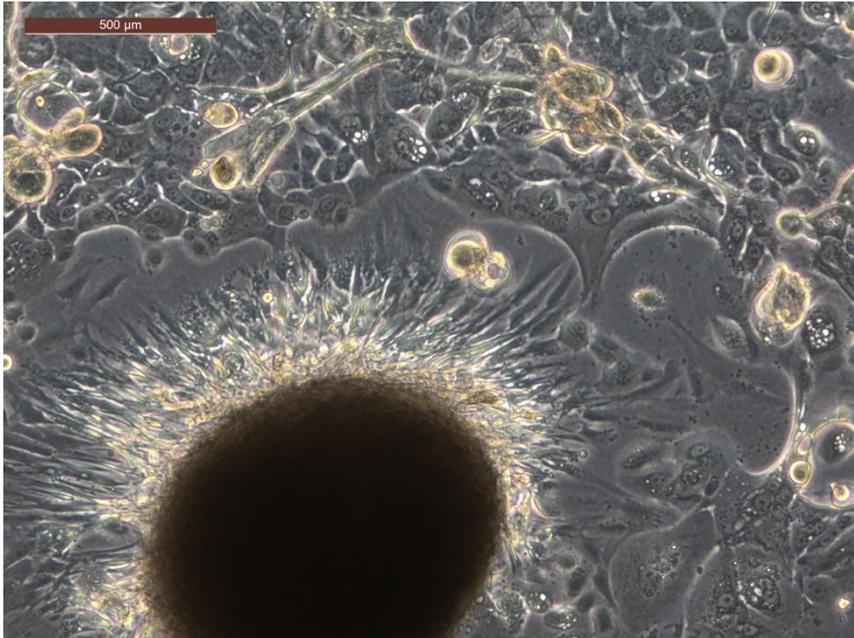
Die 3D-Mikromassen der USSCs konnten sich auf dem Keratinozytenlayer immobilisieren und zeigten in der mikroskopischen Untersuchung ein Auswandern der Zellen aus den Agglomeraten.



*Abbildung 5: Keratinozyten (ungefärbt) in Phasenkontrast, in 100facher Vergrößerung  
Keratinozyten an Tag 15 einer Kultur. Vor dem Ablösen zur Aussaat auf die Petrischalen  
zur Kokultur. Konfluenz von etwa 80-90%.*

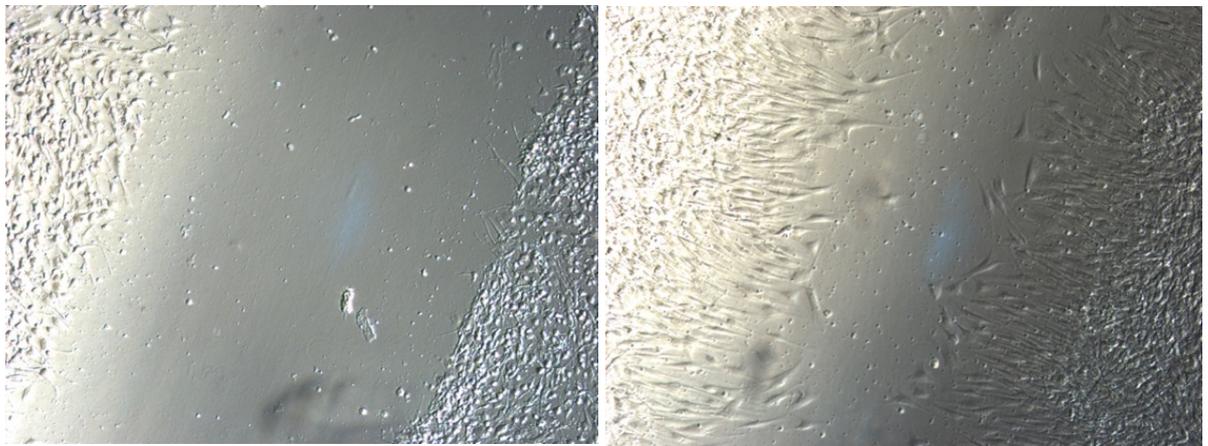


*Abbildung 6: USSC-Mikromasse (ungefärbt) in Phasenkontrast, in 100facher  
Vergrößerung  
USSC 5/73-Mikromasse an Tag 5 nach Umsetzen und Aussaat der Mikromasse auf  
nativer Petrischale.*



*Abbildung 7: 3D-USSC-Mikromasse auf 2D-Keratinozytenlayer (ungefärbt) in Phasenkontrast, in 100facher Vergrößerung*

*Es zeigt sich, an Tag 5 nach der Aussaat, ein Aussprossen der USSC-Mikromasse. Dabei bilden die Zellen ein „Netz“ zwischen den Keratinozyten.*



*Abbildung 8: Scratch-Versuch (ungefärbt) in Phasenkontrast, in 100facher Vergrößerung*

*Kokultur aus 2D-Keratinozytenlayer und USSC-Zellsuspension unmittelbar nach dem Scratch an Tag 0 (links) und mit beginnender Aussprossung an Tag 1 (rechts).*

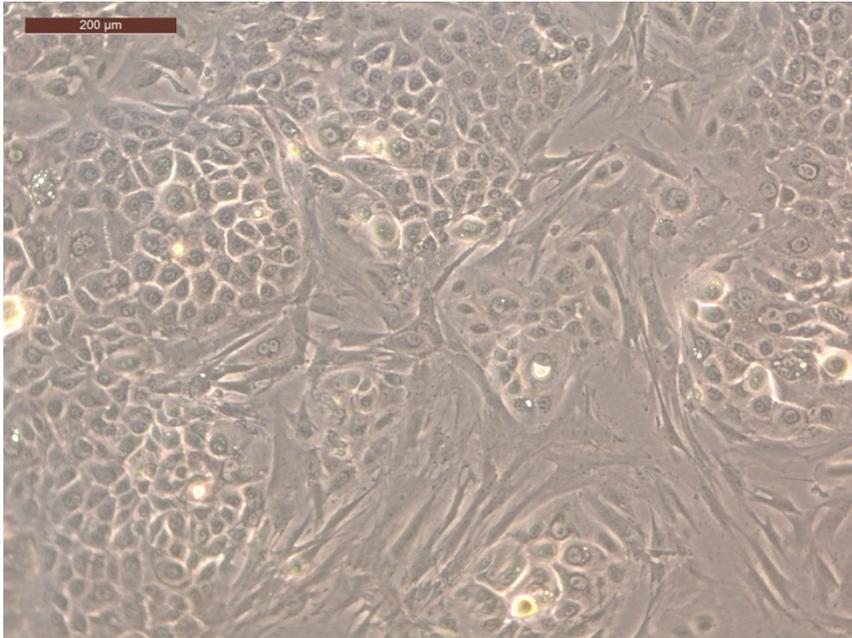


Abbildung 9: Kokultur aus USSCs und 2D-Keratinozytenlayer (ungefärbt) im Scratch-Versuch, in 100facher Vergrößerung

Es zeigen sich netzartige Verbindungen der USSCs untereinander und zwischen den Keratinozyten.

### 3.3 Evaluierung von Genexpressionen mittels RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array

Die Auswertung der Daten der RT<sup>2</sup> Profiler PCRs erfolgte unter anderem auf der Seite von Qiagen unter folgendem Link: <https://geneglobe.qiagen.com/de/analyze>.

Für alle PCR-Ergebnisse wurde ein *Threshold cycle* von 85 festgelegt. In der Tabelle 15 sind die jeweiligen Gene anhand Ihrer Position auf den Arrayplatten, in abgekürztem und vollständigem Namen, dargestellt. Die für diese Arbeit interessanten Gene wurden **fett** markiert und werden in Folgenden Kapiteln näher aufgeführt.

Zur Auswertung wurden zwei bis drei unabhängige, biologische Proben statistisch zusammengefasst und der Mittelwert bestimmt. Dabei wurden die CT-Werte normiert auf Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Entscheidung fiel hierbei auf die GAPDH, da sie auf den Arrays als *House-keeping* Gen aufgeführt und in der Qualitätsanalyse des Auswertungsprogrammes vorgeschlagen wurde. Dabei handelt es sich um ein Enzym der Glykolyse.

Insgesamt haben alle als konstant angenommenen Gene den Qualitätstest durch das Programm bestanden. Diese Art der Auswertung wurde gewählt da die hohen Expressionslevel der Strukturproteine nicht darstellbar gewesen wären. Die Signalmoleküle steigen nicht so stark an, wodurch sie gut dargestellt werden können. Dieser Effekt beruht also auf der Signalwirkung.

Betrachtet wurde dann auch die Expression von stammzell- und keratiozytenspezifischen Genen in den Kokulturen gegenüber den einzelnen Monokulturen nach 9 Tagen.

<b>Position</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Name</b>
<b>A01</b>	<b>AHNAK</b>	<b>AHNAK nucleoprotein</b>
A02	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A03	BMP1	Bone morphogenetic protein 1
A04	BMP2	Bone morphogenetic protein 2
A05	BMP7	Bone morphogenetic protein 7
A06	CALD1	Caldesmon 1
A07	CAMK2N1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
A08	CAV2	Caveolin 2
A09	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
A10	CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
A11	COL1A2	Collagen, type I, alpha 2
A12	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1
B01	COL5A2	Collagen, type V, alpha 2
B02	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1,88kDa
B03	DSC2	Desmocollin 2
B04	DSP	Desmoplakin
<b>B05</b>	<b>EGFR</b>	<b>Epidermal growth factor receptor</b>
B06	ERBB3	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
B07	ESR1	Estrogen receptor 1
B08	F11R	F11 receptor
B09	FGFBP1	Fibroblast growth factor binding protein 1
B10	FN1	Fibronectin 1
B11	FOXC2	Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)
B12	FZD7	Frizzled family receptor 7
C01	GNG11	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11
C02	GSC	Goosecoid homeobox
C03	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta
C04	IGFBP4	Insulin-like growth factor binding protein 4
<b>C05</b>	<b>IL1RN</b>	<b>Interleukin 1 receptor antagonist</b>
C06	ILK	Integrin-linked kinase
C07	ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)

C08	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
C09	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
C10	JAG1	Jagged 1
C11	KRT14	Keratin 14
C12	KRT19	Keratin 19
D01	KRT7	Keratin 7
D02	MAP1B	Microtubule-associated protein 1B
D03	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
D04	MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
D05	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
D06	MSN	Moesin
D07	MST1R	Macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)
D08	NODAL	Nodal homolog (mouse)
D09	NOTCH1	Notch 1
D10	NUDT13	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 13
D11	OCLN	Occludin
D12	PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
E01	PLEK2	Pleckstrin 2
E02	DESI1	PPPDE peptidase domain containing 2
E03	PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2
E04	PTP4A1	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1
E05	RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
E06	RSG2	Regulator of G-protein signaling 2, 24kDa
E07	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
E08	GEMIN2	Survival of motor neuron protein interacting protein 1
E09	SMAD2	SMAD family member 2
E10	SNAI1	Snail homolog 1 (Drosophila)
E11	SNAI2	Snail homolog 2 (Drosophila)
E12	SNAI3	Snail homolog 3 (Drosophila)

F01	SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10
F02	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
F03	SPP1	Secreted phosphoprotein 1
F04	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
F05	STEAP1	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1
F06	TCF3	Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
F07	TCF4	Transcription factor 4
F08	TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2
F09	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
<b>F10</b>	<b>TGFB2</b>	<b>Transforming growth factor, beta 2</b>
F11	TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
F12	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
<b>G01</b>	<b>TMEFF1</b>	<b>Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1</b>
G02	TMEM132A	Transmembrane protein 132A
G03	TSPAN13	Tetraspanin 13
G04	TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)
G05	VCAN	Versican
G06	VIM	Vimentin
G07	VPS13A	Vacuolar protein sorting 13 homolog A (S. cerevisiae)
G08	WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11
G09	WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
G10	WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B
G11	ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
G12	ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2
H01	ACTB	Actin, beta
H02	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	RTC	Reverse Transcription Control
H08	RTC	Reverse Transcription Control
H09	RTC	Reverse Transcription Control

H10	PPC	Positive PCR Control
H11	PPC	Positive PCR Control
H12	PPC	Positive PCR Control

Tabelle 15: Gene des EMT-Arrays der Firma Qiagen (modifiziert nach Qiagen 2013)

Die Kontroll-Gene sind in grau dargestellt. Die in diesen Versuchen relevant veränderten Gene sind **fett** angegeben.

### 3.3.1 Relevante Expressionsänderung der Mikromassen-Kokultur

Im Rahmen der Auswertung zeigte sich, dass die Expressionsniveaus der Kokulturen in der Regel einen Mittelwert aus den Niveaus der Einzelkulturen bildeten. Die folgenden Gene fielen dabei auf, da sie Werte aufwiesen, die nicht durch eine reine Mischung der Einzelkulturen zu erklären war. Die ermittelten Delta-CT-Werte zeigten sich dabei, normiert gegen GAPDH, hoch- oder runterreguliert. Es wurden also nur solche Gene als relevant verändert gewertet, welche höher oder niedriger als die reinen Ausgangskulturen waren, sodass auf eine Beeinflussung der Zellen in Mischkultur geschlossen werden konnte.

#### 3.3.1.1 AHNAK Nukleoprotein (AHNAK)

In den Mikromassenkokulturen zwischen USSC-Mikromassen der Zellsorten USSC 5/73 und USSC 8/77 und 2D-Keratinocyten kam es zu einer Hochregulierung vom AHNAK Nukleoprotein im Vergleich zu den Einzelkulturen (siehe Abb. 10 & 11). Dabei kam es in der Kokultur im Vergleich zu den Einzelkulturen mit den USSC 5/73 zu einer Hochregulierung um das 3.34-fache und im Vergleich zu den USSC 8/77 um das 3.27-fache. Im Vergleich zu den Keratinocyten kam es in der Kokultur zu einer Hochregulierung um das 2.14-fache, bzw. 2.38-fache (siehe Tab. 16).

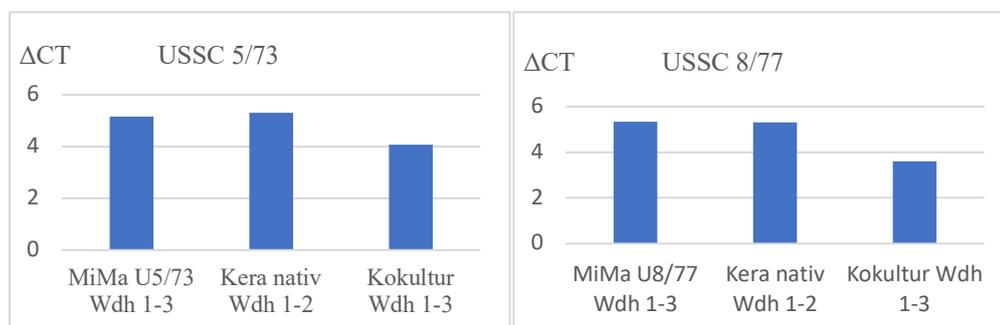


Abbildung 10: Delta-CT-Werte vom AHNAK Nukleoprotein

Delta-CT-Werte normiert gegen GAPDH auf der y-Achse. Auf der x-Achse: Links Mikromassen, mittig Keratinocyten und rechts Kokultur. Dabei handelt es sich um die

Mittelwerte aus den Wiederholungen 1-2 bei den Keratinozyten und 1-3 bei den anderen. Es zeigt sich eine Hochregulierung von AHNAK Nukleoprotein in der Kokultur, gegenüber den Einzelkulturen, im Versuch mit beiden USSC-Sorten.

Kultur	USSC 5/73	USSC 8/77
	CT-Wert gegen GAPDH ( $\Delta CT$ )	
USSC-MiMa Wdh 1-3	5.16	5.35
Kera nativ Wdh 1-2	5.32	5.32
Kokultur Wdh 1-3	4.06	3.61
	Delta-Delta-CT ( $\Delta\Delta CT$ )	
USSC-MiMa gegen Kokultur	-1.1	-1.74
Kera nativ gegen Kokultur	-1.25	-1.71
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	
USSC-MiMa gegen Kokultur	2.14	3.34
Kera nativ gegen Kokultur	2.38	3.27

Tabelle 16:  $\Delta CT$ ,  $\Delta\Delta CT$  und  $2^{-\Delta\Delta CT}$  vom AHNAK-Nukleoprotein

In der linken Spalte sind die Kulturen aufgetragen. Rechts (von oben nach unten) die CT-, die  $\Delta\Delta CT$ -Werte und die x-fache Änderung der Expression ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Jeweils normiert auf das Referenzgen GAPDH.

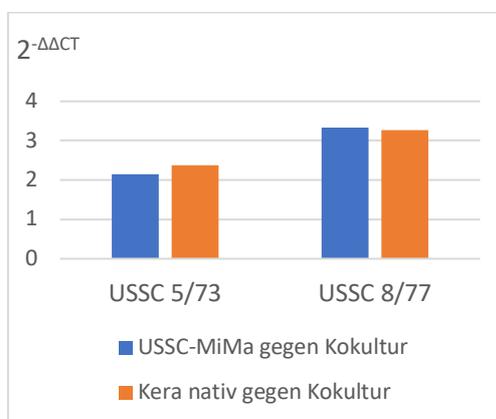


Abbildung 11:  $2^{-\Delta\Delta CT}$  vom AHNAK-Nukleoprotein

Auf der x-Achse sind die Einzelkulturen gegenüber den Kokulturen aufgeführt. Die Y-Achse gibt den Fold-Change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) an. Es zeigt sich eine Hochregulierung vom AHNAK Nukleoprotein im Vergleich zu beiden Einzelkulturen.

## 3.3.1.2 Epidermal growth factor receptor (EGFR)

EGFR war in beiden Kokulturen aus U5/73 und U8/77 hochreguliert. Dies zeigte sich in einem niedrigeren CT-Wert für die Kokultur im Vergleich zu den Einzelkulturen in der Abb. 12. Dabei ist die Expression im Gegensatz zu den USSC-Einzelkulturen um das 3.76- bzw. 1.67-fache erhöht. Zu einer besonders hohen Expressionssteigerung kommt es im Vergleich von der Keratinozytenreinkultur zur Kokultur mit den männlichen Nabelschnurblutzellen mit einem  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert von 9.25 (siehe Tab. 17 und Abb. 13).

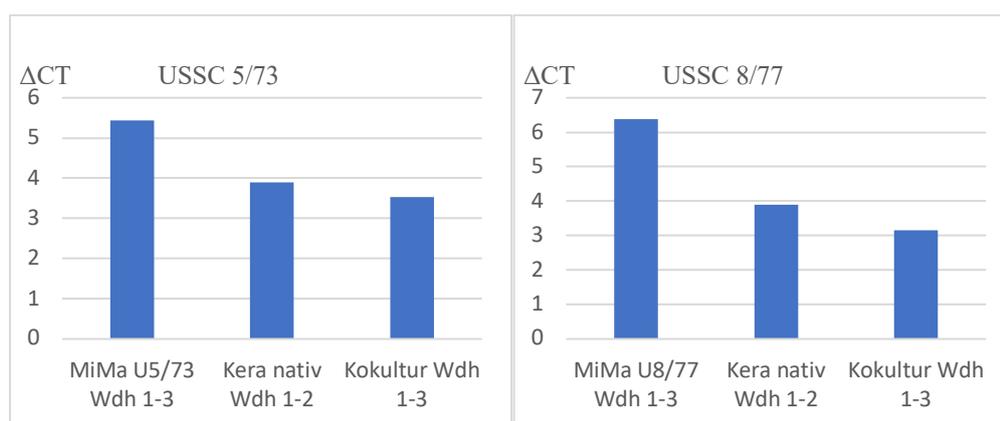


Abbildung 12: Delta-CT-Werte für EGFR

Delta-CT-Werte normiert gegen GAPDH auf der y-Achse. Auf der x-Achse: Links Mikromassen, mittig Keratinozyten und rechts Kokultur. Dabei handelt es sich um die Mittelwerte aus den Wiederholungen 1-2 bei den Keratinozyten und 1-3 bei den anderen. Es zeigt sich eine Hochregulierung von EGFR in der Kokultur, gegenüber den Einzelkulturen, im Versuch mit beiden USSC-Sorten.

Kultur	USSC 5/73	USSC 8/77
	CT-Wert gegen GAPDH ( $\Delta CT$ )	
USSC-MiMa Wdh 1-3	5.44	6.37
Kera nativ Wdh 1-2	3.9	3.9
Kokultur Wdh 1-3	3.53	3.16
	Delta-Delta-CT ( $\Delta\Delta CT$ )	
USSC-MiMa gegen Kokultur	-1.91	-0.74
Kera nativ gegen Kokultur	-0.37	-3.21
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	
USSC-MiMa gegen Kokultur	3.76	1.67
Kera nativ gegen Kokultur	1.29	9.25

Tabelle 17:  $\Delta CT$ ,  $\Delta\Delta CT$  und  $2^{-\Delta\Delta CT}$  für EGFR

In der linken Spalte sind die Kulturen aufgetragen. Rechts (von oben nach unten) die CT-, die  $\Delta\Delta CT$ -Werte und die  $x$ -fache Änderung der Expression ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Jeweils normiert auf das Referenzgen GAPDH.

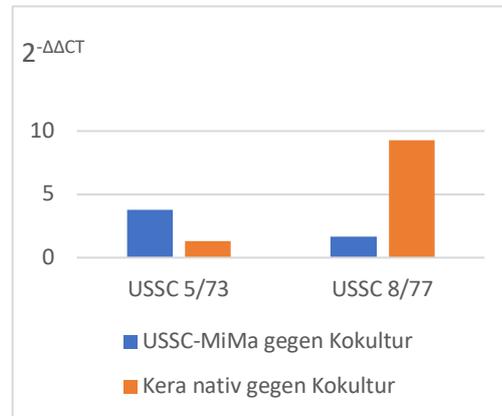


Abbildung 13:  $2^{-\Delta\Delta CT}$  für EGFR

Auf der x-Achse sind die Einzelkulturen gegenüber den Kokulturen aufgeführt. Die Y-Achse gibt den Fold-Change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) an. Es zeigt sich eine Hochregulierung vom EGFR im Vergleich zu beiden Einzelkulturen.

### 3.3.1.3 Interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN)

IL1RN war im Vergleich zu den Einzelkulturen deutlich hochreguliert (siehe Abb. 14 & 15). Dabei lag die Expressionssteigerung im Vergleich von Kokultur zu der Mikromasseneinzelkultur um das 268.73-, bzw. 2062.24-fache. Im Gegensatz dazu kam es im Vergleich von Kokultur zu Keratinozytenreinkultur zu einer 2.07-, bzw. 3.76-fachen Steigerung der IL1RN-Expression (siehe Tab. 18).

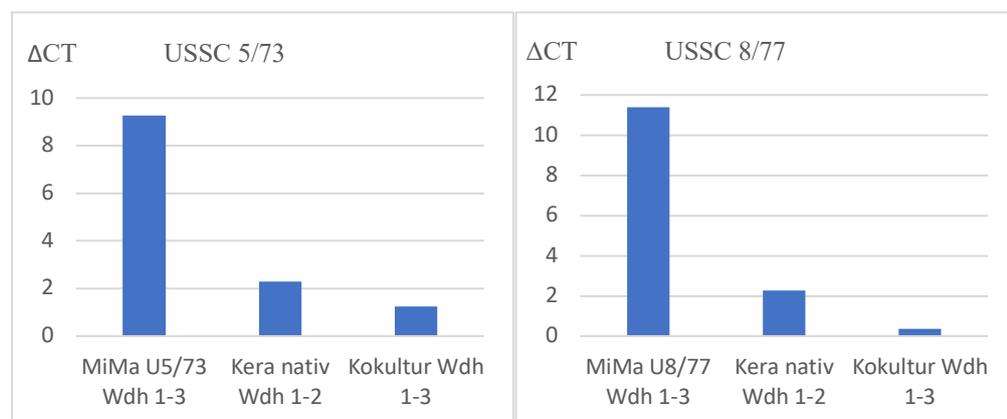


Abbildung 14: Delta-CT-Werte für IL1RN

Delta-CT-Werte normiert gegen GAPDH auf der y-Achse. Auf der x-Achse: Links Mikromassen, mittig Keratinozyten und rechts Kokultur. Dabei handelt es sich um die Mittelwerte aus den Wiederholungen 1-2 bei den Keratinozyten und 1-3 bei den anderen. Es zeigt sich eine Hochregulierung von IL1RN in der Kokultur, gegenüber den Einzelkulturen, im Versuch mit beiden USSC-Sorten.

Kultur	USSC 5/73	USSC 8/77
	CT-Wert gegen GAPDH ( $\Delta$ CT)	
USSC-MiMa Wdh 1-3	9.27	11.39
Kera nativ Wdh 1-2	2.29	2.29
Kokultur Wdh 1-3	1.24	0.38
	Delta-Delta-CT ( $\Delta\Delta$ CT)	
USSC-MiMa gegen Kokultur	-8.07	-11.01
Kera nativ gegen Kokultur	-1.05	-1.91
	$2^{-\Delta\Delta$ CT}	
USSC-MiMa gegen Kokultur	268.73	2062.24
Kera nativ gegen Kokultur	2.07	3.76

Tabelle 18:  $\Delta$ CT,  $\Delta\Delta$ CT und  $2^{-\Delta\Delta$ CT für IL1RN

In der linken Spalte sind die Kulturen aufgetragen. Rechts (von oben nach unten) die CT-, die  $\Delta\Delta$ CT-Werte und die x-fache Änderung der Expression ( $2^{-\Delta\Delta$ CT). Jeweils normiert auf das Referenzgen GAPDH.

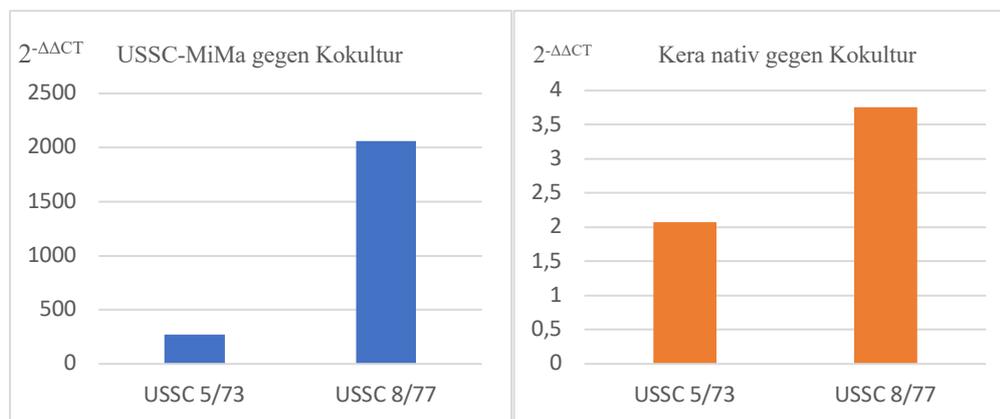


Abbildung 15:  $2^{-\Delta\Delta$ CT für IL1RN

Auf der x-Achse sind die Einzelkulturen gegenüber den Kokulturen aufgeführt. Die y-Achse gibt den Fold-Change ( $2^{-\Delta\Delta$ CT) an. Es zeigt sich eine massive Hochregulierung von IL1RN im Vergleich zu der Einzelkultur mit Mikromassen. Aufgrund der vergleichsweise massiven Hochregulierung im Vergleich zu den USSC-Mikromassen, im Gegensatz zu den Keratinozyten, wurden 2 Diagramme zur Darstellung gewählt.

### 3.3.1.4 Transforming growth factor, beta 2 (TGF $\beta$ 2)

TGF  $\beta$ 2 war in beiden Kokulturen im Vergleich zu den Einzelkulturen herabreguliert (siehe Abb. 17 und Tab. 19). Dabei lag der Delta-CT-Wert jeweils über denen der beiden Ausgangskulturen aus USSCs oder Keratinozyten. Im Vergleich zur den Einzelkulturen war in den Monokulturen aus USSCs nur die 0.13-, bzw. 0.4-fache Expression, im Vergleich zu den aus Keratinozyten nur die 0.38-, bzw. 0.35-fache Expression nachweisbar. Zur besseren Veranschaulichung der Runterregulierung wird auch ergänzend die entsprechende x-fache Herabregulierung der Expression angegeben (siehe Tab. 19). Diese entspricht in der Kokultur im Vergleich zur Monokultur aus USSCs einer Herabregulierung um das 7.69-, bzw. 2.5-fache. Im Vergleich zur Keratinozytenreinkultur ist es in der Kokultur zu einer Herabregulierung von TGF  $\beta$ 2 um das 2.63-, bzw. 2.86-fache gekommen (siehe Tab. 19).

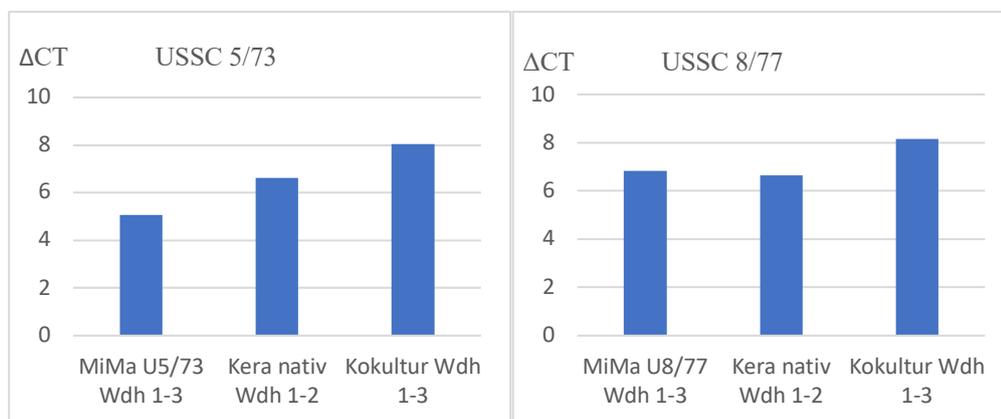


Abbildung 16: Delta-CT-Werte von TGF  $\beta$ 2

*Herabregulierung von TGF-beta2 in der Kokultur gegenüber den Einzelkulturen aus reinen Keratinozyten in 2D und der USSCs-Mikromassen (5/73 und 8/77). Auf der y-Achse des Diagramms ist der positive CT-Shift (normiert auf GAPDH) der Kokulturen im Vergleich zu der Monokultur abzulesen.*

<b>Kultur</b>	<b>USSC 5/73</b>	<b>USSC 8/77</b>
	<b>CT-Wert gegen GAPDH (<math>\Delta CT</math>)</b>	
USSC-MiMa Wdh 1-3	5.06	6.82
Kera nativ Wdh 1-2	6.64	6.64
Kokultur Wdh 1-3	8.04	8.16
	<b>Delta-Delta-CT (<math>\Delta\Delta CT</math>)</b>	
USSC-MiMa gegen Kokultur	2.98	1.33
Kera nativ gegen Kokultur	1.41	1.53
	<b><math>2^{-\Delta\Delta CT} \triangleq x</math>-fache Änderung</b>	
USSC-MiMa gegen Kokultur	$0.13 \triangleq -7.69$	$0.4 \triangleq -2.5$
Kera nativ gegen Kokultur	$0.38 \triangleq -2.63$	$0.35 \triangleq -2.86$

Tabelle 19:  $\Delta CT$ ,  $\Delta\Delta CT$  und  $2^{-\Delta\Delta CT}$  für TGF  $\beta 2$

In der linken Spalte sind die Kulturen aufgetragen. Rechts (von oben nach unten) die CT-, die  $\Delta\Delta CT$ -Werte und die x-fache Änderung der Expression ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Jeweils normiert auf das Referenzgen GAPDH.

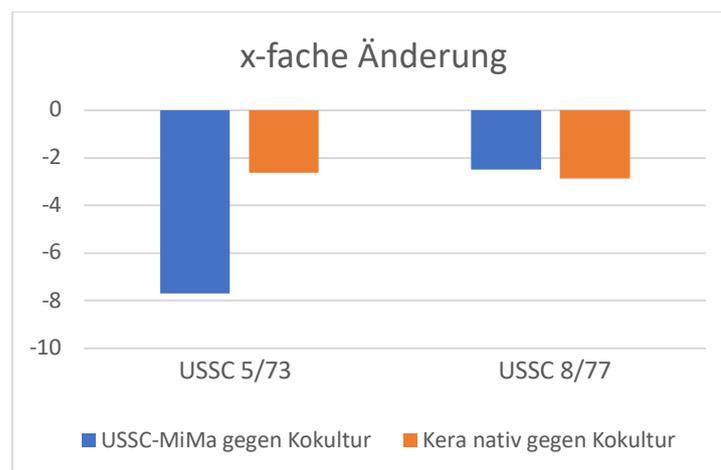


Abbildung 17: x-fache Änderung von TGF  $\beta 2$

Auf der x-Achse sind die Einzelkulturen gegenüber den Kokulturen aufgeführt. Die Y-Achse gibt die x-fache Änderung an. Es zeigt sich eine Herabregulierung vom TGF  $\beta 2$  im Vergleich zu beiden Einzelkulturen.

Die Expression ist in der Kokultur im Vergleich zu beiden Monokulturen herabreguliert. Dies lässt auf die interzelluläre Kommunikation schließen und weist damit auf eine korrespondierende Entwicklung im Modell hin.

### 3.3.1.5 Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1 (TMEFF1)

TMEFF1 war in beiden Kokulturen im Vergleich zu den Einzelkulturen herabreguliert (siehe Abb. 19). Dabei lag der Delta-CT-Wert jeweils über denen der beiden Ausgangskulturen aus USSCs oder Keratinozyten. Im Vergleich zur Kokultur war in den Monokulturen aus USSCs nur die 0.42-, bzw. 0.38-fache Expression, in den Keratinozytenmonokulturen nur die 0.62-, bzw. 0.47-fache Expression nachweisbar. Dies entspricht einer Absenkung der Expression in der Kokultur im Vergleich zur Mikromassenkultur um das 2.38-, bzw. 2.63-fache und im Vergleich zur Keratinozytenkultur um das 1.61-, bzw. 2.13-fache (siehe Tab. 20).

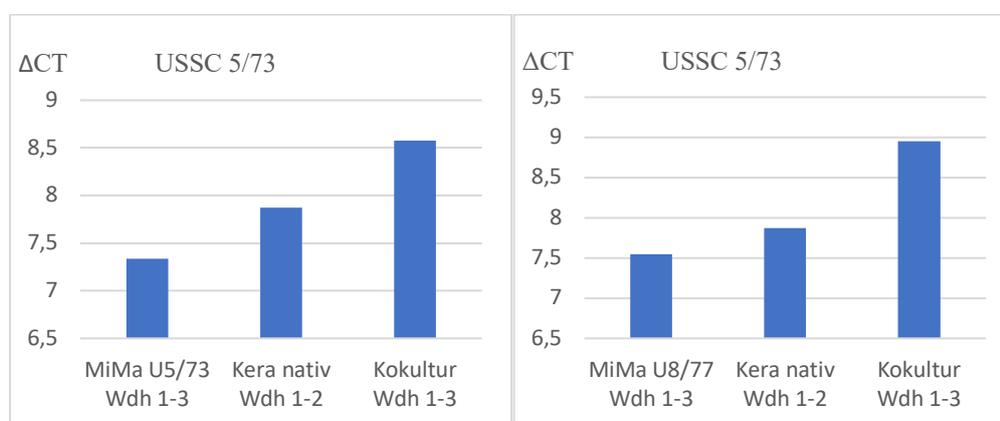


Abbildung 18: Delta-CT-Werte von TMEFF1

Herabregulierung von TMEFF1 in der Kokultur gegenüber den Einzelkulturen aus reinen Keratinozyten in 2D und der USSC-Mikromassen (5/73 und 8/77). Auf der y-Achse des Diagramms ist der positive CT-Shift (normiert auf GAPDH) der Kokulturen im Vergleich zu der Monokultur abzulesen.

Kultur	USSC 5/73	USSC 8/77
	CT-Wert gegen GAPDH ( $\Delta$ CT)	
USSC-MiMa Wdh 1-3	7.34	7.54
Kera nativ Wdh 1-2	7.88	7.88
Kokultur Wdh 1-3	8.57	8.95
	Delta-Delta-CT ( $\Delta\Delta$ CT)	
USSC-MiMa gegen Kokultur	1.24	1.41
Kera nativ gegen Kokultur	0.7	1.08
	$2^{-\Delta\Delta$ CT} $\triangleq$ x-fache Änderung	
USSC-MiMa gegen Kokultur	0.42 $\triangleq$ -2.38	0.38 $\triangleq$ -2.63
Kera nativ gegen Kokultur	0.62 $\triangleq$ -1.61	0.47 $\triangleq$ -2.13

Tabelle 20:  $\Delta$ CT,  $\Delta\Delta$ CT und  $2^{-\Delta\Delta$ CT von TMEFF1

In der linken Spalte sind die Kulturen aufgetragen. Rechts (von oben nach unten) die CT-, die  $\Delta\Delta CT$ -Werte und die  $x$ -fache Änderung der Expression ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Jeweils normiert auf das Referenzgen GAPDH.

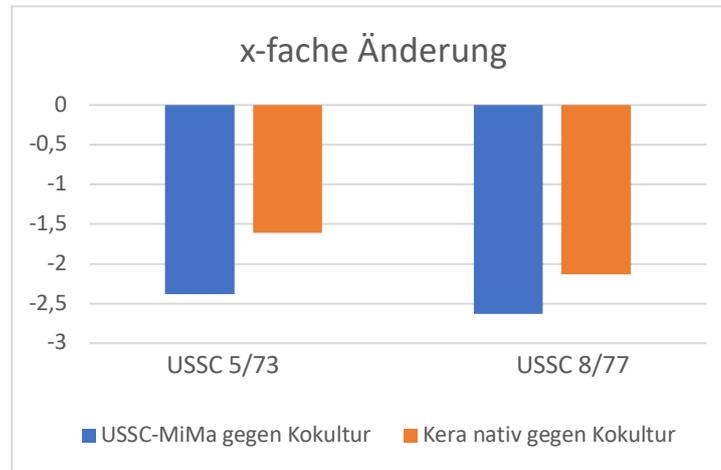


Abbildung 19:  $x$ -fache Änderung von TMEFF1

Auf der  $x$ -Achse sind die Einzelkulturen gegenüber den Kokulturen aufgeführt. Die  $Y$ -Achse gibt die  $x$ -fache Änderung an. Es zeigt sich eine Herabregulierung vom TMEFF1 im Vergleich zu beiden Einzelkulturen.

### 3.3.2 Scratch-Versuch-Kokultur

Für die Darstellung einer alternativen Herangehensweise, eine Kokultur zu etablieren, wurde in die bereits konfluente Keratinozytenkultur durch Abtragen des Zellrasens in einem gitterartiges Muster Platz für die Anheftung von USSCs geschaffen. In diesem Scratchversuch ergaben sich keine signifikanten, reproduzierbaren Veränderungen der Genexpression. Es zeigte sich lichtmikroskopisch ein Verschluss der *Scratches* über die Kulturzeit, sodass qualitativ auf das Überleben der Zellen geschlossen werden kann.

## 4. Diskussion

Trotz der Verfügbarkeit verschiedener Hautmodelle und zahlreicher Therapiemöglichkeiten in der Wundversorgung, stellen ausgedehnte Hautverletzungen weiterhin eine große Herausforderung für die Medizin und das Gesundheitssystem dar. Ebenso fehlt es an Behandlungen, welche eine Restitutio ad integrum erzielen können. In Bezug auf die Wundheilung gilt es nicht nur, die Hautbarriere wiederherzustellen, sondern auch deren Elastizität und Ästhetik, was durch dauerhafte Narbenbildung oft nicht gegeben ist. Es besteht hier ein weiterer Bedarf nach Forschung, vor allem zur Versorgung ausgedehnter Verletzungen und zur Reduktion der Narbenbildung. Nabelschnurblutstammzellen wurden in diesem Zusammenhang bisher kaum erforscht, weshalb sie für dieses Modell ausgewählt wurden. Im Folgenden soll die Kokultivierung von USSCs und Keratinozyten als Basis von Hautmodellen diskutiert werden. Dabei werden diese experimentellen Ergebnisse im Hinblick auf ihr Potential und ihre Limitationen betrachtet. Zunächst werden die Gene beleuchtet, bei denen es im Vergleich von den Einzelkulturen zum Niveau in den Kokulturen zu einer Herauf- oder Herabregulierung der Genexpression gekommen ist und inwieweit diese einen Einfluss auf Wundheilungsprozesse haben könnten. Die Expressionslevel einer Auswahl von Genen, die sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker umfasst, wurden in einem EMT-Array gemessen, der sonst für die Untersuchung von epithelialer-mesenchymaler Transition eingesetzt wird. Die Messung eines Arrays bietet den Vorteil, dass die Fehleranfälligkeit minimiert werden kann.

### 4.1 Zur Rolle relevant veränderter Expression von Genen in der Kokultur im Zusammenhang mit Wundheilungsvorgängen

Für die Beurteilung der vielfältigen Prozesse in einer intakten Haut mit ihren unterschiedlichen Schichten sind in dieser Arbeit Genexpressionen von Gesamtextrakten ermittelt worden. Damit werden aktuell aktiv abgelesene Gene in der Kokultur in das Zentrum des Interesses gerückt, da diese auch den Einfluss der beiden Zelllinien aufeinander abbilden können. Der bewusste Verzicht auf Gerüste oder Faktoren von extrazellulärer Matrix sollte das Potenzial einer Kokultur aus Epithelzellen und Stammzellen beleuchten und Informationen dazu liefern, welchen Einfluss diese reduzierte Umgebung auf die Genexpressionsaktivität der Zellen hat.

#### 4.1.1 Die Rolle des AHNAK Nukleoproteins

Das nukleäre Gerüstprotein AHNAK, das auch als Desmoyokin bezeichnet wird, kommt ubiquitär in humanen Zellen vor, wobei es in Keratinozyten stark exprimiert ist und dort nahe an der Plasmamembran lokalisiert ist (Hashimoto et al. 1995). Es handelt sich um ein Phosphoprotein, welches an einer Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist (Sundararaj et al. 2021, Lim et al. 2013). Es steht dabei im Zusammenhang mit Tumorsuppression, Immunregulation und Aufrechterhaltung der Zellarchitektur. Durch die Interaktion mit dem spannungsgesteuerten Kalziumkanal vom L-Typ (LVGCC), welcher in der Plasmamembran von zum Beispiel Muskel- und Neuronenzellen zu finden ist, ist es an deren Regulation beteiligt (Sundararaj et al. 2021).

Im Tiermodell mit Ratten mit Rückenmarksverletzungen, wurde gezeigt, dass die AHNAK-Expression mit Zelltypen assoziiert ist, die gewebesetzende Barriereigenschaften aufweisen. Dabei kam es nach traumatischer Rückenmarksverletzung zur Hochregulierung der AHNAK-Expression über mehrere Monate. Ebenso scheint diese im Rahmen der Neoangiogenese eine Rolle zu spielen (von Boxberg et al. 2009). In dieser Arbeit konnte die Heraufregulierung in Kokultur aus USSCs und Keratinozyten gezeigt werden. Das könnte auf ein vitales Milieu schließen lassen, welches die Fähigkeit zur Angiogenese und Expansion besitzt.

#### 4.1.2 Die Rolle des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors

Der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor wird überwiegend in Epithelzellen exprimiert. Er fördert die Zellproliferation, das Überleben und die Migration der Zellen, auch in das Wundbett. Zudem trägt er durch die Interaktion mit EGF zur Angiogenese bei (Zhong et al. 2021). Er zählt zu der Familie von Wachstumsfaktorrezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinasefunktion. Wird der EGFR durch einen Liganden aktiviert, werden eine Reihe molekularer Schalter in Gang gesetzt, wodurch die phänotypbestimmenden Gene gesteuert werden. EGFR und sein Heterodimer-Partner HER2/ERBB2 stellen wichtige Angriffsstrukturen in der Krebstherapie dar (Uribe et al. 2021).

Der Rezeptor befindet sich u.a. auf den Oberflächen von Zellen, die an der Wundheilung beteiligt sind. So wird zum Beispiel die Defektheilung durch EGF in tubulären Nierenzellen deutlich gefördert (Zhou et al. 2017).

In den Mikromassenkulturen kam es zu einer leichten Hochregulierung, sodass sich auf ein förderliches Milieu für Wundheilung schließen lässt, da EGFR für den Reparaturvorgang essenziell ist.

Beim EGFR handelt es sich um einen der ersten erforschten Rezeptoren, bei dem auch ein Zusammenhang zwischen Überexpression und malignen Tumoren nachgewiesen

werden konnte. Ein Zusammenhang zwischen Onkogenese und Signaltransduktion ist allerdings ebenfalls mit einer vermehrten Expression oder Mutationen in dieser Proteinfamilie zu sehen (Schlessinger et al. 1983; Roskoski 2014).

#### 4.1.3 Die Rolle des Interleukin-1 Rezeptor Antagonisten

Beim IL1RN handelt es sich um einen natürlich vorkommenden Antagonisten des IL-1-Zytokins. IL-1 ist ein Mitglied strukturell verwandter Zytokine. Dazu gehören die Isoformen IL-1  $\alpha$  und  $\beta$ , sowie drei Rezeptorantagonisten des IL-1Ra in drei Isoformen (Mantovani et al. 2018). Es trägt somit zur Regulierung des Immunsystems bei. Mutationen in dem IL1RN-Gen können zu seltenen genetischen Störungen wie dem Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrom (CAPS) führen. Dieses ist durch Entzündungen, Fieber und z.T. neurologische Symptome gekennzeichnet (Macleod et al. 2021; Garlanda et al. 2013). Das Vorliegen von zu viel IL-1Ra wird mit einer Verringerung der Aktivität des Immunsystems korreliert. Dies kann die Entstehung von entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis begünstigen (Macleod et al. 2021, Ruscitti et al. 2015).

Eine Überproduktion von IL-1Ra wird auch in Verbindung mit der Entstehung bestimmter Krebsarten gesetzt. Erklärt wird dies mit der Entzündungsreaktion der Mikroumgebung (Mantovani et al. 2018). Man muss allerdings beachten, dass diese Auswirkungen noch nicht vollständig erforscht und verstanden sind.

Die Keratinozytenbarriere der Epidermis reagiert auf Zytokine der IL-1-Familie. Auf die Aktivierung reagieren diese mit der Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden, sowie der Verstärkung von Entzündungssignalen, woraufhin Chemokine und Zytokine freigesetzt werden. Auch innerhalb der Zellen der Keratinozyten werden Veränderungen hervorgerufen, welche die Barrierefunktion beeinflussen. So wurde beispielsweise gezeigt, dass IL-1 $\beta$  eine antivirale Reaktion auslösen kann (Macleod et al. 2021).

Übertragen auf das Kokulturmodell aus Keratinozyten und USSCs kann die Herabregulierung der Immunabwehr beim Einsatz dieser Zellen zu einer Unterdrückung der Narbenbildung führen. Folglich könnte die Entzündungsreaktion mit konsekutiver Rekrutierung von Immunzellen in der Wunde reduziert werden.

In Bezug auf die Wundheilung können hohe IL-1Ra-Spiegel beeinflussend wirken, da die Entzündungsreaktion wichtig für die Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Läsion ist und dies auch eine antiinflammatorische Wirkung haben kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen hohen Expressionswerte des IL-1 Rezeptor Antagonisten in der Kokultur aus Keratinozyten und Nabelschnurblutstammzellen könnten in Wunden einen Einfluss auf Entzündungsabläufe ausüben. Vorhandenes Interleukin-1 würde von der Bindung an den Rezeptor abgeschirmt und damit das entzündungsfördernde Potenzial dieses Zytokins unterdrückt. Gleichzeitig könnten die

vorhandenen USSCs durch ihr breit gefächertes Sekretom den Wundheilungsprozess beeinflussen.

#### 4.1.4 Der Transforming Growth Factor $\beta$ in Geweben und in der Kokultur mit USSCs

Der *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF  $\beta$ ) gehört zur Familie der Serin/Theonin-Kinasen (Derynck & Budi 2019). In inaktiver Form ist dieser in der extrazellulären Matrix eingebettet. Nach Aktivierung, welche integrinabhängig oder -unabhängig erfolgen kann, wird das Zytokin TGF  $\beta$  frei und bindet an zelluläre Oberflächenrezeptoren (Hinz 2015b). Dieser Mechanismus löst eine intrazelluläre Aktivierung von SMAD aus, welches mit Kofaktoren in den Zellkern gelangt und die Genexpression beeinflusst (Derynck & Budi 2019). TGF  $\beta$  Moleküle können Zellen unterschiedlichen Ursprungs in Myofibroblasten transformieren. Dies ist bedeutend bei der Wundheilung, aber auch für die Narbenbildung, sowie bei der Fibrose (Hinz 2015a). In chronischen Wunden ist TGF  $\beta$ 1 hochreguliert (Liu et al. 2009; Reiss et al. 2009; Wong et al. 2014).

Die Expression ist in der Kokultur in dieser Arbeit im Vergleich zu beiden Monokulturen herabreguliert (siehe Abbildung 11). Dies lässt auf die interzelluläre Kommunikation schließen und weist damit auf eine korrespondierende Entwicklung im Modell hin. Die Herabregulierung von TGF-beta 2 könnte die Unterdrückung von Narbenbildung unterstützen.

Das *bone morphogenetic protein* (BMP) bildet eine Untergruppe der TGF  $\beta$  Familie und spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung extrazellulärer Matrix (ECM). Diese ist unter anderem bedeutend für die Bildung kovalenter Querverbindungen in Kollagen und elastischen Fasern und für die Verarbeitung von Vorläufern für Laminin 5 und Kollagen Typ VII, welche beide für die Befestigung der Epidermis an der darunter liegenden Dermis notwendig sind (Ge und Greenspan 2006). Laminin 5 trägt zur Verankerung von epidermalen Keratinozyten an das darunterliegende Bindegewebe bei (Baker et al. 1996). Durch zellwanderungsfördernde Aktivität trägt Laminin-5 vermutlich zur Wundheilung bei. Somit kann die Ablagerung von Laminin 5 Keratinozyten dazu veranlassen, von einem aktivierten Phänotyp zu einem ruhenden und integrierten epithelialen Phänotyp zu wechseln (Nguyen et al. 2000). Die neueste Forschung stellt nun auch die Fähigkeit von BMP als wesentlicher Faktor in der Kommunikation zwischen Haarfollikeln und Fettzellen dar. Es ist in der Lage, bei Myofibroblasten die Umwandlung in Fettzellen auszulösen (Plikus et al. 2017).

In dem Mikromassenmodell zeigte sich BMP1 in Kokultur nur mit den männlichen USSCs (8/77) nachweislich in allen drei Wiederholungen im Vergleich zu den Einzelkulturen hochreguliert, was auf eine Zunahme der ECM und somit den Zell-Zell-Kontakt schließen lässt. Dahingegen ergaben sich keine signifikanten Regulationen in der Kokultur mit den weiblichen USSC 5/73. Dieser bemerkenswerte Unterschied könnte

entweder auf eine Änderung der Sensitivität bei Zellen unterschiedlichen Geschlechts zurückzuführen sein oder aber auf das Vorhandensein von Proteinen oder anderen zelleigenen Molekülen schließen lassen, die bei Abwesenheit von BMP1 eine signalunterdrückende Funktion ausüben. Für die Klärung dieser Frage wäre jedoch eine genomweite Genexpressionsanalyse von Einzelzellen in Kokulturen unabdingbar.

#### 4.1.5 Die Rolle von Tomoregulin-1

TMEFF1, auch als Tomoregulin-1 bezeichnet, ist ein Transmembranprotein, welches zwei Follistatin-Domänen und eine dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnelnde Domäne enthält (Gery et al. 2003; Morais da Silva et al. 2001). Dieser Aufbau deutet auf eine Rolle im Signalweg der Wachstumsfaktoren hin. Es konnte eine Wachstumshemmung von Hirntumorzellen mit ektoptischer Expression von TMEFF1 gezeigt werden, was auf eine tumorsupprimierende Wirkung hindeuten könnte (Gery et al. 2003; Nie 2021 et al.). Im Tiermodell zeigte sich nach Gliedmaßenamputation, dass die Mehrheit der Zellen TMEFF1-RNA exprimierten, nicht aber Wundepidermis und Knorpel (Morais da Silva et al. 2001). Das Gen TMEFF1 ist an der Regulation von Genen beteiligt, welche für die Zelldifferenzierung und -Proliferation in Ovarialkarzinomen verantwortlich sind (Nie et al. 2021).

Eindeutige Forschungsergebnisse im Zusammenhang mit der Wundheilung liegen in der Literatur bisher nicht vor. Im Kokulturmodell zeigte sich eine Herabregulierung von TMEFF1, was auf eine proliferative Aktivität rückschließen lässt. Die Bedeutung dieses Effektes in Wundmodellen gilt es noch durch weitere Forschung zu klären.

## 4.2 Schlussfolgerung

Die Balance von parakrinen Effekten und zellinternen Signalketten kann durch die Kokultur von Keratinozyten und Vorläuferzellen, wie den USSCs, zur Stabilität von transplantierbaren Hautmodellen beitragen. Die Herabregulierung von TGF-beta 2 könnte die Vermeidung von Narbenbildung unterstützen.

In diesem Modell legt die nachweisbare mittelfristige Aufrechterhaltung der zelltypischen Expressionsmuster eine zukünftig gewünschte Erweiterung des Modells um Biomaterialien als formgebende Komponente nah.

Insgesamt lässt sich sagen, dass es weiterer Forschung bedarf, um genau zu verstehen, wie Nabelschnurblutstammzellen funktionieren und welche Auswirkung ihre Anwendung im Zusammenhang mit der Wundheilung haben kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Kokultur mit Keratinozyten als Hautzellen überlebensfähig ist und es zu einer Veränderung relevanter Gene der Wundheilung

kommt. Interessanterweise ließ sich jedoch beobachten, dass die Expression der meisten Gene in Kokultur keine signifikante Veränderung zeigte.

### 4.3 Ausblick

Neben weiteren in-vitro-Studien sollten vor allem in-vivo-Studien den Einfluss der in dieser Arbeit identifizierten Gene untersuchen, die im Zusammenhang mit der Wundheilung stehen und deren Potenzial in Kokulturen von Keratinozyten und Nabelschnurblutstammzellen gesehen wird.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Hoch- oder Herunterregulierung verschiedener Genexpressionen kann auch durch eine relative zahlenmäßige Veränderung der beiden Zellpopulationen in Kokultur hervorgerufen worden sein. Allerdings wurden nur Werte als relevant verändert gewertet, welche im Vergleich zu beiden Einzelkulturen eine höhere oder niedrigere Expression zeigten. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, inwiefern sich die beiden Zellpopulationen gegenseitig beeinflussen. Mit zellspezifischen Färbungen könnten die Zellzahlen mikroskopisch bestimmt werden, was jedoch bei mehrschichtigen Zellrasen nicht mehr möglich ist. Nach dem Ablösen von den Kulturgefäßen und Herstellung von Suspensionen könnten diese jedoch nach spezifischer Anregung der verschiedenen Farbstoffe von bindenden Antikörpern in Zellsortern gemessen werden. Für Aussagen zur räumlichen Verteilung der verschiedenen Zellarten sind weitere hochauflösende Methoden erforderlich, die jedoch nicht an homogenisierten Extrakten oder Einzelsuspensionen angewandt werden können.

## 5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, Krieg T (2007): New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma, in: *Curr Rheumatol Rep.* 2007 May;9(2), S. 136-143.
- Ambler CA, Määttä A (2009): Epidermal stem cells: location, potential and contribution to cancer, in: *J Pathol.* 2009 Jan;217(2), S. 206-216.
- Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spänel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch H-G (2010): *Duale Reihe Anatomie*, 2. Auflage, Stuttgart: Thieme 2010, S. 1164-1169.
- Baker SE, Hopkinson SB, Fitchmun M, Andreason GL, Frasier F, Plopper G, Quaranta V, Jones JC. Laminin-5 and hemidesmosomes (1996): role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly, in: *J Cell Sci.* 1996 Oct;109 (Pt 10), S. 2509-2520.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, in: *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1), S. 156-159.
- Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG (2007): Tissue engineering for cutaneous wounds, in: *J Invest Dermatol.* 2007 May;127(5), S.1018-1029.
- Cory G (2011): Scratch-wound assay, in: *Methods Mol Biol.* 2011;769, S. 25-30.
- Derynck R, Budi EH (2019): Specificity, versatility, and control of TGF- $\beta$  family signaling, in: *Sci Signal.* 2019 Feb 26;12(570).
- Duscher D, Barrera J, Wong VW, Maan ZN, Whittam AJ, Januszyk M, Gurtner GC (2016): Stem Cells in Wound Healing: The Future of Regenerative Medicine? A Mini-Review, in: *Gerontology.* 2016;62(2), S. 216-225.
- Edwards NJ, Stone R, Christy R, Zhang CK, Pollol B, Cheng X (2018): Differentiation of adipose derived stem cells to keratinocyte-like cells on an advanced collagen wound matrix, in: *Tissue and Cell.* 2018;53, S. 68-75.

- Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M (2007): Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model, in: *Progr. Histochem. Cytochem.* 2007;42(3), S. 115-170.
- Fuchs E (2008): Skin stem cells: rising to the surface, in: *J Cell Biol.* 2008 Jan 28; 180(2), S. 273-84.
- Gallo RL (2017): Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes, in: *J Invest Dermatol.* 2017;137(6), S. 1213-1214.
- Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A (2013): The interleukin-1 family: back to the Future, in: *Immunity* 2013 Dec 12;39(6), S.1003-1018.
- Ge G, Greenspan DS (2006): Developmental roles of the BMP1/TLD Metalloproteinases, in: *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006 Mar;78(1).
- Gery S, Yin D, Xie D, Black KL, Koeffler HP (2003): TMEFF1 and brain tumors, in: *Oncogene* 2003 May 8;22(18), S. 2723-2727.
- Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tschlis PN, Larue L (2003): The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines, in: *Cancer Res.* 2003 May 1; 63(9), S. 2172-2178.
- Hashemi SS, Mohammadi AA, Kabiri H, Hashempoor MR, Mahmoodi M, Amini M, Mehrabani D (2019): The healing effect of Wharton's jelly stem cells seeded on biological scaffold in chronic skin ulcers: A randomized clinical trial, in: *J Cosmet Dermatol.* 2019;18(6), S. 1961-1967.
- Hashimoto T, Gamou S, Shimizu N, Kitajima Y, Nishikawa T (1995): Regulation of translocation of the desmoyokin/AHNAK protein to the plasma membrane in keratinocytes by protein kinase C, in: *Exp Cell Res.* 1995 Apr;217(2), S. 258-266.
- Hinz B (2015a): Myofibroblasts, in: *Exp Eye Res.* 2016 Jan.
- Hinz B (2015b): The extracellular matrix and transforming growth factor- $\beta$ 1: Tale of a strained Relationship, in: *Matrix Biol.* 2015 Sep;47, S. 54-65.

- Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS (2012): Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing, in: *Stem Cell Res Ther.* 2012;3(3)20.
- Kirsch J, Albrecht May C, Lorke D, Winkelmann A, Schwab W, Herrmann G, Funk R (2011): *Taschenlehrbuch Anatomie*, Stuttgart: Thieme 2011, S. 698-700.
- Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P (2004): A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential, in: *J Exp Med.* 2004 Jul 19;200(2), S.123-135.
- Larue L, Bellacosa A (2005): Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways, in: *Oncogene.* 2005 Nov 14;24(50), S. 7443-7454.
- Lim HJ, Kang DH, Lim JM, Kang DM, Seong JK, Kang SW, Bae YS (2013): Function of Ahnak protein in aortic smooth muscle cell migration through Rac Activation, in: *Cardiovasc Res.* 2013 Feb 1;97(2), S. 302-310.
- Liu Y, Min D, Bolton T, Nubé V, Twigg SM, Yue DK, McLennan SV (2009): Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot Ulcers, in: *Diabetes Care.* 2009 Jan;32(1), S. 117-119.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method, in: *Methods* 2001 Dec;25(4), S. 402-408.
- Macleod T, Berekmeri A, Bridgewood C, Stacey M, McGonagle D, Wittmann M (2021): The Immunological Impact of IL-1 Family Cytokines on the Epidermal Barrier, in: *Front Immunol.* 2021 Dec 23;12:808012.
- Mantovani A, Barajon I, Garlanda C (2018): IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy, in: *Immunol Rev.* 2018 Jan;281(1), S.57-61.
- Martin P (1997): Wound healing--aiming for perfect skin regeneration, in: *Science* 1997 Apr 4;276(5309), S. 75-81.

- Morais da Silva S, Gates PB, Eib DW, Martens GJ, Brockes JP (2001): The expression Pattern of tomoregulin-1 in urodele limb regeneration and mouse limb Development, in: Mech Dev. 2001 Jun;104(1-2), S. 125-128.
- Nie X, Gao L, Zheng M, Wang C, Wang S, Li X, Qi Y, Zhu L, Liu J, Lin B (2021): Overexpression of TMEFF1 in Endometrial Carcinoma and the Mechanism Underlying its Promotion of Malignant Behavior in Cancer Cells, in: J Cancer 2021 Jul 31;12(19), S. 5772-5788.
- Nguyen AV, Soulika AM (2019): The Dynamics of the Skin's Immune System, in: Int J Mol Sci. 2019 Apr 12;20(8):1811.
- Nguyen BP, Ryan MC, Gil SG, Carter WG (2000): Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion, in: Curr Opin Cell Biol. 2000 Oct;12(5), S. 554-562.
- Nussbaum SR, Carter MJ, Fife CE, DaVanzo J, Haught R, Nusgart M, Cartwright D (2018): An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds, in: Value Health 2018;21(1), S. 27-32.
- Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, Patel SB, Khalid L, Isseroff RR, Tomic-Canic M (2014): Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review, in: Advances Wound Care (New Rochelle) 2014;3(7), S. 445-464.
- Pinkert (2008): Experimentelle Untersuchung der Expressionsinduktion von pAkt während der Wundheilung in bestrahltem Gewebe-radiogene Induktion von pAkt und dermale Fibrose, online verfügbar unter: [https://www.db-thueringen.de/receive/dbt\\_mods\\_00012914](https://www.db-thueringen.de/receive/dbt_mods_00012914); aufgerufen am 13.07.2021.
- Plikus MV, Guerrero-Juarez CF, Ito M, Li YR, Dedhia PH, Zheng Y, Shao M, Gay DL, Ramos R, Hsi TC, Oh JW, Wang X, Ramirez A, Konopelski SE, Elzein A, Wang A, Supapannachart RJ, Lee HL, Lim CH, Nace A, Guo A, Treffeisen E, Andl T, Ramirez RN, Murad R, Offermanns S, Metzger D, Chambon P, Widgerow AD, Tuan TL, Mortazavi A, Gupta RK, Hamilton BA, Millar SE, Seale P, Pear WS, Lazar MA, Cotsarelis G (2017): Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing, in: Science 2017 Feb 17;355(6326),

S. 748-752.

- Popp T, Steinritz D, Breit A, Deppe J, Egea V, Schmidt A, Gudermann T, Weber C, Ries C (2014): Wnt5a/ $\beta$ -catenin signaling drives calcium-induced differentiation of human primary keratinocytes, in: *J Invest Dermatol.* 2014 Aug;134(8), S.2183-2191.
- Postlethwaite AE, Shigemitsu H, Kanangat S (2004): Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis, in: *Curr Opin Rheumatol.* 2004 Nov;16(6).
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM (2008): The skin: an indispensable barrier, in: *Exp Dermatol.* 2008 Dec;17(12), S. 1063-1072.
- PromoCell GmbH (2021): Keratinocytes Instruction Manual, online verfügbar unter: <https://promocell.com/wp-content/uploads/product-information/manual/C-12001.pdf>, aufgerufen am 15.02.2023.
- Qiagen (2012): RT2 Profiler PCR Arrays For pathway-focused gene expression analysis, online verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/de-us/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/qpcr-assays-and-instruments/mrna-incrna-qpcr-assays-panels/rt2-profiler-pcr-arrays>, aufgerufen am 14.02.2023.
- Qiagen (2013): QuantiNova® LNA® Probe PCR Focus Panels (96-Well Format and 384-Well [4 x 96] Format) Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT), online verfügbar unter <https://geneglobe.b2b-qiagen.com/us/product-groups/quantinova-lna-probe-pcr-focus-panels?q=UPRN-090Z>, aufgerufen am 14.02.2023.
- Raghuram AC, Yu RP, Lo AY, Sung CJ, Bircan M, Thompson HJ, Wong AK (2020): Role of stem cell therapies in treating chronic wounds A systematic review, in: *World J Stem Cells* 2020;12(7), S. 659-675.
- Redd MJ, Cooper L, Wood W, Stramer B, Martin P (2004): Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair (2004), in: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004 May 29;359(1445), S. 777-784.
- Reiss MJ, Han YP, Garcia E, Goldberg M, Yu H, Garner WL (2009): Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model, in: *Surgery*

2010 Feb;147(2), S. 295-302.

- Roskoski R Jr (2014): The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer, in: *Pharmacol Res.* 2014 Jan;79, S. 34-74.
- Ruscitti P, Cipriani P, Di Benedetto P, Liakouli V, Berardicurti O, Carubbi F, Ciccia F, Alvaro S, Triolo G, Giacomelli R (2015): Monocytes from patients with rheumatoid arthritis and type 2 diabetes mellitus display an increased production of interleukin (IL)-1 $\beta$  via the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing family pyrin 3(NLRP3)-inflammasome activation: a possible implication for therapeutic decision in these patients, in: *Clin Exp Immunol.* 2015 Oct;182(1), S. 35-44.
- Sah SK, Kim HY, Lee JH, Lee SW, Kim HS, Kim YS, Kang KS, Kim TY (2017): Effects of Human Mesenchymal Stem Cells Coculture on Calcium-Induced Differentiation of Normal Human Keratinocytes, in: *Stem Cells* 2017; 35(6), S.1592-1602.
- Sanders EJ, Prasad S (1989): Evidence that plasminogen activator is not involved in basement membrane penetration at avian gastrulation, in: *Exp Cell Res.* 1989 Dec;185(2), S. 394-398.
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H (2008): Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type, in: *J Immunol.* 2008 Feb 15;180(4), S. 2581-2587.
- Schlessinger J, Schreiber AB, Levi A, Lax I, Libermann T, Yarden Y (1983): Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor, in: *CRC Crit Rev Biochem.* 1983;14(2), S. 93-111.
- Sundararaj S, Ravindran A, Casarotto MG (2021): AHNAK: The quiet giant in Calcium homeostasis, in: *Cell Calcium.* 2021 Jun;96:102403.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, in: *Science* 1998 Nov 6;282(5391), S.145-147.
- Toker A (2000): Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase Signaling, in: *Mol Pharmacol.* 2000 Apr;57(4), S. 652-658.

- Uribe ML, Marrocco I, Yarden Y (2021): EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance, in: *Cancers (Basel)* 2021 Jun 1;13(11):2748.
- von Boxberg Y, Salim C, Soares S, Baloui H, Alterio J, Ravaille-Veron M, Nothias F (2009): Spinal cord injury-induced up-regulation of AHNAK, expressed in cells delineating cystic cavities, and associated with neoangiogenesis, in: *Eur J Neurosci.* 2006 Aug;24(4), S.1031-1041.
- Watt FM, Kubler MD, Hotchin NA, Nicholson LJ, Adams JC (1993): Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interactions, in: *Journal of Cell Science* 1993;106, S.175-182.
- Watt FM, Lo Celso C, Silva-Vargas V (2006): Epidermal stem cells: an update, in: *Current Opinion in Genetics & Development*, 2006;16(5), S. 518-524.
- Wong VW, Garg RK, Sorkin M, Rustad KC, Akaishi S, Levi K, Nelson ER, Tran M, Rennert R, Liu W, Longaker MT, Dauskardt RH, Gurtner GC (2014): Loss of keratinocyte focal adhesion kinase stimulates dermal proteolysis through upregulation of MMP9 in wound healing, in: *Ann Surg.* 2014 Dec;260(6), S. 1138-1146.
- Zhong H, Qian J, Xiao Z, Chen Y, He X, Sun C, Zhao Z (2021): MicroRNA-133b Inhibition Restores EGFR Expression and Accelerates Diabetes-Impaired Wound Healing, in: *Oxid Med Cell Longev.* 2021 Nov 27;2021:9306760.
- Zhou X, Zhang W, Yao Q, Zhang H, Dong G, Zhang M, Liu Y, Chen JK, Dong Z (2017): Exosome production and its regulation of EGFR during wound healing in renal tubular cells, in: *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017 Jun 1;312(6):F963-F970.

## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Norbert R. Kübler, welcher mir ermöglichte diese Arbeit an seiner Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie durchzuführen. Ich bin dankbar für die Möglichkeit das wissenschaftliche Arbeiten im Labor erlernt haben zu dürfen.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Karin Berr, welche mich in die Labortätigkeit eingearbeitet und für diese begeistert hat. Sie stand mir stets zur Seite. Ohne ihre hervorragende Betreuung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zudem danke ich den Mitarbeiterinnen des Labors, die mir bei praktischen Fragen zur Verfügung standen.

Danke an Frau Prof. Dr. Gesine Kögler, welche dem Labor die Nabelschnurblutstammzellen zur Verfügung stellte.

Ich danke auch der Gutachterin Frau PD Dr. Kristin.

Danke Patrick für deine bedingungslose Unterstützung.