

**Entwicklung von humanen organoiden  
Vollhautäquivalenten  
für biomedizinische Testsysteme**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von  
**Michaela Weimer**  
aus Gerlingen

Hauptberichter: Prof. Dr. H. Brunner  
Mitberichter: Prof. Dr. P. Scheurich  
Tag der mündlichen Prüfung: 19. September 2006

Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik  
2006

**Meinen Eltern**

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Herwig Brunner bedanken, der mir diese Arbeit ermöglicht hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Heike Mertsching, für die tatkräftige Unterstützung und die anregenden Gespräche beim Erstellen dieser Arbeit. Bei Herrn Prof. Dr. P. Scheurich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachten dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Zellsysteme bin ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet, denn ohne Ihre Mitarbeit und anregenden Diskussionen wären Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt auch Katrin Etzold und Silke Kersen. Sie haben Teile der aufwendigen Zellkultur übernommen. Ausserdem hat Marion Lichtenauer FACS-Analysen für mich durchgeführt und mir so die Verfassung dieser Dissertation wesentlich erleichtert.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch an die Arbeitsgruppe von PD. Dr. Steffen Rupp für die *Candida* Versuche aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich noch bei Markus Schandar für sehr ausführliche Diskussionen bedanken und ebenso bei Dr. Iz Anadere, die für mich die vielen Publikationen während dieser Arbeit geduldig bestellt hat.

## **Eigene Publikationen, Poster und Vorträge**

*Folgende Ergebnisse sind als Vortrag vorgestellt worden:*

Weimer M.

Humanes in vitro Hautmodell für Wundheilungsstudien, 3. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Wundheilung, Freiburg 2002

Weimer M., Eckert HG.

Dreidimensionales Hautäquivalent Firma Beiersdorf, Hamburg 2002

Weimer M., Eckert HG.

Dreidimensionales Hautäquivalent als Testsystem Freie Universität Berlin 2003

Weimer, M., Fritz, S., v. Seydlitz-Kurzbach, J., Bittner, M., Brunner, H., Goppelt, A., Eckert, H.-G. (2003)

EU-Chemikalienbewertung mit in-vitro Hautmodell, Fraunhofer ITEM, 23. Februar 2004, Hannover

Weimer M.

3-dimensionales Hautmodell – Grundlage für unterschiedliche Anwendungen, 1. Symposium: Neue Entwicklungen der regenerativen Medizin, Stuttgart 2005

Weimer M.

3D human organoid test systems, MEDTEC, Stuttgart 2005

Weimer M., Mertsching H., Brunner H

Biodiversity on cell systems, Australia – Workshop on Biodiversity, Canberra, Australien 2006

*Folgende Ergebnisse sind als Poster vorgestellt worden*

Dreidimensionales Hautäquivalent am IGB, 9. Jahrestagung der Gesellschaft für Dermopharmazie e. V., 14.-15. März 2005, Wien, Österreich

Weimer, M.

An ex vivo model for callus distraction, 4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society (ETES), 31. August - 3. September 2005, München

Weimer, M.

3-D skin model as test system for wound healing, infection, tumour and angiogenesis diagnostic, 4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society (ETES), 31. August - 3. September 2005, München

*Folgende Ergebnisse sind als Veröffentlichung vorgestellt worden*

Weimer, M.

Ein humanes In-vitro-Hautmodell für Wundheilungsstudien, Zeitschrift für Wundheilung 1: 24

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Zusammenfassung .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2</b>   | <b>Einleitung.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>2.1</b> | <b>Tissue Engineering .....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>2.2</b> | <b>Das Organ Haut.....</b>  | <b>11</b> |
| 2.2.1      | Die Epidermis .....   | 11        |
| 2.2.2      | Melanozyten .....   | 14        |
| 2.2.3      | Die Basalmembran .....  | 14        |
| 2.2.4      | Zytokeratine .....  | 15        |
| 2.2.5      | Die Dermis .....  | 15        |
| <b>2.3</b> | <b><i>In vitro</i> Hautkulturmodell als Testsystem .....</b>                            | <b>16</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Wundheilung.....</b>   | <b>19</b> |
| 2.4.1      | <i>In vitro</i> Wundheilungsmodelle .....   | 21        |
| <b>2.5</b> | <b>Angiogenese .....</b>  | <b>24</b> |
| 2.5.1      | <i>in vitro</i> Hauttumormodelle .....  | 24        |
| 2.5.2      | <i>in vitro</i> Angiogenese.....  | 29        |
| <b>2.6</b> | <b>Einsatz von <i>in vitro</i> Infektionsmodellen.....</b>                              | <b>32</b> |
| 2.6.1      | <i>In vitro</i> Infektion zur Untersuchung der Virulenz von <i>Candida albicans</i> ... | 33        |
| <b>3</b>   | <b>Aufgabenstellung.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>4</b>   | <b>Material und Methoden.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Materialien und Zusätze.....</b>   | <b>35</b> |
| 4.1.1      | Lebendkulturen .....  | 38        |
| <b>4.2</b> | <b>Vektoren.....</b>  | <b>39</b> |
| 4.2.1      | Transfektionsreagentien/Transfektionsgerät.....   | 40        |
| <b>4.3</b> | <b>Geräte.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Antikörper.....</b>  | <b>41</b> |
| 4.4.1      | Prinzip der Immunomagnetischen Separierungsmethode (MACS) .....                         | 43        |
| 4.4.1.1    | Probenvorbereitung.....   | 44        |
| <b>4.5</b> | <b>Durchflusszytometrie .....</b>   | <b>45</b> |
| 4.5.1      | Zellzyklusanalyse.....  | 45        |

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 4.5.1.1    | Modifizierte Methode nach Lindl .....                           | 45        |
| 4.5.1.2    | Methanol-Fixierung.....   | 46        |
| 4.5.1.3    | DNA Färbung in Zell-Lysepuffer.....                             | 46        |
| <b>4.6</b> | <b>Zellbiologische Methoden .....</b>                           | <b>46</b> |
| 4.6.1      | Zellzählung .....   | 46        |
| 4.6.2      | Vitalitätsbestimmung .....                                      | 47        |
| 4.6.3      | Kryokonservierung.....  | 47        |
| 4.6.4      | Auftauen von Zellen .....                                       | 48        |
| 4.6.5      | Zellseparationsmethoden .....                                   | 48        |
| 4.6.6      | Beschichtung von 24 Well-Inserts.....                           | 49        |
| 4.6.7      | Allgemeine Arbeitsmethoden der Zellkultur.....                  | 49        |
| 4.6.8      | Humane Zellen.....  | 49        |
| 4.6.8.1    | Epidermale Zellen.....  | 50        |
| 4.6.8.2    | Fibroblasten .....  | 51        |
| 4.6.8.3    | Endothelzellen.....   | 51        |
| 4.6.9      | Subkultivierung.....  | 52        |
| 4.6.9.1    | Keratinocyten und Melanocyten .....                             | 52        |
| 4.6.9.2    | Fibroblasten .....  | 53        |
| 4.6.9.3    | Endothelzellen.....   | 53        |
| 4.6.9.4    | Testen unterschiedlicher Medienzusätze für Endothelzellen ..... | 53        |
| 4.6.9.5    | Wachstumsverhalten der Endothelzellen .....                     | 54        |
| 4.6.9.6    | Melanomzelllinien .....   | 55        |
| 4.6.10     | Transfektion .....  | 55        |
| 4.6.10.1   | Klonierungsversuche.....  | 56        |
| <b>4.7</b> | <b>Analytische Methoden.....</b>                                | <b>57</b> |
| 4.7.1      | Histologische Schnittpräparate.....                             | 57        |
| 4.7.2      | Entfernung des Paraffins.....                                   | 58        |
| 4.7.3      | Histologische Färbung organotypischer Kulturen .....            | 59        |
| 4.7.4      | Immunhistochemie .....  | 60        |
| <b>4.8</b> | <b>Mikrobiologische Methoden .....</b>                          | <b>61</b> |
| 4.8.1      | Herstellung kompetenter Bakterien .....                         | 61        |
| 4.8.2      | Stammhaltung .....  | 61        |
| 4.8.3      | Chemische Hitzeschocktransformation.....                        | 62        |

---

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 4.8.4       | Candida albicans .....  | 62        |
| <b>4.9</b>  | <b>Molekularbiologische Methoden .....</b>                            | <b>63</b> |
| 4.9.1       | Plasmid-Isolierung im analytischen Maßstab.....                       | 63        |
| 4.9.2       | Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab.....                       | 63        |
| 4.9.3       | Konzentrationsbestimmung .....  | 64        |
| 4.9.4       | Restriktionsverdau und gelelektrophoretische Auftrennung von DNA..... | 64        |
| 4.9.5       | Methoden zur Proteinbestimmung.....                                   | 66        |
| <b>4.10</b> | <b>Organotypische Kulturen.....</b>                                   | <b>66</b> |
| 4.10.1      | Humanes 3-D Hautmodell als Testsystem .....                           | 67        |
| 4.10.1.1    | <i>in vitro</i> Wundheilungsmodell.....                               | 67        |
| 4.10.1.1.1  | Verwundungstechnologie .....  | 69        |
| 4.10.1.2    | <i>in vitro</i> Tumormodell.....                                      | 69        |
| 4.10.1.3    | <i>in vitro</i> Angiogenesemodell .....                               | 70        |
| 4.10.1.4    | <i>In vitro</i> Infektionsmodell.....                                 | 73        |
| <b>5</b>    | <b>Ergebnisse.....</b>  | <b>74</b> |
| <b>5.1</b>  | <b>Verwendete Zellen .....</b>  | <b>74</b> |
| 5.1.1.1     | Mediumzusammensetzung .....   | 81        |
| <b>5.2</b>  | <b>Überlebensrate nach Kryokonservierung.....</b>                     | <b>82</b> |
| <b>5.3</b>  | <b>Zellseparation zur Reinkulturgewinnung.....</b>                    | <b>83</b> |
| 5.3.1       | Endothelzellen.....   | 83        |
| 5.3.1.1     | Immunseparationsmethode (MACS).....                                   | 84        |
| 5.3.1.2     | Unterschiedliche Einwirkzeiten von PBS <sup>-</sup> /EDTA .....       | 84        |
| 5.3.2       | Melanozyten .....   | 87        |
| 5.3.2.1     | Zugabe von Geneticin.....   | 87        |
| 5.3.2.2     | Unterschiede in der Einwirkungszeit von Trypsin .....                 | 88        |
| 5.3.2.3     | Immunomagnetische Separationsmethode (MACS) .....                     | 88        |
| <b>5.4</b>  | <b>Plasmidpräparationen .....</b>                                     | <b>91</b> |
| <b>5.5</b>  | <b>Transfektion .....</b>   | <b>93</b> |
| 5.5.1       | Liposomale Transfektionen mit pEGFP-N1.....                           | 93        |
| 5.5.2       | Transfektion mit pEGFP-N1 durch Nukleofektion .....                   | 97        |
| 5.5.2.1     | Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse .....                     | 99        |

---

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 5.5.3      | Transfektion mit pRK5-HER-mrk.....                            | 100        |
| 5.5.4      | Vergleich der Transgenexpression.....                         | 102        |
| 5.5.5      | Zellzyklusanalyse.....  | 104        |
| 5.5.5.1    | Zellzyklusanalyse mit NHEM-pRK5-HER-mrk transfizierten Zellen | 106        |
| 5.5.6      | Klonbildung von NHEM-pRK5-HER-mrk .....                       | 109        |
| 5.5.7      | Sortierung der transfizierten Zellen.....                     | 109        |
| 5.5.8      | Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse .....             | 111        |
| <b>5.6</b> | <b>3-D humanes Hautmodell als Testsystem .....</b>            | <b>112</b> |
| 5.6.1      | in vitro Wundheilungsmodell.....                              | 113        |
| 5.6.2      | in vitro Tumormodell.....                                     | 116        |
| 5.6.3      | in vitro Angiogenesemodell.....                               | 118        |
| 5.6.4      | in vitro Infektionsmodell .....                               | 120        |
| <b>6</b>   | <b>Diskussion.....</b>  | <b>122</b> |
| <b>6.1</b> | <b>In vitro Testsysteme.....</b>                              | <b>122</b> |
| 6.1.1      | in vitro Wundheilungsmodell.....                              | 123        |
| 6.1.2      | in vitro Tumormodell.....                                     | 125        |
| 6.1.3      | in vitro Angiogenesemodell.....                               | 131        |
| 6.1.4      | in vitro Modell für Infektion und Adhäsion.....               | 136        |
| <b>7</b>   | <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>                             | <b>138</b> |
| <b>8</b>   | <b>Glossar.....</b>   | <b>141</b> |
| <b>9</b>   | <b>Literaturverzeichnis.....</b>                              | <b>144</b> |



---

**Abkürzungsverzeichnis**

|                |  |
|----------------|--|
| AEC            | 3-Amino-9-Ethylcarbazol  |
| aFGF           | acid Fibroblast Growth factor, saurer Fibroblastenwachstumsfaktor      |
| bFGF           | basic Fibroblast Growth Factro, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor  |
| BMBF           | Bundesministerium für Bildung und Forschung                            |
| BSA            | bovines serum albumin  |
| CASY           | cell analysing technology  |
| CD 31(PECAM-1) | Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1                          |
| CD             | cluster of differentiation   |
| CD105          | Membranglykoprotein auf endothelialen Zellen                           |
| COX            | Cyclooxygenase   |
| CSF            | Kolonie stimulierender Faktor  |
| DMEM           | Dulbeccos Modified Eagle Medium  |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid   |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure   |
| 3-D            | Dreidimensional  |
| ECGS           | Endothelial cell growth supplement                                     |
| E.coli         | Escherichia coli   |
| ECG-MV-Medium  | Endothelial cell growth Medium   |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EGF            | Epithelialer Wachstumsfaktor   |
| EGFP           | Enhanced Green Fluorescent Protein                                     |
| ELISA          | Enzyme-linked immunosorbent assay                                      |
| Er-YAG Laser   | Erbium-Ytrium-Aluminium-Granat Laser                                   |
| FSC            | Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)                                   |
| FACS           | Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (fluorescence activated cell sorter) |
| Fc             | Fc-Fragment des Antikörpers (fragment crystallizable)                  |
| FCS            | Fötale Kälberserum   |
| FITC           | Fluoresceinisothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff                         |

---

|              |   |
|--------------|---|
| GFR          | Green fluorescent receptor  |
| h            | Stunden   |
| HCL          | Salzsäure   |
| hEGF         | human Epidermal Growth Factor                                     |
| hEGFR        | human Epidermal Growth Factor Rezeptor                            |
| HEK          | Human Embryonic Kidney  |
| HER-mrk      | human epidermal growth factor rezeptor - melanoma receptor kinase |
| HUVEC        | Human Umbilical Vein Endothelial Cells                            |
| ICAM-1       | Intercellular adhesion molecule                                   |
| IFN $\gamma$ | Interferon $\gamma$   |
| IgG          | Immunglobulin   |
| IL-1         | Interleukin 1   |
| KBM-Medium   | Keratinocyte Basal Medium   |
| KGF          | Keratinocytes growth factor                                       |
| LB-Medium    | Luria Both-Medium   |
| MACS         | Magnetic activated cell separation                                |
| MAPK         | Mitogen Activated Protein Kinase                                  |
| MEM-Medium   | Minimum Essential Medium  |
| MGM-Medium   | Melanocyte Growth Medium  |
| $\mu$ g      | mikro Gramm   |
| $\mu$ l      | mikro Liter   |
| min          | Minuten   |
| ml           | Milliliter  |
| MPS          | Multiple Cloning Site   |
| mRNA         | messenger Ribonucleinacid   |
| nM           | nano Molar  |
| OD           | optische Dichte   |
| OECD         | Organisation for Economic Co-operation and Development            |
| PAS          | Periodic Acid Schiff Reaktion                                     |
| PBS          | Phosphate buffered solution, Phosphat-Pufferlösung                |
| PCNA         | proliferating cell nuclear antigen                                |

---

|               |  |
|---------------|--|
| PDGF          | Plättchen aktivierender Wachstumsfaktor                                |
| pEGFP-N1      | pEGFP-N1 encodes a red-shifted variant of wild-type                    |
| PG            | Prostaglandin  |
| pH            | potentia Hydrogenii  |
| REACH         | Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe |
| RNA           | Ribonukleinsäure   |
| rpm           | rounds per minute  |
| RT            | Raumtemperatur   |
| RT-PCR        | “Reverse transcriptase polymerase chain reaction”                      |
| SSC           | Side scatter (Seitwärtsstreulicht)                                     |
| TGF- $\beta$  | Transforming growth factor beta  |
| TNF- $\alpha$ | Tumor-Nekrose-Faktor alpha   |
| U             | Units, Einheit für Enzymaktivität [katal = mol/s]                      |
| ÜN            | über Nacht   |
| V             | Volt   |
| VEGF          | Vascular endothelial cell growth factor                                |
| vWF           | von Willebrand Faktor  |
| W             | Watt   |
| Xmrk          | Xiphophorus Melanoma Rezeptor Kinase                                   |
| YPD           | Hefeextrakt/Pepton/Dextrose-Medium                                     |



# 1 Zusammenfassung

Die Haut ist mit einer Fläche von fast 2 Quadratmetern und einem Gewicht von bis zu 12 Kilogramm ein (ge-) wichtiges Organ – das von den meisten Menschen, nicht als solches wahrgenommen wird. Die Haut ist das erste Organ das künstlich mit Methoden des Tissue Engineering gezüchtet wurde [8], weil Hautbiopsien leicht verfügbar sind und die Haut zellulär einfach aufgebaut ist. Hautstrukturen werden überwiegend mit dem Ziel der Gewinnung und Optimierung von Transplantaten für Schwerbrandverletzte oder für schlecht heilende Wunden entwickelt. In der letzten Zeit hat sich ein weiterer Verwendungszweck als *in vitro* Testsysteme für solche Hautäquivalente entwickelt. Einen entscheidenden Anteil daran hat die vor kurzem verabschiedete 7. Kosmetikrichtlinie, welche vorschreibt, bis zum Jahr 2009 Tierversuche zur kutanen Resorption durch *in vitro* Tests zu ersetzen. Weiterhin sollen im Rahmen der REACH Verordnung eine große Zahl von Chemikalien auf schädliche Nebenwirkungen getestet werden. Diese große Anzahl besonders von Toxizitätstests, ist mit den herkömmlichen Methoden kaum bzw. nur mit hohem Aufwand an Kosten und Zeit zu bewältigen. Hier stellen Hautäquivalente eine echte Alternative dar. In der Pharmaforschung und ganz besonders beim Screening potentieller Substanzen mit therapeutischem Nutzen sind hoch entwickelte und standardisierte Testsysteme als möglichst human-nahe Indikatoren für den Wirknachweis gesucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein 3-D Hautmodell, bei dem Keratinozyten luftexponiert auf einer fibroblastenhaltigen Kollagen Typ I-Matrix wachsen und ein der Epidermis ähnliches Epithel mit allen Differenzierungskriterien gut vergleichbar mit Echthaut bilden, als Testsystem etabliert für:

- I. *in vitro* Wundheilungsstudien. Durch zelluläre Erweiterung wodurch ein Modell für Untersuchungen im Bereich der
- II. *in vitro* Hauttumorbilogie und
- III. *in vitro* Angiogenese aufgestellt und letztlich ein
- IV. *in vitro* Infektionsmodell für die Untersuchung von Infektionsmechanismen am Beispiel von *Candida albicans* entwickelt.

Als Basis für diese Fragestellungen diente ein 3-D humanes Hautmodell.

Für die Etablierung des (I) *in vitro* Wundheilungsmodells wurde das 3-D humane Hautmodell mit einem Erbium-Yag Laser exakt definiert hinsichtlich Geometrie und

Energie, verletzt. So konnten *in vitro* Wunden mit einer einheitlichen und reproduzierbaren Größe hergestellt werden. Mit Zellen aus Biopsien von freiwilligen Spendern wurden Nachweise bzgl. spezifischer Markermoleküle für die Immunhistologie und Real Time PCR etabliert. Die Funktionalität des *in vitro* Wundheilungsmodells wurde mit unterschiedlichen topisch applizierten Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Reepithelialisierung überprüft. Dabei konnte das rekombinant hergestellte Protein (Calgranulin C) durch eine Verdickung der Epidermis am Wundrand neu identifiziert werden, und so der positive Einfluss auf die Wundheilung belegt werden. Weiterhin konnte eine Übereinstimmung der *in vivo* und *in vitro* Daten, hinsichtlich der Expression des Zytokins Interleukin 1 $\alpha$ , das von Keratinozyten nach Verletzungen sezerniert wird, und des Gens  $\alpha$ 1-Hydroxyprostaglandinendehydrogenase nachgewiesen werden.

Zur Etablierung des (II) *in vitro* Tumormodells wurden zunächst unterschiedliche Melanomzelllinien in das Hautmodell integriert. Nach erfolgreicher Etablierung der Einsaatmethode wurden primäre Melanozyten mit dem induzierbaren Proto-Onkogen (Xmrk) konditional transformiert. Durch den Einsatz dieses Konstruktes, das den extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors mit der intrazellulären Domäne von Xmrk funktionell kombiniert, sollte eine reversible, d.h. induzierbare Tumorzelllinie erhalten werden, um diese in das Hautmodell zu integrieren. Zur Transformation der Melanozyten wurden diese mit einem EGF-induzierbaren Proto-Onkogen: pRK5-HER-mrk und geeigneten Kontrollen transfiziert und anschließend mit EGF stimuliert. Die Expression des EGF-Rezeptors wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch bestimmt. Weiterhin wurde zur Bestimmung erfolgreich transformierter Melanozyten eine Methode zur Zellzyklusanalyse etabliert. Die Zellzyklusanalysen der pRK5-HER-mrk transfizierten Zellen zeigten bei EGF-behandelten Zellen einen doppelt so hohen Anteil an Zellen in der S-Phase wie bei EGF-unbehandelten Zellen. Zusätzlich durchgeführte Klonierungsversuche der transfizierten Zellen im Weichagar zeigten kein Wachstum und auch Beobachtungen von einzeln ausgesäten, transfizierten Zellen in einer 6-Well Platte und die Bestimmung der Zellzahlen deuteten nicht auf eine vermehrte Proliferation durch Transformation hin. Die Zellen zeigten nach Aussortierung der transfizierten Zellen mittels des FACS-Vantage keine weitere Proliferation.

Als weiteres Testsystem wurde (III) ein *in vitro* Modell zur Gefäßneubildung (Angiogenese) etabliert. Dazu wurde das Tumormodell (II) um mikrovaskuläre

Endothelzellen erweitert. Die maximale Annäherung an die *in vivo* vorkommende Stimulierung der Gefäßneubildung durch Tumoren steht hierbei im Vordergrund. Damit wird für die Tumorforschung ein Testsystem zur Verfügung gestellt, an dem potentielle Wirkstoffe bzgl. Anti-Angiogenese identifiziert und validiert werden können. Eine verstärkte Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen wurde zunächst durch VEGF-Zusatz verifiziert. Die zusätzliche Integration von Melanomzellen in das um mikrovaskuläre Endothelzellen erweiterte Hautmodell zeigte auch ohne VEGF-Zusatz eindeutig die Bildung kapillarähnlicher Strukturen.

Zur Untersuchung der Pathogenitäts- und Virulenzmechanismen von Mikroorganismen wurde ein Testsystem etabliert, mit dem (IV) beispielhaft *in vitro* die Adhäsion und Invasion unterschiedlicher *Candida* Mutanten untersucht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass im Kontext der Infektionsforschung solche *in vitro* Testsysteme geeignete Alternativen zu Tierversuchen darstellen können. Das Modellsystem wurde mit *Candida albicans*, einem asexuellen Ascomyceten der Gattung *Candida*, infiziert. Dieser Pilz ist Teil der mikrobiellen Flora der Epidermis und der Schleimhäute. Das entwickelte Modellsystem zeigte erste Ereignisse einer invasiven Infektion von *Candida albicans* auf. *Candida albicans* weist einen Dimorphismus, einen induzierbaren Wechsel zwischen Hefen- und Hyphenform, auf. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *C. albicans* unspezifisch innerhalb von 30 Minuten in der Hefeform als auch in der Hyphenform an Gewebe- und Implantatoberflächen adhärert. Die Ausbildung von Keimschläuchen geht dabei mit der Bildung spezifischer kovalenter Verknüpfungen zur Gewebeoberfläche einher. Beim Fortschreiten der Hyphenbildung wurde das Durchdringen des Epithels und der Matrix des Modellsystems binnen 48 h beobachtet. Dann wäre der Eintritt von *Candida albicans* in den Blut- und Lymphkreislauf im Vergleich zum Ablauf im menschlichen Organismus die Folge. Des Weiteren sind individuelle und synergistische Wirkungen von EFG1 und CPH1, zweier Transkriptionsfaktoren von *C. albicans*, auf ihre Invasions- und Adhäsionseigenschaften in humane Epithelien untersucht worden. Gezeigt werden konnte an diesem 3-D Hautmodell, dass ein Fehlen des CPH1 Faktors, ähnlich wie beim Wildtyp, eine Anheftung (Adhäsion) und starke Invasion (Penetration) durch das Epithel der Haut gegeben ist. Mit organotypischen Kulturen ist es möglich, eindeutig die verschiedenen Invasionsvorgänge unterschiedlicher *Candida albicans* Stämme zu verfolgen.

## Abstract

The skin is the body's heaviest organ, with a mass of up to 12 kg, and a total surface area of about 2 m<sup>2</sup> – but is not perceived as organ by most of the people. Skin was the first organ to be cultured artificially using tissue engineering methods [8], due to the fact that skin biopsies are readily available and skin has a simple cell structure. Skin tissue models are mostly developed to obtain and optimize grafts for burn victims and patients with wounds that will not heal. Recently another application for such skin equivalents emerged. The 7th amendment of the EU Cosmetics Directive played a crucial role, as it designates that all animal experiments concerning cutaneous resorption are to be replaced by *in vitro* tests by the year 2009. In line with the REACH Regulation, a large number of chemicals are due to be tested for any harmful side effects. Using conventional methods, such large numbers of toxicity tests involve high costs and require a lot of time. In these cases, skin equivalents offer a real alternative. Highly developed and standardized test systems as mode of action indicators are required in pharmaceutical research, especially for the screening of potential therapeutical substances.

In this thesis, a 3-D skin tissue model, with air exposed keratinocytes, growing on a collagen type 1 matrix containing fibroblasts, forming an epithelial structure similar to the epidermis and comparable with real skin, was established as test system for

- I. *In vitro* wound healing studies. A model for
- II. *In vitro* skin tumor biology studies as well as for
- III. *In vitro* angiogenesis studies was created by cellular expansion and finally an
- IV. *In vitro* infection model, using *Candida albicans*, was developed for the study of infection mechanisms.

In order to establish the model (I) for *in vitro* wound healing studies, a human 3-D skin tissue model was lacerated using an Erbium-Yag laser, exactly defined concerning geometrie and energy. Thus it was possible to produce *in vitro* wounds of a standardized and reproducible size. Detection reactions for specific markers, used in immunohistology and real time PCR, were established with cells obtained from biopsies of voluntary donors. The functionality of the *in vitro* wound healing model was tested in regard to the effect of different, topically applied substances on reepithelialisation. A swelling of the epidermis in the marginal wound could be



demonstrated for the recombinant produced protein (Calgranulin C). Furthermore a consistency of *in vivo* and *in vitro* data of the cytokin interleukin1 $\alpha$ , which is expressed by keratinocytes after laceration, and the gene expression of  $\alpha$ 1-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase was demonstrated. First of all various melanoma cell lines were integrated into the skin tissue model in order to establish an *in vitro* tumor model (II). After establishing a seeding method successfully, primary melanoma cells were conditionally transformed with the inducible proto-oncogen (Xmrk). The aim was to obtain a reversible, i.e. inducible tumor cell line for the integration into the skin tissue model, by adopting this construct, which functionally combines the extracellular part of the EGF receptor with the intracellular domain of Xmrk. For the transformation, melanoma cells were transfected with EGF-inducible proto-oncogen: pRK5-HER-mrk as well as suitable controls and subsequently stimulated with EGF. The expression of the EGF-receptors was determined at various times using a flow cytometer. Furthermore a method for cell cycle analysis was established to determine successfully transformed melanoma cells. Cell cycle analyses of pRK5-HER-mrk transfected cells demonstrated, that the proportion of cells in the S-phase was twice as high for EGF-treated cells compared to EGF-untreated cells. Additionally, attempts to clone transfected cells in soft agar showed no growth and the monitoring of individually seeded transfected cells in a 6-well-plate and cell counts did not indicate an increased proliferation through transformation. After sorting transfected cells using FACS-Vantage, cells showed no further proliferation. An *in vitro* model (III) for angiogenesis was established. Microvascular endothelial cells were added to the tumor model for this purpose. Simulating the *in vivo* stimulation of angiogenesis by tumours as closely as possible to the natural situation was of importance. By that a test system was made available for tumour research, which makes possible the identification and validation of potentially anti-angiogenic active substances. At first, an increase in the formation of capillary-like structures was verified by the use of VEGF-additive. The integration of melanoma cells into the extended skin tissue model, containing microvascular endothelial cells, showed clearly the formation of capillary-like structures as a proof of concept. In addition a test system was established to study the mechanisms of pathogenicity and virulence of micro-organisms. This test system (IV) was used to study the adhesion and penetration of various *Candida* mutants *in vitro*. It was possible to demonstrate, that such *in vitro* test systems may represent suitable alternatives to

animal experiments in the context of infection research. *Candida albicans*, an asexual ascomycete of the genus *Candida*, was used to infect the model system. This fungus is part of the microbial flora of the epidermis and mucous membranes. The developed model system showed first signs of a penetrating infection with *Candida albicans*. *Candida albicans* possesses a dimorphism, an inducible alternation between yeast- and hypha form. Furthermore it could be demonstrated, that *C. albicans* adheres to tissue- and implant surfaces within 30 minutes in yeast form as well as in hypha form. The formation of germinal filaments is associated with the formation of specific covalent links to the tissue surface. During the progression of hypha formation, the penetration of the epithelium and the matrix of the model system within 48 h were observed. The entry of *Candida albicans* into the blood- and lymph circulation would be the consequence by comparison with the process in the human organism.

In addition, individual and synergetic effects of *Candida albicans* transcription factors EFG1 and CPH1 on their penetration and adhesion qualities in human epithelia were studied. With this 3-D skin tissue model could be demonstrated, that in the absence of the CPH1 factor, similar to the wild type, an adhesion and intensive penetration of the skin epithelium occurs. It is possible to clearly trace the different penetration processes of various *Candida albicans* strains by using artificial organ cultures.

## 2 Einleitung

### 2.1 Tissue Engineering

Zell-, Gewebe-, und Organkulturen sind heute unabdingbare Bestandteile der biomedizinischen Forschung. Im Focus steht hierbei das Tissue Engineering – Gewebekultivierung –, bei dem künstliche Binde- und Epithelgewebe, sowie neuronale Organoiden auf der Basis von kultivierten Zellen und mit Hilfe verschiedenster Biomatrizes hergestellt werden (Abbildung 1).

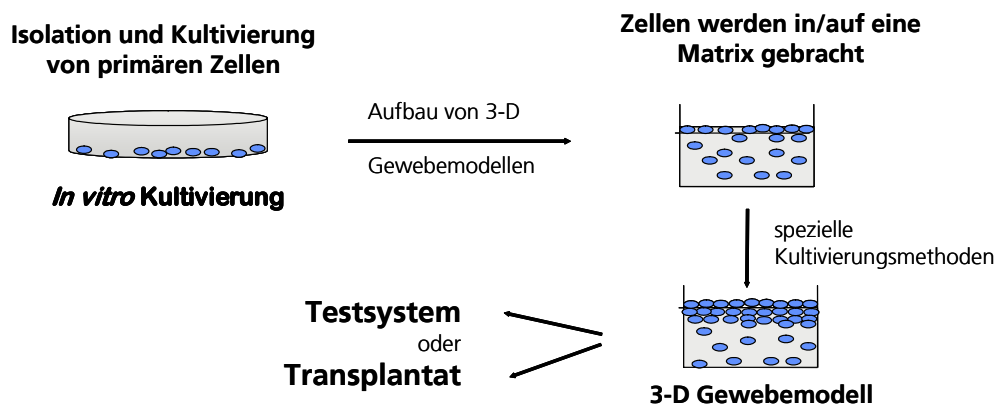


Abb. 1: Schematische Darstellung der Methode des Tissue Engineering.

Am weitesten fortgeschritten bei der Geweberekonstruktion ist die Herstellung von vitalem Hautersatz für Patienten mit schweren Verbrennungen. Die erste Transplantation eines derartigen Hautersatzes auf einen Menschen wurde durch O'Connor et al. (1981) durchgeführt. Die Haut war somit das erste mittels Tissue Engineering hergestellte Organ. Es folgt die Generierung von patienteneigenen Knorpeltransplantaten bei Verletzungen bzw. Veränderungen der Gelenkoberflächen bei notwendigen Operationen im Hals-, Nasen- und Ohrenbereich. Zukünftige Herausforderungen sind artifizielle Leberorganoiden oder die Entwicklung einer künstlichen Niere auf der Basis kultivierter Tubuluszellen für eine optimierte Dialysebehandlung.

Das Tissue Engineering ist jedoch nur möglich in enger Zusammenarbeit von Wissenschaftlern aus Biologie (vor allem Molekularbiologie und Zellbiologie), Medizin, Chemie, Biotechnologie und Materialwissenschaftlern (Abbildung 2).

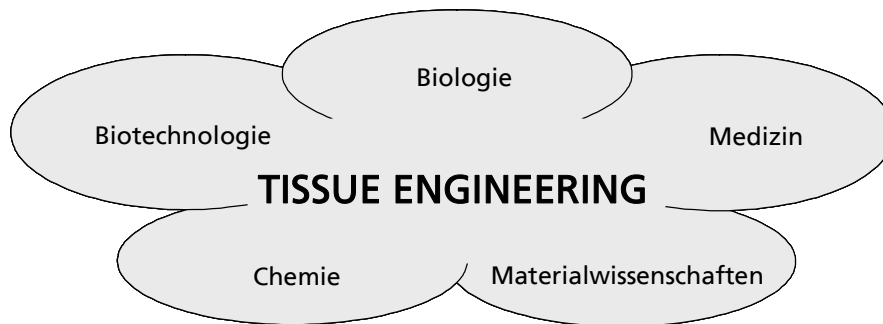


Abb. 2: Schematische Darstellung der in Tissue Engineering involvierten Disziplinen.

Tissue Engineering wurde auf einer Konferenz der National Science Foundation 1988 wie folgt definiert:

„...the application of principles and methods of engineering and life sciences toward fundamental understanding of structure-function relationship in normal and pathological mammalian tissues and the development of biological substitutes to restore, remain or improve tissue function“.

Das Prinzip des Tissue Engineering beruht darauf, Zellen humanen oder tierischen Ursprungs zu isolieren, zu vermehren und sicherzustellen, dass die Differenzierung der Zellen erhalten bleibt. Nur dann können die Zellen auch ihre Funktionen *ex vivo* korrekt erfüllen und als organoide Modelle in der Transplantationsmedizin und bei biomedizinischen Fragestellungen als *in vitro* Testsysteme eingesetzt werden.

Interagierende Gewebesysteme als eine optimale Alternative zu Experimenten an Tieren sind bereits praktische Realität und werden öffentlich gefördert (BMBF-Förderschwerpunkt: „Ersatzmethoden zum Tierversuch“). Auch die jüngste Verabschiedung des REACH Programms zur Bewertung von Altchemikalien verweist ausdrücklich auf den Einsatz von Alternativen Methoden hin.

Im Rahmen der Entwicklung und Prüfung von Arzneimitteln nach §2 des Arzneimittelgesetzes sind in den letzten Jahren zunehmend *in vitro* Testsysteme als Ersatz- bzw. Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen entwickelt und auch bereits erfolgreich eingesetzt worden [57; 165]. Viele Untersuchungen, die im Zusammenhang mit der Arzneistoffentwicklung stattfinden, sind am Ganztier nicht möglich oder führen zu fehlerhaften Aussagen. Gerade im Bereich der Krebsforschung, wo ständig neu entwickelte molekulare Targets für den therapeutischen Einsatz entwickelt werden, bieten sich *in vitro* Testsysteme für erste Beurteilungen an [123].

Das grundsätzliche Konzept zur Verminderung von Tierversuchen und als Leitidee von Ersatz- und Ergänzungsmethoden wurde von Russel und Burch [EU-Richtlinie 609/86 EWG] das 3R-Prinzip „replace, reduce and refine“ eingeführt. Dieses Prinzip sieht vor, dass entweder die Tierversuche durch *in vitro*-Methoden ersetzt werden (<sup>R</sup>replace) oder die Tierversuche durch sorgfältige Validierung, Informationsgewinn und -austausch sowie interdisziplinäre Zusammenarbeit vermindert werden (<sup>R</sup>reduce). Eine qualifizierte Haltung der Versuchstiere, die Gesundheitsvorsorge sowie das Vermeiden von unnötigen Qualen, z.B. durch Narkose, sollen die Versuchstiere entlasten (<sup>R</sup>refine).

Ein weiteres Anwendungsgebiet der organoiden Modelle ist das molekulare Targeting, die Klärung molekularer- und zellbiologischer Vorgänge.

Den Vorteilen der Testsysteme steht aber auch eine Reihe von Nachteilen gegenüber (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vor- und Nachteile von *in-vitro*-Testsystemen in der Toxikologie [172].

| Vorteile von <i>in-vitro</i> -Testsystemen  | Nachteile von <i>in-vitro</i> -Testsystemen  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ausschaltung systemischer Einflüsse</li> <li>➤ Wenig aufwendig</li> <li>➤ Reproduzierbar</li> <li>➤ Hoher Porbendurchsatz</li> <li>➤ Reduzierung der Tierversuchszahlen</li> </ul> | Ausschalten von <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ systemischen Einflüssen</li> <li>➤ komplexen Mechanismen</li> <li>➤ pharmakokinetischen Aspekten</li> </ul> |
| Prüfungen von Substanzen unterschiedlicher Dosierung an verschiedenen Testsystemen  | keine behördliche Akzeptanz der sicherheitstoxikologischen Bewertung von Arzneimitteln   |
| geringe Mengen an Testsubstanzen erforderlich   | geringe internationale behördliche Akzeptanz der toxikologischen Einstufung und Kennzeichnung chemischer Stoffe und Zubereitungen                                    |
| Ermittlung von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen   | Keine Erfassung von organspezifischen Eigenschaften  |

Bei der Entwicklung von organoiden *in vitro* Testsystemen werden oft Zelllinien eingesetzt. Diesen gehen aufgrund der Immortalisierung viele zellspezifische Eigenschaften wie z.B. morphologische und wachstumskinitische Charakteristika irreversibel verloren. [66; 97]. Auch folgt eine Zunahme der Tumorgenität. Aus diesen Gründen wird angestrebt, dass humane Primärzellen mit ihren weitgehend ursprünglichen organspezifischen Charakteristika in *in vitro* Testsystemen eingesetzt werden. Die erhaltenen Testergebnisse dieser realitätsnahen Modelle sind damit besser auf den Menschen übertragbar.

Eigenschaften wie ein

- veränderter Stoffwechsel
- veränderte Enzymexpression
- höhere Proliferationsrate
- verändertes Differenzierungsmuster

treten bei diesen Gewebemodellen nicht auf.

Die Erweiterung des 3-D Basishautmodells um humane primäre Zellen für biomedizinische Fragestellungen stellt daher einen zentralen Punkt dieser Arbeit dar.

## **2.2 Das Organ Haut**

Die Haut besteht aus der Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subcutis) [98; 17]. Sie dient als größtes Sinnesorgan zur Wahrnehmung von Schmerz, Berührung, Hitze und Kälte, reguliert die Körpertemperatur und hat immunologische Funktionen [20; 126]. Unter ihren vielfältigen Aufgaben ist die Schutzfunktion gegen Krankheitserreger, schädliche Umwelteinflüsse, mechanische Einwirkungen und Austrocknung besonders wichtig [170].

### **2.2.1 Die Epidermis**

Die Epidermis ist die äußerste Schicht der Haut und lässt sich histologisch in verschiedene Schichten einteilen (Abbildung 3). Über 90 % der Zellen sind Keratinozyten, die in der Epidermis in unterschiedlichen Differenzierungsstadien vorliegen. In diesen Stadien unterscheiden sich die Keratinozyten immunhistochemisch, physiologisch und in der Anzahl und Funktion ihrer Organellen. Die Differenzierung der Keratinozyten endet mit der Stratifizierung, der Ausbildung der Hornschicht, deren Zellschuppen durch Abschilferung verloren gehen. Alle Keratinozyten gehen aus einem Stammzellsystem hervor, das aus Keratinoblasten besteht. Dieses ist an der Grenze zwischen Epidermis und Dermis im *Stratum basale* lokalisiert. Die Zellen des Stammzellsystems bilden ein einschichtiges, säulenförmiges Epithel und sind über Hemidesmosomen mit der darunter liegenden Basalmembran verbunden. Untereinander stehen die Zellen über Desmosomen in Kontakt [91].

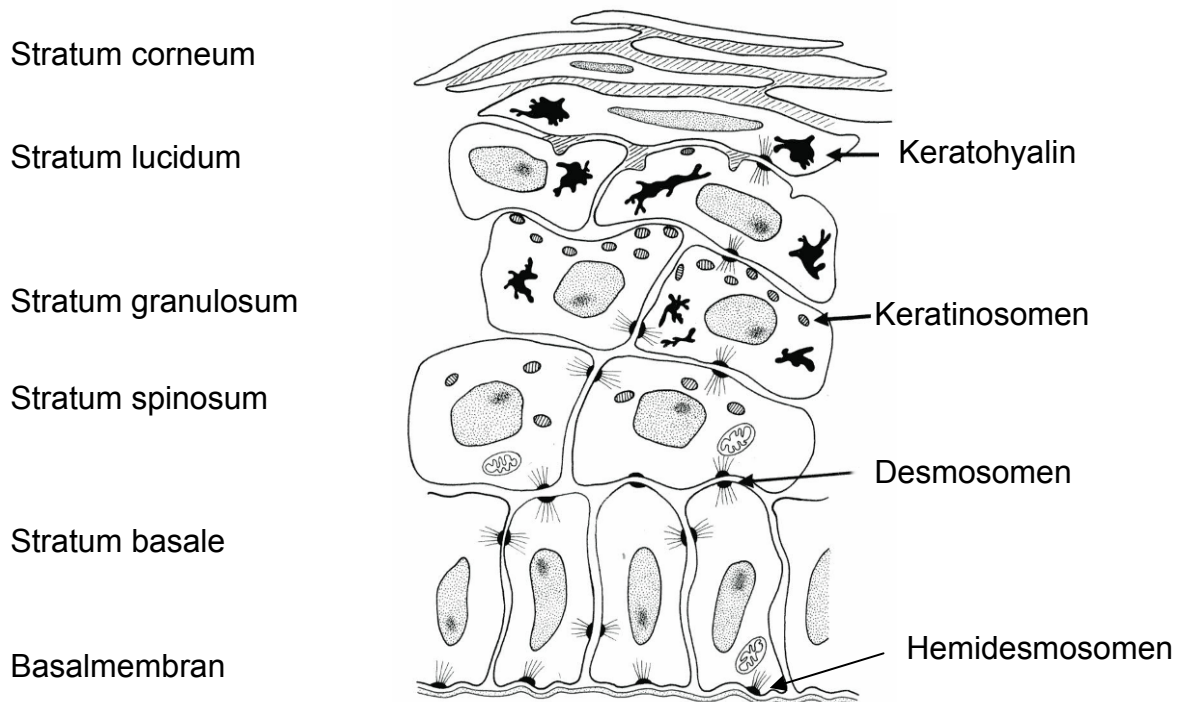


Abb. 3: Schematischer Querschnitt durch die humane Epidermis. Im Stratum basale stehen die Zellen säulenförmig auf der Basalmembran und sind über Hemidesmosomen mit dieser verbunden. Über Desmosomen stehen die Zellen untereinander in Kontakt. Nach dem Beginn der Differenzierung wandern die Keratinozyten in das Stratum spinosum und das Stratum granulosum. Es kommt zur Synthese von Keratohyalin und zur Bildung von Keratinosomen. Das Stratum corneum besteht aus multilamellaren interzellulären Lipidschichten, in die die ausdifferenzierten Keratinozyten (Korneozyten) eingebettet sind. Modifiziert nach Fritsch, 1990 [67].

In Folge von Differenzierungsvorgängen treten im *Stratum granulosum* in apikaler Richtung zunehmend intrazelluläre Organellen, die Keratinosomen auf. Für diese Organellen werden synonym die Begriffe "epidermal lamellar body", "Odland bodies" (nach ihrem Erstbeschreiber) oder "Cementosomen" verwendet. Diese 0,2 - 0,5  $\mu\text{m}$  großen sekretorischen Vesikel stammen aus dem Golgi-Apparat und enthalten neben geordneten, lamellaren Lipiddoppelschichten alle für die Ausbildung einer intakten Hornschicht notwendigen Komponenten [129]. Dazu gehören neben Lipiden (z. B. Ceramide, Fettsäuren, Sterole und deren Derivate) auch eine Vielzahl von Hydrolasen (z. B. Lipasen und Proteasen).

Apikal an das physiologisch sehr aktive *Stratum granulosum* schließt sich das physiologisch inaktive (tote) *Stratum corneum*, die Hornschicht, an. Es besteht aus enddifferenzierten Keratinozyten, den Korneozyten, die in multilamellaren Lipidschichten eingelagert sind [109]. An der Grenze beider Strata entsteht eine



Übergangszone, in der es zu einem massiven Umbau innerhalb der Keratinozyten kommt. Proteasen und Nucleasen bauen fast alle Zellorganellen, die RNA und die DNA des Keratinozyten ab [53].

Die Abschilferung ist ein enzymatisch kontrollierter Vorgang, der durch eine Serinproteinase kontrolliert wird [51; 117; 180]. Mehrere externe Faktoren beeinflussen die Differenzierung des Keratinozyten. Dazu gehören der epidermale Wachstumsfaktor EGF [153], der Tumornekrosefaktor TNF- $\alpha$ , der transformierende Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  [76], die Vitamine A, C und D [154], die Temperatur [153] und die Kalziumkonzentration [54]. Die genaue extrazelluläre Kalziumkonzentration ist nicht bekannt. Sie ist im *Stratum basale* niedrig, nimmt in apikaler Richtung zu und erreicht am *Stratum granulosum/Stratum corneum* Übergang das Maximum [130]. Die Kalziumkonzentration innerhalb der Epidermis unterliegt einer genauen Regulation [128]. Wahrscheinlich liegt die epidermale Kalziumkonzentration im millimolaren Bereich, da die Differenzierung der Keratinozyten *in vitro* 10 mM Ca<sup>2+</sup> benötigt [160]. Das apikal liegende *Stratum corneum* bildet durch seinen speziellen Aufbau die entscheidende Barriere der Epidermis [34]. Ohne das *Stratum corneum* würde der Mensch täglich 20 Liter Wasser transepidermal verlieren [127]. Bei intakter Barriere beträgt der Verlust nur 0,16 Liter pro Tag. Das entspricht 0,4 mg h<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> [110].

Die Haut wird neben ihrer Schutzfunktion auch zum Immunsystem zugehörig gezählt [20]. Die Bezeichnung: Haut-Assoziiertes lymphatisches Gewebe (skin-associated lymphoid tissue, SALT) wurde erstmals von Streilein J.W. (1983) verwendet. Zum SALT zählt man Langerhans-Zellen, Keratinozyten, epidermotrope rezirkulierende T-Lymphozyten-Subpopulationen der Epidermis und die assoziierten Lymphknoten der Haut. Das SALT mit seinen lymphatischen und nicht-lymphatischen zellulären und humoralen Bestandteilen erfüllt wichtige Funktionen im angeborenen und adaptativen Immunsystem. Die Keratinozyten spielen dabei eine aktive Rolle in der epidermalen Immunität und stellen die größte Komponente des SALT dar [175]. UV-Licht, Irritationen [159] und von anderen Zellen freigesetzte Zytokine induzieren die Aktivierung der Keratinozyten, die daraufhin ihrerseits Zytokine, Chemokine, Defensine, Interleukine IL-1, IL-6, IL-8, Kolonie stimulierende Faktoren (CSF), und Interferon (IFN) produzieren [102]. Eine erhöhte Expression von Fc $\gamma$ -Rezeptoren nach Einwirkung von Noxen und im Entzündungsgeschehen konnte von Cowan et al.

(1998) und Yuan et al. (1999) belegt werden. Des Weiteren stellten Bjerke et al. (1994) fest, dass Keratinozyten im *Stratum granulosum* der Haut hoch- und niedrigaffine Rezeptoren für IgG exprimieren können. Durch die Aktivierung wird hier die IL-1-Rezeptordichte erhöht, so dass die Zellen autokrin und parakrin aktiviert werden können.

### **2.2.2 Melanozyten**

Melanozyten enthalten in membranumhüllten Melanosomen das Pigment Melanin, das UV-Strahlung absorbieren kann, und übernehmen damit den Schutz vor Sonneneinstrahlung. Sie befinden sich zwischen basalen Keratinozyten sowie der äußeren Wurzelscheide und der Matrix der Haare. Eine epidermale „Melanin-Einheit“ besteht aus einem Melanozyt und etwa 36 Keratinozyten. Als Zellen neuronalen Ursprungs bilden Melanozyten keine desmosomalen Kontakte zu den Keratinozyten aus.

### **2.2.3 Die Basalmembran**

Basalmembran sind ubiquitäre extrazelluläre Matrixstrukturen, die verschiedene Gewebe voneinander trennen. Im Falle der Haut bildet die Basalmembran die Grenze zwischen Dermis und Epidermis. Die dermo-epidermale Junctionszone setzt sich in fixierten Präparaten aus der elektronendichten *Lamina densa* und der kontrastarmen *Lamina lucida* zusammen. Die Komponenten der Basalmembran werden von Fibroblasten und Keratinozyten produziert [35; 191]. Es handelt sich hauptsächlich um Kollagen Typ IV und Typ VII, Laminin, Fibronectin, Heparansulfatproteoglycane und das charakteristische Bullöse Phephigoid-Antigen. Beide Laminae enthalten verknüpfende Elemente wie „Anchoring Filaments“, Mikrofilamente und feine Kollagenfasern. Durch Hemidesmosomen sind die Basalzellen der Epidermis mit der *Lamina lucida* verbunden. „Anchoring-Fibrils“ und Mikrofilamente verbinden die *Lamina densa* mit den Kollagenfasern der Dermis [68; 91].

### 2.2.4 Zytokeratine

Charakteristisch für epidermale Zellen sind deren Strukturproteine, die Zytokeratine. Die Familie der Zytokeratine besteht aus 30 verwandten Proteinen [109]. Aufgrund von Homologievergleichen der Aminosäuresequenzen können die Proteine in saure (Typ I) und basische/neutrale (Typ II) Unterklassen eingeteilt werden. Die sauren Zytokeratine (9-20) haben ein relatives Molekulargewicht von 40-64 kDa, die der Unterklasse Typ II, besitzen ein relatives Molekulargewicht von 52-68 kDa [109]. In der humanen Haut werden entsprechend den Differenzierungsschichten spezifische Zytokeratine exprimiert. Das Expressionsmuster kann daher Auskunft über die hierarchische Organisation und den Differenzierungsgrad eines Epithelgewebes geben. CK-14/5 kommt ausschließlich in der Basalschicht normaler Epidermis vor. In suprabasalen, epidermalen Schichten sind die so genannten Reifungzytokeratine CK-1/10 und CK-1/11 zu finden. Sie kommen in terminal differenzierten und verhornten Zellen vor [109]. Unter physiologischen Bedingungen kommen in der humanen Epidermis keine irregulären Zytokeratine vor. Diese sind beispielsweise CK-4, -6, -7, -8, -13, -16, -17, -18 und -19 [14; 144]. CK-6/16 und CK-17 sind so genannte hyperproliferative Zytokeratine [19]. Irregulär ausdifferenzierte Epithelien synthetisieren CK-6/16, zudem ist das Zytokeratin-Paar ein Indikator für aktivierte Keratinozyten [149] und wird während der Wundheilung synthetisiert [21].

### 2.2.5 Die Dermis

Die dermale Matrix ist ein poröses Gel, dessen Gerüst aus Kollagenfasern (Typ I und Typ III), Retikulinfasern und Proteoglycanen besteht, in das Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen, Blutkapillaren und Nervenendigungen eingebettet sind. In den Poren der dermalen Matrix befinden sich zudem Wasser, Proteine, Kohlenhydrate, anorganische Ionen, Histamin und Serotonin. Das *Stratum papillare*, die oberste dermale Schicht, umfasst die Räume zwischen den epidermalen Reteleisten und besteht aus Matrix, die zahlreiche Zellen und Kapillaren enthält. Darunter liegt das *Stratum reticulare*, charakteristisch durch Kollagenfaserbündel, dicke, gewellte Bänder elastischer Fasern sowie wenig Zellen und Blutgefäße. Die unterste Schicht, die *Tela subcutanea*, besteht hauptsächlich aus Unterhautfettgewebe und zellarmem Bindegewebe [91; 93].

Fibroblasten sind die Matrixproduzierenden Zellen der Dermis. Mit ihren Fortsätzen bilden sie ein Netzwerk dermalen Zellen aus. Sie synthetisieren die Faser- und Matrixkomponenten der Dermis und liefern damit die Basis für den Aufbau des Organsystems Haut [81]. Die mesenchymalen Zellen dienen den Keratinozyten jedoch nicht nur als Matrixproduzenten, sondern produzieren Wachstumsfaktoren und/oder Zytokine, die wichtige Signale der interzellulären Kommunikation darstellen [39; 120]. Bei Wundheilungsstudien wurde deutlich, dass die Reepithelialisierung der Keratinozyten nicht autonom nach einem feststehenden Muster abläuft, sondern von Zytokinen reguliert wird. An der Produktion dieser Mediatoren sind neben den in die Wunde eingewanderten Zellen des Immunsystems auch Fibroblasten wesentlich beteiligt [70; 194].

### 2.3 *In vitro* Hautkulturmodell als Testsystem

Zweilagige Organotypische Kokulturen, welche dermale und epidermale Elemente kombinieren, werden auch als Hautäquivalente bezeichnet. Zur Herstellung werden meist humane Komponenten (Zellen, devitalisierte Dermis) und animale Komponenten (Kollagen) verwendet. Die verwendeten Techniken basieren alle auf dem gleichen Prinzip. Epithelzellen werden als Einzel- bzw. Mischsuspension oder als Explantate auf eine künstliche oder devitalisierte Matrix aufgebracht (Abbildung 4).

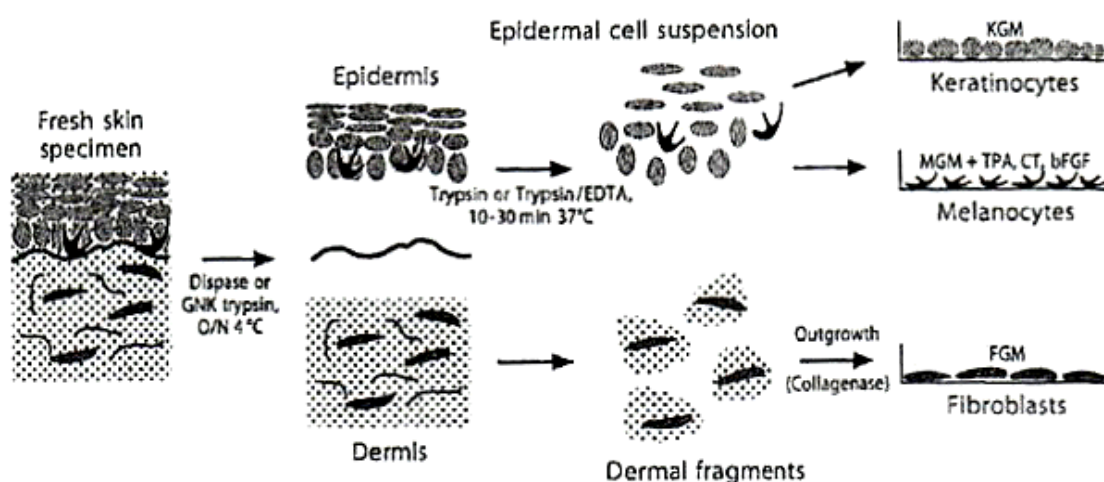


Abb. 4: Isolierung verschiedener Zelltypen aus der Haut (Quelle: Boelsma [17]).

Die Matrix enthält Fibroblasten als mesenchymale Zellen oder nur deren regulierende Wachstumsfaktoren. Durch das Einbringen von Zellen in 3-D "Gewebeulturen" und mit der Kultivierung des entstehenden Epithels an der Luft-Medium-Übergangszone gelang es, eine verbesserte Differenzierung der mehrschichtigen Epidermis zu erzielen [80; 128]. Die so genannte "air-liquid" Kultivierungsmethode induziert die Reifung und Ausdifferenzierung der Keratinozyten, die Stratifizierung der Epidermis mit der Bildung eines *Stratum corneum*. Die physiologische Ausbildung des *Stratum corneum* im Hautäquivalent ist entscheidend, um grundlegende Eigenschaften der normalen Haut, wie beispielsweise die Barrierefunktion, nachzuahmen. Einige Modelle benutzen synthetische Materialien um spezielle Hautlagen (Dermis, Epidermis) zu ersetzen [33; 151].

Inzwischen werden verschiedene Modelle kommerziell produziert. Sie werden entweder für die medizinische Wundversorgung, als so genannte interaktive Wundaufgabe bzw. Hautersatz („skin substitutes“), oder als alternative Testsysteme hergestellt und vermarktet [33]. Unterstützt werden diese Alternativen Methoden durch die kürzlich verabschiedete OECD „Prüfrichtlinie 428“ mit der zugehörigen „Technischen Leitlinie Nr. 28“ für die *In-vitro*-Prüfung auf Penetration von Fremdstoffen sowie Permeation durch die Haut auf sog. künstlicher menschlicher Haut.

Die Entdeckung von Biomaterialien führte zur Entwicklung dermalen Äquivalente auf der Basis von resorbierbaren Materialien. Ein Beispiel ist Dermagraft®, aufgebaut aus einer Matrix aus Nahtmaterial das in der Chirurgie eingesetzt wird [37]. Dieses Material wurde verwendet, um Fibroblasten zu kultivieren. Bei Anwendung in der Versorgung von schwer heilenden Wunden migrieren die Fibroblasten aus der Wunde in die Matrix und nach einiger Zeit beginnen sie mit der Produktion von Kollagenasen, so dass die Matrix abgebaut wird. Dermagraft wurde unter dem Namen Skin<sup>2</sup> als Testsystem für Forschungszwecke auf den Markt gebracht. In *in vitro* Studien mit diesem Testsystem konnten Mediatoren, die in der Wundheilung eine Rolle spielen untersucht werden [23]. Zentrale Fragestellung war hier der Grad an Temperaturerhöhung, welche eine Produktion von inflammatorischen Zytokinen in Fibroblasten und Keratinozyten induziert.

Für eine Reihe von Dermatologischen Fragestellungen werden Epidermismodelle wie SkinEthic®, EpiDerm® und EPISKIN® eingesetzt. Mit diesen Modellen wurden Untersuchungen zur Korrosivität, Sensibilisierung und Phototoxizität der Haut durchgeführt.

Von Bell et al. (1983) wurde das erste Verfahren zur Herstellung einer mehrschichtigen künstlichen Haut entwickelt, das in der Literatur beschrieben wurde. Hierbei werden allogene Bindegewebszellen in einer Matrix aus Rinderkollagen Typ I und Keratinozyten auf der Oberfläche dieser Matrix kultiviert. Diese künstliche Haut wird als Produkt unter dem Namen Apligraf® für die Versorgung von chronischen Wunden seit langem erfolgreich eingesetzt.

Apligraf® wurde unter dem Namen TESTSKIN™ als *in vitro* Testsystem auf den Markt gebracht. Der Einsatz von TESTSKIN™ lieferte für spezielle Fragestellungen zu Hautkrankheiten wie Psoriasis eindrucksvolle Ergebnisse. Von Saiag und Bell (1985) wurde gezeigt, dass psoriatische Fibroblasten eine Hyperproliferation von Keratinozyten induzieren. Bestätigt wurden diese Ergebnisse von Konstantinova et al. (1996). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Hyperproliferation der Keratinozyten auf eine vermehrte Ausschüttung von Interleukin 8 durch die psoriatischen Fibroblasten zurückzuführen ist.

In Arbeiten von Coulomb et al. (1984) konnte mit Apligraf® die Beteiligung von Fibroblasten an der Kollagensynthese und Wundkontraktion nachgewiesen werden. Parallel ist die Produktion von Peroxydasen als Marker für die Differenzierung von Fibroblasten analysiert worden.

Außerdem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass TESTSKIN™ eine geeignete *in vitro* Alternative zu *in vivo* Irritationsstudien ist [74; 113]. Unterstützt wurde diese Aussage von Perkins et al. (1999), der Haushaltsprodukte auf das Hautmodell EpiDerm™ applizierte und die Expression des Entzündungsmarker IL-1 $\alpha$  mit bekannten *in vivo* Daten für diese Produkte verglich. Er konnte ebenfalls übereinstimmende Werte für dieses Zytokin feststellen.

Augustin et al. (1997) entwickelten ein Hautäquivalent bestehend aus einem Kollagen/Glycosaminoglycan/Chitosan-Schaum mit eingebetteten humanen Fibroblasten. Darauf wurden dann Keratinozyten kultiviert. Sie setzten dieses Modell ein, um *in vitro* Alterungsvorgänge der Fibroblasten und Keratinozyten zu untersuchen. Ausgetestet wurde hierbei die Wirkung eines Biopeptids. Hier konnte

eindrücklich die Abhängigkeit der Epithelbildung von mesenchymalen Zellen dargestellt werden. Ohne Bindegewebszellen bildeten die Keratinozyten lediglich ein aus wenigen Schichten stark ausdifferenziertes Epithel aus. Fibroblasten dienen demnach in der Organotypische Kultur nicht nur dazu, extrazelluläre Komponenten zu produzieren, sondern synthetisieren auch lösliche Faktoren, die an der Regulation der Epithelialisierung beteiligt sind [66].

## 2.4 Wundheilung

Wundreparatur ist ein komplexer Prozess, der abhängig ist von einer ständigen Kommunikation der beteiligten Zellen. Wichtigste Botenstoffe sind dabei die Zytokine. Verliert die Haut durch Trennung der Gewebe ihre normale Architektur, spricht man im Allgemeinen von einer Wunde. Die Wundheilung stellt die Einheit des Gewebes wieder her. Sie ist ein dynamischer, interaktiver Prozess, der in zeitliche Phasen unterteilt werden kann: die Phase der Hämostase, die inflammatorischen Phase, die proliferative Phase und die reparative Phase.

In den vergangenen Jahren wurde deutlich, dass ein weites Netzwerk von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie IL-1 $\alpha$ , PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, KGF u. a. die epitheliale Wundheilung beeinflussen [35; 116; 131]. Zytokine und Wachstumsfaktoren sind regulatorische Peptide, die von nahezu allen Zellen des Körpers produziert und in die Umgebung abgegeben werden. Es sind bis heute ca. 50 verschiedene regulatorische Peptide bekannt. Sie sind in der Lage, verschiedenste Funktionen der Körperzellen zu steuern. Eine der wesentlichen Funktionen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in der Haut ist die Beeinflussung von Wundheilungsvorgängen und die Steuerung des Immunsystems, einschließlich der Regulation von Entzündungsvorgängen. Das bekannteste Zytokin der Haut ist das Interleukin 1, das von den Keratinozyten ständig synthetisiert und im Zytosol gespeichert wird. Im Gegensatz zu anderen Zellen produzieren Keratinozyten IL-1 konstitutiv, also auch in einem nicht aktivierten Zustand [126]. Von IL-1 werden zwei Formen beschrieben, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die unterschiedliche Primärstrukturen aufweisen, jedoch an dieselben Rezeptoren binden [45]. In der Wunde, in psoriatischen Läsionen, sowie in unversehrter Haut kann IL-1 $\alpha$  nachgewiesen werden. Die Produktion wird hauptsächlich vom epidermalen Kompartiment übernommen [45; 159].

Die genaue Kenntnis einzelner Vorgänge während der physiologischen normalen Wundheilung ist erforderlich, damit bei einem gestörten Wundheilungsverlauf spezifisch Einfluss genommen werden kann. Dazu müssen einzelne Informationen über die spezifischen Prozesse zugrunde liegenden Mechanismen und deren zelluläres Zusammenspiel durch klinische Studien, an *in vivo* Modellen und an *in vitro* Modellen gegeben werden.

In der folgenden Abbildung 5 sind die verschiedenen Stufen der Modelle zur Gewebefunktion aufgeteilt.

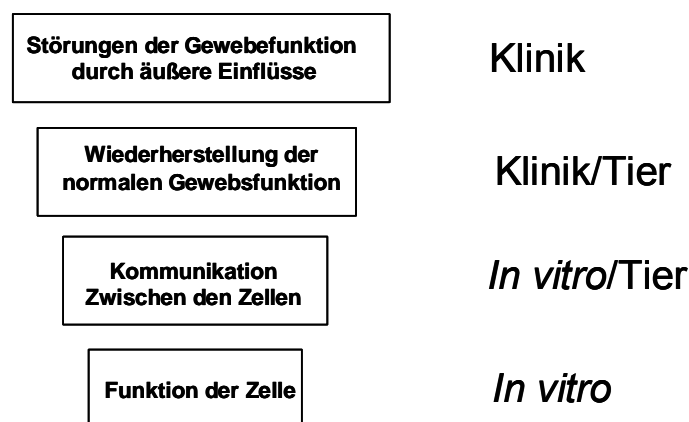


Abb. 5: Modelle zur Untersuchung von Gewebefunktion

### ***In vivo* Modelle**

Ob ein Medikament oder ein Therapiekonzept Wundheilungsstörungen verbessern kann, kann letztendlich nur am Patienten direkt erwiesen werden. Es ist jedoch nicht einfach genügend vergleichbare Patienten zu rekrutieren. Die Kriterien wie Alter des Patienten, Größe des Ulcus und der Zeitraum seit dem Auftreten müssen deshalb breit genug gewählt werden. Die Zahl der zur Abklärung der klinischen Wirksamkeit eines topischen Präparates steigt schnell auf eine Patientenzahl von 200 und mehr. So viele Patienten können nur in mehreren Kliniken und/oder über einen längeren Zeitraum rekrutiert werden. Daher sind Wundmodelle am Menschen und insbesondere am Patienten enge Grenzen gesetzt.



## **Tiermodelle**

Von der Beschaffenheit der Haut kommt das Schwein der des Menschen am nächsten [177]. Jedoch sind Tiermodelle für schwer heilende Wunden nur sehr schwierig zu realisieren. Daher ist die Verwendung von Tieren auf diesem Gebiet der Wundheilung rückläufig. Bei anderen Krankheiten wie chronischen Wunden, Psoriasis oder Vitiligo fehlen Tiermodelle ganz. Zudem stellt die starke Behaarung der Schweinehaut ein Problem dar.

## ***In vitro* Modelle**

Der Heilungsverlauf lässt sich ganz entscheidend auf die Interaktionen zwischen den spezifischen Zelltypen, auf Veränderungen der Funktionen einzelner Zellen im Raum und über die Zeit zurückführen. Des Weiteren sind auch Auswirkung genetischer Veränderungen einzelner Zellbausteine auf die Funktion der Zelle, auf die lokale Konzentration von Steuerfaktoren wie Wachstumsfaktoren, Interleukine etc. und auf physiologische Bedingungen wie Sauerstoff- und Nahrungszufuhr zu berücksichtigen. Weder am Tiermodell noch am Patienten ist es möglich die Auswirkungen solcher Veränderungen auf die einzelnen Zellpopulationen wie Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen isoliert zu betrachten.

### **2.4.1 *In vitro* Wundheilungsmodelle**

Die Interaktion von epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten *in vivo* wird als entscheidend für die Wundheilung und die zelluläre Entwicklung angesehen [125]. *In vitro* Fertigung von Konstrukten, in denen die benötigten Zelltypen in einer Matrix ein 3-D Gebilde formen, hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Ohkura und Terasa (1992) zeigten, dass die Kokultur von epidermalen Rattenzellen und Fibroblasten (3T3) die Biosynthese von Zytokeratinen und das Wachstum der epidermalen Zellen beschleunigen. Eine zusätzliche Steigerung der Reepithelisierungsrate in einer Fibroblasten-Keratinozyten-Kokultur kann durch die Anwesenheit von Fibrin oder Plasma erzeugt werden. Laplante et al. (2001) legten außerdem dar, dass die Reepithelisierung durch zwei sich ergänzende Mechanismen erfolgt. Zum einen wird durch die verstärkte Teilungsrate der Keratinozyten nahe des Wundrandes die superfizielle Schicht der Epidermis passiv zum Wundzentrum hin

geschoben, zum anderen erfolgt unter Beteiligung von Laminin 5 eine Migration einzelner Suprabasalzellen an die Spitze der Neoepidermis.

Grando et al. (1993) zeigten an einem *in vitro* Modell, dass die Migration von Keratinozyten unter einer Agaroseschicht verfolgt werden kann. Ein anderes von Moll et al. (1998) entwickeltes *in vitro* Modell diente zur Untersuchung der Reepithelialisierung. Frisch präpariertes Hautmaterial wurde epidermal verwundet und anschließend unter Luftexposition weiter kultiviert. Mittels spezifischer Marker wurde die Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten und die Bildung eines neuen Epithels beurteilt.

Weitere Untersuchungen wurden von Stephens et al. (1996) zur Migration und Proliferation von Fibroblasten und Keratinozyten vorgenommen. Hierbei dienten die Modelle als Testsystem der proliferativen Phase und während der Reepithelialisierung stattfindenden Vorgänge. Dazu wurden Hautäquivalente aus Kollagen-Gel mit eingebetteten Fibroblasten und einer aufgelagerten Schicht Keratinozyten mit Ausstanzungen beschädigt und auf ein anderes Kollagen-Gel ohne Fibroblasten aufgesetzt. Morphologische Untersuchungen zur Migration der Fibroblasten und Keratinozyten dienten als Grundlage zur Bewertung für die Wundheilung.

Auch die Wundkontraktion kann *in vitro* untersucht werden. Mit einem dermalen Äquivalent, das aus einem Kollagen-Gel mit verschiedenen Fibroblasten besteht, konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten, die aus einer Wunde stammen, im Vergleich zu normalen Fibroblasten einen größeren Anteil an Aktin-Filamenten besitzen und somit eine stärkere Kontraktion des Kollagen-Gels verursachen [10; 137].

Auch besondere Formen der Narbenbildung, wie die Keloide, konnten *in vitro* untersucht werden. Fibroblasten, die aus Keloiden stammten zeigten gegenüber normalen Fibroblasten eine deutlich vermehrte Proliferation bei *in vitro* Kultivierung [30].

1987 belegten Pentland et al. in einem Wundmodell zudem, dass nach fokaler Zerstörung von humanen Keratinozyten in einer Zellkultur eine erhöhte COX-Aktivität mit daraus resultierendem PGE<sub>2</sub>-Anstieg zu beobachten ist. Sie schlossen daraus, dass der interzelluläre Kontakt eine wichtige Rolle im Rahmen der PGE<sub>2</sub>-Synthese spielt. Im Anschluss an die Phagozytentätigkeit (Mikrodebridgement) proliferieren die

mesenchymalen Zellen und sezernieren Grundsubstanz. Der Gewebsdefekt wird letztendlich durch Gefäßneubildung und durch Zellproliferation bzw. Vernarbung des Stützgewebes in Verbindung mit Epithelregeneration repariert [52].

Proliferation und Differenzierung von epidermalen Keratinozyten nehmen demnach in der abschließenden Wundheilung einen hohen Stellenwert ein [122]. Während der Epithelisierung werden die Keratinozyten der Wundränder mobilisiert und beginnen in Wundrichtung zu migrieren (Abbildung 6). Bei partiellen, oberflächlichen Hautverletzungen kann dieser Vorgang sofort nach der Verwundung beginnen.



Abb. 6: Die Basalzellschicht ist zerstört und wird durch Abflachen und Migration der wundnahen Keratinozyten wieder hergestellt (Quelle: Martin [122]).

Maas-Szabowski (1997) konnte in einer Organotypischen Kultur nachweisen, dass Keratinozyten in Kokultur mit Fibroblasten IL-1 freisetzen. Darüber hinaus trug IL-1 sichtbar zur Ausbildung gut strukturierter Epithelien bei. Das von Keratinozyten freigesetzte IL-1 übt regulierenden Einfluss auf die Epithelbildung aus und ist damit vergleichbar zur Wundsituation. Der IL-1 vermittelte Signalweg ist maßgeblich an beiden Prozessen beteiligt.

Die Überprüfung der Funktionalität des in dieser Arbeit angestrebten *in vitro* Wundheilungsmodells beschränkt sich auf die Betrachtung der Reepithelialisierung der Keratinozyten und die Expression des Interleukin 1, da dessen Interaktion in der Organotypischen Hautkultur als Entscheidend gilt [118].

## 2.5 Angiogenese

Angiogenese ist die Bildung neuer Blutgefäße aus dem bereits vorhandenen Blutgefäßsystem. Da Angiogeneseprozesse wesentlich an einer Reihe von weit verbreiteten Krankheiten wie Krebs, Psoriasis, Wundheilung, Entzündung und Herz-Kreislaufkrankungen beteiligt sind, wurde in den letzten Jahren intensiv nach neuen Substanzen gesucht, mit denen die Angiogenese therapeutisch beeinflusst werden kann. So ist beispielsweise das Wachstum und die Metastasierung der Tumore von einer ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen abhängig. Viele Tumorzellen sind in der Lage, benachbarte Zellen zur Angiogenese zu stimulieren, um so die eigene Versorgung zu gewährleisten [88]. Eine Hemmung der Angiogenese könnte diese Versorgung begrenzen und somit das Wachstum des Tumors zum Stillstand bringen. Gleichzeitig wird die Gefahr einer Metastasierung durch den Tumor verhindert.

Die Erforschung von Wirkstoffen zur Angiogenesehemmung steht noch weitgehend am Anfang [61]. Die Identifizierung von anti-angiogener Wirkung erfolgt weltweit vor allem im Tierversuch. Diese Modelle zeigen allerdings ein sehr komplexes Portrait der Angiogenese auf. Die drei am häufigsten verwendeten Modelle sind rabbit corneal pocket, hamster cheek pouch und chicken chorioallantoic membrane assays [58; 59; 60; 61]. Alle drei Modelle leiden unter der künstlich ausgelösten Angiogenese, da zur Aufrechterhaltung der Angiogenese eine lang anhaltende Freisetzung von angiogenen Mediatoren notwendig ist [111]. Ein weiteres Problem ist der komplexe apparative Aufwand zur Datenauswertung.

### 2.5.1 *in vitro* Hauttumormodelle

Als „krebssiges, pilzartiges Gewächs, teilweise weiß, teilweise schwammartig weich und schwarz“ beschrieb John Hunter (1728-1793) im Jahre 1787 erstmals die Hautveränderung, die wir heute als malignes Melanom bezeichnen [16]. Mit dem Erstbeschreiber John Hunter beginnt der dokumentierte Teil der Geschichte des malignen Melanoms, dessen Entdeckung und Erforschung bis heute andauert. René Laennec (1781-1826) war es, der als erster den Begriff „Melanosis“ (melanos [griech]: schwarz) prägte. In der aktuellen Entwicklung im Kampf gegen das Melanom werden molekularbiologische, immunologische und virologische

Untersuchungen hinzugezogen. Sie sollen bei der Entwicklung neuer Therapieformen unterstützend helfen. So werden neben der Immunintervention mit der Gen- und Vakzinierungstherapie neue, ermutigende Erfolge verzeichnet [26; 100; 139]. Das maligne Melanom ist ein hochmaligner Tumor, der durch eine bemerkenswert frühzeitige Metastasierungstendenz gekennzeichnet ist (etwa 65% aller Erstmetastasierungen betreffen das Lymphabflusssystem). Die maligne Entartung geht von den Melanozyten aus, die in der Basalzellschicht der Epidermis beheimatet sind.

Als neuroektodermaler Tumor befällt das maligne Melanom neben Haut und Schleimhaut auch Augen und Hirnhaut. Es stellt die aggressivste aller Hautkrebserkrankungen dar. Langzeitanalysen zeigen, dass die Neuerkrankungen seit 1973 mit einer Steigerungsrate von 3-7% jährlich schneller zunehmen als andere Tumorerkrankungen [46]. Zellen des malignen Melanoms lösen sich sehr früh aus ihrem Zellverband, durchwandern das Bindegewebe und dringen in das Blutgefäßsystem ein – Metastasen in den Lymphknoten, in der Lunge, in der Leber oder im Gehirn entstehen. Einige Zellen sind schon auf Wanderschaft, wenn das Melanom einen Millimeter dick ist. Wie sich die Melanomzellen ihren Weg durchs Bindegewebe bahnen, wird bislang nur in Ansätzen verstanden. Ende der sechziger Jahre entwickelten Clark et al. (1984) Kriterien für die Unterscheidung klinisch-histologischer Subtypen des malignen Melanoms: Das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NMM), das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) und das akrolentiginösen Melanom (ALM). Für die Diagnose hilfreich ist die so genannte ABCDE-Regel, mit der Asymmetrie, die Begrenzung, die Farbe (Color), der Durchmesser und die Erhabenheit der Läsion beurteilt werden. Dabei wird histologisch der Tumor von der Obergrenze des *Stratum granulosum* bis zu seiner tiefsten Stelle ausgemessen. Während eine Tumordicke von 1 mm oder darunter nach 10 Jahren mehr als 90 % der Patienten überleben, sind es bei einer Tumordicke von mehr als 4 mm weniger als die Hälfte. Die Zehnjahresüberlebensrate bei Lymphknotenmetastasen liegt bei etwa 30%, bei Fernmetastasen unter 5 % [50]. Die Überlebenszeit der Patienten hängt also stark von der Metastasenbildung des Tumors ab. Die Messung des invasiven Verhaltens von Tumorzellen stellt daher in der Krebsforschung ein zentrales Forschungsgebiet

dar [89; 155]. Eine Möglichkeit zur Analyse dieses Verhaltens stellt die Untersuchung von Tumorzellen an 3-D Gewebekulturmodellen dar.

Ein erster Schritt soll daher die Implantation von Hautmelanomen in das Basishautmodell sein. In Publikationen von Berking et al. (2001) und Dekker et al. (2000) wurden bereits erfolgreich Melanomzelllinien in ein 3-D Hautmodell eingebaut. Diese Publikationen beschäftigen sich mit dem Wachstumsverhalten von Melanomen verbunden mit Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen von Zelllinien in einem Hautmodell. Untersucht wurde die Migration, Invasion und Produktion von Wachstumsfaktoren der eingesäten Melanomzelllinien.

Die Zelllinien sind aufgrund krebsähnlicher Entartung unbegrenzt teilungsfähig und deshalb teilweise über Jahrzehnten in Kultur zu halten. Sie besitzen mit ihrem Ursprungsgewebe, insbesondere in Bezug auf ihren Stoffwechsel, kaum noch Ähnlichkeiten, weshalb die Aussagekraft der mit ihnen durchgeführten Experimenten geringer ist. Daher rückt die Verwendung von primären Zellen, gerade im Bereich der Therapieentwicklung immer stärker in den Vordergrund. Primäre Zellen sind jedoch besonders schwer zu transfizieren. Grund dafür ist die geringe Teilungsaktivität dieser Zellen. Bei der, vor allem bei Zelllinien, verwendeten Lipofektion wird die DNA zunächst ins Zytoplasma geschleust und gelangt erst nach Auflösung der Kernmembran, d.h. nach der Zellteilung in den Zellkern. Deswegen führt die Anwendung der Lipofektion für primäre Zellen meist zu relativ niedrigen Transfektionseffizienzen. Heute werden für die Transfektion primärer Zellen hauptsächlich virale Vektoren verwendet. Diese haben jedoch einige Nachteile:

- Zeitaufwändige Entwicklung der Vektoren
- Hohe Anforderungen an die Biosicherheit
- Hohe Kosten

Virenspezifische Effekte wie Zytotoxizität, Rekombinogenität oder Infektiösität sind nur z.T. kontrollierbar. Zudem kann das Einbringen viraler Vektoren den Stoffwechsel der Zelle signifikant beeinflussen, so dass biochemische Zusammenhänge verfälscht werden.

Eine relativ neue Methode für den Gentransfer in primäre Zellen stellt die Nukleofektion dar. Bei dem auf der Elektroporation basierendem Verfahren werden elektrische Impulse in spezifischen Reagenzien auf die Zellen abgegeben. Impulse und Reagenzien sind jeweils für einen bestimmten Zelltyp optimiert. Dieses

Verfahren bewirkt, dass die DNA direkt in den Zellkern gelangt. Da bei einem DNA-Transfer in den Zellkern (Nukleofektion) die Wirkung des transferierten Materials nicht abhängig von der Zellteilung ist, sind auch langsam bzw. nicht-proliferierende Zellen dem Gentransfer zugänglich [81].

Hamm et al. (2002) transfizierten primäre Melanozyten mittels Nukleofektion mit dem Plasmid pEGFP und erreichten mit dieser Methode eine Transfektionseffizienz von 44,4%, während mittels Lipofektion nur 4,2 % erreicht wurden.

### **Der Zahnkarpfen *Xiphophorus* und sein Proto-Onkogen *Xmrk***

Der Aquarienfisch der Gattung *Xiphophorus* eignet sich als Modellsystem für die Erforschung des auslösenden Mechanismus der Tumorentstehung. Seit den 20er Jahren ist bekannt, dass allein durch die Kreuzung bestimmter Arten bei den Nachkommen Melanome entstehen. Mit einem klassischen Kreuzungsexperiment wurde ein Modell entwickelt, nach dem die Entstehung dieser Tumoren auf der unregulierten Aktivität eines Tumorgens beruht [184]. Bei den Elternfischen wird das Tumorgen noch durch ein Regulatorgen kontrolliert. Da sich Tumorgen und Regulatorgen auf unterschiedlichen Chromosomen befinden, kann durch Kreuzungsexperimente ein das Regulatorgen tragende Chromosom durch ein Regulatorgen-freies ersetzt werden. Danach kann das Tumorgen in den folgenden Generationen aktiv werden [167].

Dieses Tumorgen, das beim Zahnkarpfen *Xiphophorus* Melanome auslöst, konnte isoliert werden und wurde *Xmrk* (**X**iphophorus **m**elanoma **r**ezeptor **k**inase) genannt. Das Tumorgen *Xmrk* kodiert für eine Rezeptor Tyrosin Kinase, die verwandt ist mit dem humanen EGF-Rezeptor. In 80 % der Melanommetastasen beim Menschen konnte ein erhöhter Transkriptionslevel dieses Rezeptors festgestellt werden. Bei *Xmrk* kommt es zu einer genetisch induzierten Überexpression einer onkogenen, konstitutiv aktiven Rezeptor Tyrosin Kinase der Familie der EGF-Rezeptoren. Durch diese Überexpression kommt es in *Xiphophorus* zur Bildung von malignen Melanomen. Die konstitutive Aktivierung des onkogenen *Xmrk*-Rezeptors beruht auf zwei Mutationen, die die Bildung eines stabilen, Liganden unabhängigen Rezeptor-Dimers hervorruft. Die Signaltransduktion ist gestört, es kommt zur Bildung von Tumorzellen und damit zur Entstehung von Melanomen [78].

### **Die Vektoren pRK5-HER-mrk und pRK5-Xmrk-ATP**

Für das Verständnis der Funktion des Xmrk Proteins im Prozess der neoplastischen Transformation, konstruierten Wittbrodt et al. (1992) einen Hybridvektor. Sie verwendeten den **Human Epidermal growth factor Receptor (HER)** und konnten so die Signaltransduktionsfunktion der zytoplasmatischen Domäne von Xmrk mit EGF stimulieren. Sie konnten nachweisen, dass die HER-mrk Chimäre ein starkes Onkogen darstellt, das nach Aktivierung durch die Ligandenbindung eine Transformation der Zelle auslöst [190]. Scharfl et al. (1992) klonierten einen weiteren Vektor der die vollständige Sequenz des Xmrk mit einer mutierten ATP-Bindungsstelle der Kinasedomäne aufweist. Dort befand sich an Nukleinsäure-Position 3205 eine K zu A-Mutation (in diesem Fall GCA statt AAA). Dieses Konstrukt ist aufgrund dieses ATP-Bindungsdefizits konstitutiv inaktiv und kann als Negativkontrolle verwendet werden [167].

### **v-erbB Onkogene/ Vektor pSP64-erbB**

1983 wurde das aus Veränderung des EGF-Rezeptorgens entstandene v-erbB Onkogen erstmals charakterisiert. Es zeigte sich das v-erbB, das Tumorinduzierende Gen des AEV (avian erythroblastosis virus), die kodierte Information für einen strukturell veränderten und dadurch unkontrollierte Signale sendenden EGF-Rezeptor enthielt. Offenbar war die unterbrochene Signalaktivität des v-erbB Onkoproteins unverträglich für die infizierte Zelle und resultierte in einer Störung, die letztlich zur Transformation der Zelle führte. Dies war die erstmalige Entdeckung der direkten Verwandtschaft zwischen einem normalen Wachstumsregulierenden Rezeptor und einem Krebsinduzierenden Onkoprotein. In A431 Zellen (Zervixkarzinomzellen) war das erbB-Gen abnorm amplifiziert [186]. Die Überexpression von erbB-Genen wurde später in vielen Tumoren (u.a. Adenokarzinomen) entdeckt. Da v-erbB Onkogene also eine ähnlich tumorinduzierende Funktion erfüllen wie Xmrk, wurde mit dem Vektor pSP64-erbB ein Expressionskonstrukt für erbB als Positivkontrolle eingesetzt.

### **Transfektion von HER-mrk in murinen Melanozyten**

Zur Untersuchung der Tumorentstehung durch MAPK (**Mitogen Activated Protein Kinase**) in Pigmentzellen, transfizierten Wellbrock et al. (2002) murine Melanozyten



(Melan-A cells, Zelllinie) mit HER-mrk. Sie erhielten eine stabil transfizierte Zelllinie, die den Chimären und deshalb regulierbaren Rezeptor Xmrk exprimieren. Diese Chimäre bestand aus dem extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors und dem intrazellulären Teil von Xmrk. Weiterhin wurden die Zellen mit 8 nM EGF stimuliert, wobei Wildtyp Melan-A Zellen den EGF-Rezeptor nicht exprimieren und deshalb keine Reaktion auf die Stimulation zeigten [188]. So konnten sie ein Tyrosin-phosphoriliertes 165-kDa Protein mittels Western Blot bei den transfizierten und mit EGF stimulierten Zellen nachweisen. Sie fanden außerdem bei den transfizierten, mit EGF-stimulierten Zellen einen transformierten Phänotyp mit morphologischen Veränderungen, den Verlust von Kontakt-Inhibition und 3-D Wachstum.

Mit dem Proto-Onkogen Xmrk sollen die primären humanen Melanozyten transfiziert werden. Durch den Einsatz dieses Konstruktes, das den extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors mit der intrazellulären Domäne von Xmrk funktionell kombiniert, soll eine reversible, d.h. induzierbare Tumorzelllinie erhalten werden. Diese induzierbare Zelllinie soll dann in das Basishautmodell integriert werden und stellt so die Grundlage für das *in vitro* Tumormodell.

### **2.5.2 *in vitro* Angiogenese**

Anschließend soll das *in vitro* Tumormodell mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen erweitert werden. Dadurch soll die von den Melanomen ausgehende Stimulierung der natürlichen Angiogenese in einem 3-D Modell nachgebildet werden können [90; 92 152]. *In vitro* Fertigung von Konstrukten, in denen die benötigten Zelltypen in einer Matrix ein 3-D Gebilde formen, hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Diese Modelle der *in vitro* Angiogenese berücksichtigen die dritte Dimension und stellen daher realitätsnahe *in vitro* Systeme dar. Sie sind unter anderem dazu geeignet zur Untersuchung der Wirkung von:

- pro-angiogenen Faktoren [94; 103]
- anti-angiogenen Substanzen [34]
- Matrixmetalloproteinasen [182]
- Zelladhäsionsmolekülen [6; 7]
- Fibrinolyse während der Bildung kapillarähnlicher Strukturen [106; 184]

Da die extrazelluläre Matrix sowohl durch physikalische, als auch durch chemische Effekte den Differenzierungszustand der Zellen beeinflusst, wurde damit begonnen,

die Zellen in verschiedene Matrices einzusäen. Die Endothelzellen können dabei von einem Gel überschichtet werden [146; 169] auf einem Gel [135] oder zwischen zwei Gelschichten („Sandwich“) kultiviert werden [32; 134]. Zur Verfolgung der *in vitro* Tumorangiogenese, ist es notwendig, organoide Strukturen aufzubauen, die dem *in vivo* Zustand möglichst nahe kommen [152]. Über die Notwendigkeit dieser Basalmembran-Komponenten wurde sehr eindrucksvoll in einer Übersicht von Baatout et al. (1997) berichtet. Hierbei wurde ein Trägermaterial, bestehend aus einem Basalmembran-Extrakt der Engelbreth-Holm-Swarm-Tumorzellen (Matrigel®), eingesetzt. Die wichtigsten Bestandteile des Matrigel® sind Laminin, Kollagen Typ IV, Entaktin und Heparan-Sulfat-Proteoglykan, sowie nicht näher spezifizierte Wachstumsfaktoren. Matrigel® wird als spezielles Kulturmateriale für Endothelzellen angeboten. Als Nachteil ist bei diesem Trägermaterial anzusehen, dass es nicht definiert ist, was die Vergleichbarkeit dieses artifiziellen Angiogenese Modells zur *in vivo* Situation nicht gewährleistet. Versuche zur Einsaat ganzer vaskulärer Gefäße aus humanen Plazentablutgefäßen, die in Fibrin Gel eingelegt wurden, sind von Brown et al. (2001) durchgeführt worden. Die Entwicklung des Modells zielte darauf ab, ein System zu generieren, in dem endogene Wachstumsstoffe, die eine Angiogenese auslösen, aufzuklären. Mittels RT-PCR wurden die Wachstumsfaktoren aFGF, bFGF, VEGF und deren Rezeptoren auf den neu gebildeten Mikrogefäßen und den ursprünglichen Gefäßen identifiziert. Durch Zusatz von Antikörpern gegen diese Wachstumsfaktoren konnte eine Inhibition der Expression dieser Faktoren beobachtet werden. Durch Zugabe von angiogenen Mediatoren in das Medium wurde eine Verstärkung der mRNA Expression beobachtet [27]. Ponec et al. (2004) entwickelten ein *in vitro* Modell in dem Melanozyten und dermale mikrovaskuläre Endothelzellen in ein Vollhautäquivalent eingebracht wurden. Sie konnten zeigen, dass die Fibroblasten entscheidend an der Bildung eines 3-D Netzwerks der Endothelzellen *in vitro* beitragen. Sie konnten mittels RT-PCR nachweisen, dass sowohl Fibroblasten als auch Keratinozyten an der Produktion von aFGF, bFGF und VEGF beteiligt sind. Die Einsaat der Melanozyten in das *in vitro* Modell unterstützte die Bildung einer voll ausdifferenzierten Epidermis.

Ein anderes Modell (Ratten-Aorten-Modell) basiert auf der Kultivierung von Ratten Aorten. Die Aorta wird von 8-10 Wochen alten Ratten aus dem Thorax extrahiert und vorsichtig von dem umgebenden Gewebe befreit. Die Aorta wird dann in 1 mm lange

Ringe geschnitten und in Kulturplatten unterschiedlicher Größe in eine Matrix eingebettet [140; 141].

Kokulturmodelle erlauben die Untersuchung heterolytischer zellulärer Interaktionen während der Bildung kapillarähnlicher Strukturen *in vitro*. Endothelzellen werden mit stromalen Zellen mit und ohne Zusatz komplexer Matrices kultiviert. Als stromale Zellen werden Fibroblasten, Perizyten, glatte Muskelzellen oder Granulosazellen eingesetzt [156]. Die Implantation isolierter humaner Endothelzellen in ein artifizielles Hautmodell, stammt von Black et al. (1998). Hierbei sind HUVEC mit den Hautzelltypen der Haut, Fibroblasten und Keratinozyten, kokultiviert worden und so die Ausbildung einer differenzierten extrazellulären Matrix gefördert worden. Als Trägermaterialien wurde eine Mischung aus Chitosan/Kollagen eingesetzt. Erstmals ist ein System etabliert worden, dass aus humanen dermalen Fibroblasten kokultiviert mit HUVEC in einer Chitosan/Kollagen Matrix aufgebaut wurde. Auf diese Matrix wurden humane Keratinozyten ausgesät. Elektronenmikroskopisch konnte nachgewiesen werden, dass HUVEC ein Netzwerk aus Kapillargefäßen gebildet haben [13].

Donovan et al. (2001) verglichen die Morphologie gebildeter kapillarähnlicher Strukturen in drei *in vitro*-Assays mit den morphologischen Eigenschaften von *in vivo* gebildeten Kapillaren. Sie kultivierten HUVEC auf Matrigel®, GFR Matrigel® sowie als Kokultur mit Fibroblasten. Während sich in den Matrigel-Assays die kapillarähnlichen Strukturen innerhalb von 24 h ausbildeten, zeigen diese nur geringe morphologische Ähnlichkeit zu Kapillaren *in vivo*. Es wurden nur kurze (< 20 µm), relativ homogene kapillarähnliche Strukturen beobachtet. Im Gegensatz dazu entstand im Langzeit-Kokulturmodell ein eher heterogenes Muster kapillarähnlicher Strukturen unterschiedlicher Länge, welches eine höhere endotheliale Aktivität reflektiert und eine größere Ähnlichkeit zu Kapillaren *in vivo* aufweist [49].

## 2.6 Einsatz von *in vitro* Infektionsmodellen

*Candida albicans* ist der am häufigsten isolierte pathogene Pilz im Menschen. Er infiziert die Haut und ruft bei immunsupprimierten Patienten lebensbedrohliche schwere systemische Infektionen hervor [36]. Die Ausbreitung von *Candida albicans* kann im menschlichen Körper nur unter bestimmten Bedingungen erfolgen. Die Pilzzellen müssen am Wirtsgewebe anhaften und dieses penetrieren können. Diese Eigenschaften ermöglichen die Verbreitung über Blut- und Lymphsystem und stellen somit die Ursache für systemische Infektionen [38].

### Adhäsion an Oberflächen

Die Anheftung von *Candida albicans* an eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächen ist in der Literatur ausführlich mit zum Teil widersprüchlichen Befunden beschrieben worden [161]. Von Bedeutung sind im Falle von Infektionen Oberflächen wie das Wirtsgewebe, Prothesen, Katheter oder Infusionssysteme. Das Adhäsionsverhalten von *Candida albicans* ist von mehreren externen Faktoren, wie z.B. der Wachstumsphase, dem verwendeten Medium und der Kultivierungstemperatur abhängig. Der zellulären Oberflächenhydrophobizität wird eine entscheidende Rolle bezüglich der Adhärenz auf Gewebe und Plastikoberflächen zugesprochen [85; 86]. Eine gesteigerte Adhäsion wird beispielsweise im Zusammenhang mit der Bildung von Keimschläuchen, die eine Penetration des Wirtsgewebes erlauben, beobachtet [158]. Ein vollständiges Bild über die Adhäsionsmechanismen von *Candida albicans* besteht zurzeit noch nicht. Es wurde jedoch ein „2-Stufen-Modell“ zur Beschreibung des Adhäsionsvorgangs beschrieben [178].

In der ersten Stufe erfolgt die Anlagerung über unspezifische Wechselwirkungen, die eine Haftung am Gewebe trotz äußerer Krafteinwirkung ermöglicht. Mehrere Komponenten sind an diesem Prozess beteiligt: Zellwandassoziierte Proteine, Zellwandverknüpfende Proteine und Polysaccharide. Trifft der Pilz auf eine verminderte Wirtsabwehr, setzt er sich gegen diese durch, bildet Keimschläuche und später Hyphen aus. Die Zusammensetzung der Pilzzelloberfläche ändert sich durch eine Neuregulation der Transkription [25]. Die Synthese hyphenspezifischer Zellwandproteine wie Hwp1p, Hyr1p und Als3p wird induziert. Als zweite Stufe des Modells wird die Bildung kovalenter Bindungen (Dipeptidbrücken) zwischen Wirt und Pathogen angesehen.

## **Invasion in Gewebe**

Die Invasion ist der entscheidende Schritt von der lokalen zur Systemischen Infektion. *Candida albicans* überwindet diese natürliche Infektionsbarrieren, wie Epidermis oder Schleimhäute und kann so in den Blutkreislauf eindringen [142]. Eine immer größer werdende Zahl an Virulenzfaktoren- und Mechanismen sind mit dem Vorgang der Invasion assoziiert. Über den genauen Vorgang der Invasion auf molekularer Ebene ist wenig bekannt. Sie sind daher Ziel intensiver Forschungstätigkeiten.

### **2.6.1 *In vitro* Infektion zur Untersuchung der Virulenz von *Candida albicans***

Innerhalb der letzten Jahre ist es gelungen die virulenten Gene, die für die Invasion und Adhärenz der *Candida albicans* Stämme verantwortlich sind zu identifizieren. Bisher stellen Mäuse die allgemein verwendeten Modelle dar, um die systemischen Infektionen der *Candida* Stämme zu untersuchen. Für die Übertragbarkeit der gewonnenen Daten auf den Menschen sind humane 3D-*in vitro* Modelle, bestehend aus humanen Zellen allerdings von besonderem Interesse. Es wurden bereits humane *in vitro* Epidermismodelle zur Candidose beschrieben [105; 166].

Zwei Transkriptionsfaktoren sind als wichtig für die Virulenz der *Candida* beschrieben worden: EFG1 und CPH1. *Candida* Stämme, denen beide Transkriptionsfaktoren fehlen, zeigen keine systemische Infektion in einem Mausmodell [115] und ebenso in einem immunsupprimierten Piglet Modell [1]. Diesen Stämmen fehlte das EFG1 daher zeigten sie keine Schädigung der epithelialen Zellen [147].

Zur weiteren Charakterisierungen potentieller Transkriptionsfaktoren hinsichtlich ihrer Adhäsions- und Invasionsfähigkeit wurde ein 3-D *in vitro* Infektionsmodell auf der Basis des 3-D Hautmodells entwickelt.

### 3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von funktionellen *in vitro* Testsystemen für Biomedizinische Fragestellungen. Der Einsatz als Ersatzmethode zum Tierversuch im Bereich der Medikamenten- und Kosmetikentwicklung stand im Fokus. Es wurden 4 zentrale Themen untersucht:

- I. ***in vitro* Modell für die Wundheilung.** Hier soll untersucht werden inwiefern ein Er:YAG Laser sich eignet um reproduzierbare Wunden in einem Hautäquivalent zu setzen und ob die Wundheilungskinetik nach Verletzung verfolgt werden kann. Weiterhin soll mit Hilfe von Biopsien humaner Spender untersucht werden, ob sich ein Phänotyp vergleichbar mit normaler Wundheilung einstellt und sich das Modell zur Validierung von Targetgenen in der Wundheilung eignet.
- II. ***in vitro* Modell zur Untersuchung der Invasivität von Melanomen.** Zunächst soll mit diesem Ansatz untersucht werden, ob primäre humane Melanozyten durch ein induzierbares Proto-Onkogen (Xmrk) konditional transformiert werden können und damit eine reversible, d.h. induzierbare Tumorzelllinie erhalten werden kann. Im Folgenden soll ein *in vitro* Tumormodell mit Melanomen im Hautmodell generiert und auf Funktionalität als *in vitro* Testsystem zur Melanomforschung überprüft werden.
- III. ***in vitro* Modell zur Untersuchung der Angiogenese.** Ziel ist hier die Entwicklung und Etablierung eines *in vitro* Angiogenese-Modells basierend auf dem *in vitro* Tumormodell. Durch die implantierten Melanome soll auf die Zugabe der angiogenen Wachstumsfaktoren verzichtet werden können, um somit der natürlichen Angiogenese möglichst nahe zu kommen. Das Modell soll demnach Eigenschaften wie die Neubildung von Gefäßkapillaren und die Expression von vaskulären Zellmarkern durch Melanome - ohne Zusatz angiogener Faktoren - in einem 3-D Modell simulieren.
- IV. ***in vitro* Modell für Infektionsstudien.** Untersucht werden soll die *in vitro* Adhäsion und Invasion unterschiedlicher genetisch definierter *Candida albicans* Mutanten. Es sollen geeignete Bedingungen für die Infektion der *Candida albicans* erarbeitet werden, wobei die Rolle der Morphologie des Modellorganismusses (Hefe bzw. Hyphenform) berücksichtigt werden soll.

## 4 Material und Methoden

Die folgenden Versuche sind in einem Zellkulturlabor der Sicherheitsstufe S2 mit dafür notwendigen zellbiologischen Ausstattung durchgeführt worden. Die Gebrauchskemikalien müssen analytischen Reinheitsgrad aufweisen bzw. Zellkultur geeignet sein. Bei Verwendung spezieller Chemikalien und Geräte, die auf das Versuchsergebnis Einfluss nehmen wird auf Hersteller und Bezugsquellen hingewiesen.

### 4.1 Materialien und Zusätze

In den folgenden Tabellen 2-5 sind die verwendeten Materialien, Substanzen, Medien und deren Zusätze aufgelistet.

*Tabelle 2: Materialien.*

| <b>Substanz</b>               | <b>Hersteller</b> | <b>Lagerung</b> | <b>Verwendung</b>    |
|-------------------------------|-------------------|-----------------|----------------------|
| Agar                          | Merck             | 2-8 °C          | Mikrobiologie        |
| Ampicillin                    | Roth              | 2-8 °C          | Mikrobiologie        |
| Anti-Fibroblast<br>MicroBeads | Milteny Biotec    | 2-8 °C          | MACS                 |
| Anti-hEGFR<br>(Maus)          | Dako              | -4 °C           | Durchflusszytometrie |
| Anti-Human CD 90<br>(Thy-1)   | Dianova           | -4 °C           | MACS                 |
| Bouin´s-Lösung                | Sigma-Aldrich     | RT              | Histologie           |
| Aquatex                       | Merck             | RT              | Histologie           |
| BSA                           | Sigma/Aldrich     | 2-8 °C          | Zellkultur           |
| Calibrate Beads               | Becton Dickinson  | 2-8 °C          | Durchflusszytometrie |
| Chondroitin-4-<br>sulfat      | Fluka             | 2-8 °C          | Zellkultur           |
| Chondroitin-6-<br>sulfat      | Fluka             | 2-8 °C          | Zellkultur           |

|                              |                  |        |                       |
|------------------------------|------------------|--------|-----------------------|
| Clearium                     | Surgipath        | RT     | Histologie            |
| Dispase                      | Invitrogen       | 2-8 °C | Zellkultur            |
| DMEM                         | Invitrogen       | 2-8 °C | Zellkultur            |
| DMSO                         | Merck            | RT     | Zellkultur            |
| ECG-MV-Medium                | Cambrex          | 2-8 °C | Zellkultur            |
| EDTA                         | Sigma/Aldrich    | 2-8 °C | Zellkultur            |
| Eosin                        | Sigma/Aldrich    | RT     | Histologie            |
| Ethanol 70% und 96%          | Merck            | RT     | Histologie/Zellkultur |
| Ethidiumbromid               | Roth             | 2-8 °C | Zellkultur            |
| FACS®-Flow                   | Becton Dickinson | -4 °C  | Durchflusszytometrie  |
| FACS®-Rinse                  | Becton Dickinson | -4 °C  | Durchflusszytometrie  |
| FACS®-Save                   | Becton Dickinson | -4 °C  | Durchflusszytometrie  |
| FCS                          | Invitrogen       | -4 °C  | Zellkultur            |
| Fibronectin                  | Roth             | - 4 °C | Zellkultur            |
| FITC F (ab <sub>2</sub> ' )  | Dako             | - 4 °C | Durchflusszytometrie  |
| Gentamycin                   | Invitrogen       | 2-8 °C | Zellkultur            |
| Geneticin-Lösung             | Invitrogen       | 2-8 °C | Zellkultur            |
| Hämatoxilin                  | Sigma/Aldrich    | RT     | Histologie            |
| Hefeextrakt                  | Difco            | 2-8 °C | Mikrobiologie         |
| HEPES-Lösung                 | Roth             | 2-8 °C | Zellkultur            |
| hEGF                         | Becton Dickinson | - 4 °C | Zellkultur            |
| Kanamycin                    | Sigma/Aldrich    | 2-8 °C | Mikrobiologie         |
| KBM – Medium                 | Cambrex          | 2-8 °C | Zellkultur            |
| MGM – Medium                 | Promocell        | 2-8 °C | Zellkultur            |
| Kollagenase Typ 4            | Sigma/Aldrich    | 2-8 °C | Zellkultur            |
| Mouse-IgG 1 FITC             | Dako             | - 4 °C | MACS                  |
| Mouse-IgG 2b                 | Dako             | - 4 °C | Durchflusszytometrie  |
| Propidiumjodid               | Roth             | - 4 °C | Durchflusszytometrie  |
| IL1- $\alpha$<br>Immunoassay | R&D Systems      | 2-8 °C | Zellkultur            |



|                    |             |        |            |
|--------------------|-------------|--------|------------|
| Trypsin            | Invitrogen  | 2-8 °C | Zellkultur |
| Soy Bean-Inhibitor | Invitrogen  | - 4 °C | Zellkultur |
| rhVEGF             | R&D Systems | - 4 °C | Zellkultur |
| Versene            | Invitrogen  | 2-8 °C | Zellkultur |

Tabelle 3: Lösungen:

| Bezeichnung               | Zusätze  |
|---------------------------|--|
| LB-Medium<br>2-fach       | Trypton Peptone 20 g/L, Yeast Extract 10 g/L, NaCl 10g/L   |
| TAE- Puffer<br>10-fach    | Tris 48,4 g/L, Essigsäure 11,42 ml, EDTA 6,52 g  |
| Blaupuffer                | 0,25 % Bromphenolblau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 30% Glycerol in Wasser   |
| Lösung für HE-<br>Färbung | Hämatoxilin-Lösung: 4g/l<br>Eosin-Lösung: 1% in H <sub>2</sub> O bidest.<br>Differenzierungslösung: HCL 0,25 % in EtOH 50 Vol% |
| 3 M HEPES-<br>Lösung      | 3,574 g HEPES ad 10 ml H <sub>2</sub> O bidest. (pH 7,8), sterilfiltrieren   |

Tabelle 4: Medien.

| Bezeichnung               | Zusätze   |
|---------------------------|---|
| DMEM-Medium<br>ready      | 10% FCS, 1% Gentamycin  |
| Basismedium:<br>KBM ready | KBM + Supplemente: 0,5 ml GA-1000, 0,5 ml Hydrocortiosone, 0,5 ml Insulin, 2,0 ml BPE, 0,5 ml hEGF, 0,5 ml Insulin                                  |
| Airlift-Medium            | Basismedium KBM + Supplemente: 0,5 ml GA-1000, 0,5 ml Hydrocortiosone, 0,5 ml Insulin, und 1,88 mM CaCl <sub>2</sub>                                |
| MGM ready                 | 0,4 % BPE, 1ng/ml bFGF, 5 µg/ ml Insulin, 0,5 µg/ ml Hydrocortison, 10 ng/ml Phorbol-Myristate-Acetate, 50 ng/ml Amphotericin B, 50µg/ml Gentamycin |
| ECG-MV-<br>Medium         | 4 % ECGS/H, 5 % FCS, 10 ng/mL EGF, 50 µg/ml Gentamycin, 50ng/mL Amphotericin-B, 1 µg/ml Hydrocortison   |

Tabelle 5: Spezielle Lösungen mit Zusätzen.

| Bezeichnung                  | Zusätze  |
|------------------------------|--|
| Gelgießlösung                | 232,5 ml 2-fach konzentriertes DMEM, 7,5 ml 3 M HEPES-Lösung, je 1,25 ml 5mg/ml Chondroitin-4-6-sulfat Lösung (in PBS+ gelöst), sterilfiltrieren. Anschließend 7,5 ml steriles FCS zusetzen. |
| Kollagen-Lösung              | Kollagen (5,5-6,0 mg/ml) in 0,1 % Essigsäure   |
| Beschichtungs-Kollagenlösung | Kollagen (1 mg/ml) in 0,1 % Essigsäure   |
| Kollagenase                  | 500 Units/ml   |
| Fibronectin                  | Lyophilisat 50 µg/ml in H <sub>2</sub> O bidest.   |
| Dispase                      | 2 Units/ml   |
| Trypsin/EDTA                 | 0,25%Trypsin/0,01%EDTA in isotoner Salzlösung  |
| rhVEGF                       | Zusatz zum ECG-Medium: 10 ng/ml  |
| PBS <sup>+</sup>             | 0,5 g MgCl <sub>2</sub> und 0,5 g CaCl <sub>2</sub> in 0,5 l H <sub>2</sub> O bidest lösen, nach vollständigem Lösen PBS <sup>-</sup> zufügen, pH 7,2  |
| PBS <sup>-</sup>             | 40 g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 5,75g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, pH 7,2   |

#### 4.1.1 Lebendkulturen

Tabelle 6 zeigt die eingesetzten Melanomzelllinien, den für die Transfektion verwendeten Bakterienstamm und den Pilz für die Infektionsversuche. Die Identifizierung erfolgte bei allen Zelllinien morphologisch.

Tabelle 6: Zelllinien.

| Zelllinie | Herkunft der Zelllinien              |
|-----------|--------------------------------------|
| SK-Mel-28 | Humanes malignes Melanom             |
| BLM       | Melanomzellen, BRO Teillinie (Lunge) |
| M 13      | Humanes malignes Melanom             |

|  |  |
|--|--|
| HEK 293                                    | humane embryonale Nierenzelle transsformiert durch Adenovirus Typ 5. Diese Zelllinie dient als Kontrolle der stabilen Transformation |
| Mel Juso                                   | Humanes malignes Melanom   |
| <b>Bakterium</b>                           | <b>Referenz</b>  |
| DH5 $\alpha$                               | Hanahan [83]   |
| <b>Pilz</b>                                | <b>Referenz</b>  |
| <i>Candida albicans</i><br>Stamm (Wildtyp) | SC5314; [62]   |

## 4.2 Vektoren

Für die Analysen werden die folgenden Vektoren verwendet:

### pEGFP-N1

Zur Etablierung einer geeigneten Transfektionsmethode wurde der Plasmidvektor pEGFP-N1 (Abbildung 7) (Clontech, Heidelberg) verwendet.

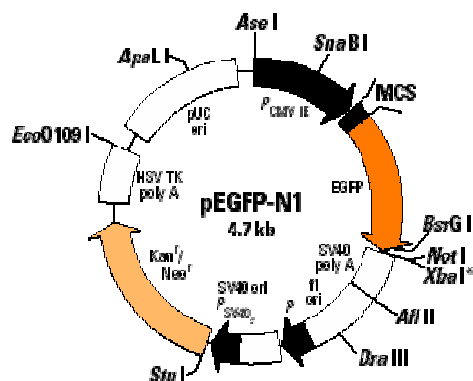


Abb.7: Plasmidkarte des Vektors pEGFP-N1 und dessen Multiple Cloning Site (MCS).

### pRK5-HER-mrk/ pSP64-erbB/ pRK5-Xmrk-ATP

Die Vektoren pRK5-HER-mrk/ pSP64-erbB/ pRK5-Xmrk-ATP (Abbildung 8) wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Scharl (Physiologische Chemie I, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Von pSP64-erbB konnte keine Plasmidkarte mittels des Programms „Clone Manager“ erstellt werden, da die komplette Sequenz nicht vorlag.

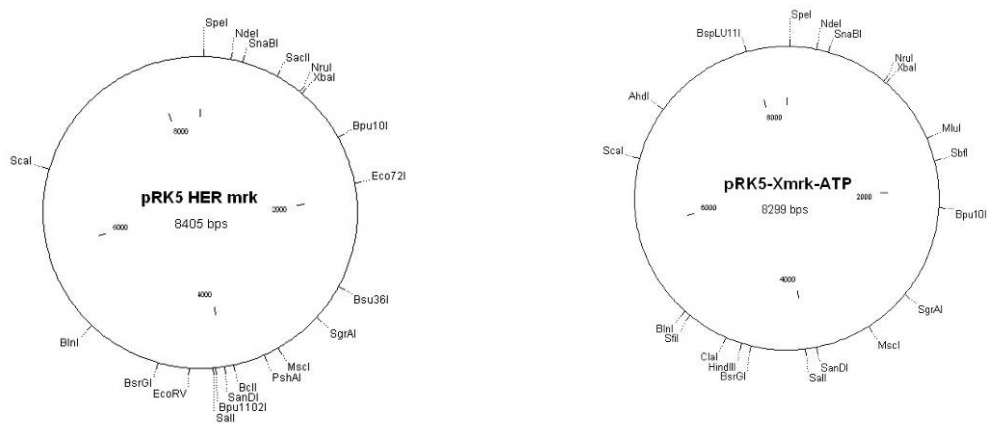


Abb.8: Plasmidkarten der Vektoren pRK5-HER-mrk und pRK5-Xmrk-ATP.

#### 4.2.1 Transfektionsreagentien/Transfektionsgerät

Die Transfektion wird mittels 2 Methoden durchgeführt.

##### Lipofektion

Reagenzien:

- Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe),
- FuGene6 (Roche, Mannheim)
- Metafectene (Biontix, München)

##### Nukleofektion

Die Nukleofektion wurde mit dem Nucleofector™ der Firma Amaxa (Köln) durchgeführt. Das Verfahren basiert auf der Elektroporation. Es werden elektrische Impulse in speziellen Reagenzien auf die Zellen gegeben. Reagenzien und Impulse sind vom Hersteller (Fa. Amaxa, Köln, Deutschland) auf den jeweiligen Zelltyp optimiert worden. Das Verfahren bewirkt, dass die DNA direkt in den Zellkern gelangt. Da bei einem DNA-Transfer in den Zellkern (Nukleofektion) die Wirkung des transfizierten Materials nicht abhängig von der Zellteilung ist, sind auch langsam teilende Zellen, wie die Melanozyten dem Gentransfer zugänglich. Die zellspezifischen elektrischen Parameter sind im Nucleofektor gespeichert und durch kodierte Programmbezeichnungen auswählbar. Zum Einsatz kamen die Programme U-16 und U-20. Des Weiteren sind für jeden Zelltyp spezielle Reagenzien erhältlich. Der zugehörige Kit für Melanozyten enthielt 2,25 ml NHEM-Neo Nucleofector™-solution, 0,5 ml Supplement, 25 zertifizierten Küvetten und 25 Plastikpipetten.

### 4.3 Geräte

|                                    |                   |
|------------------------------------|-------------------|
| Begasungsbrutschrank (BBD 6220)    | Kendro            |
| FACS VANTAGE SE                    | Becton Dickinson  |
| Durchflusszytometer (FACS Calibur) | Becton Dickinson  |
| Einbettautomat Citadell            | Shandon           |
| Geldokumentationsgerät             | Fröbel            |
| Heißluftsterilisator ST 5050       | Heraeus           |
| Mikrotiterplattenreader Spectra    | CLF Laborgeräte   |
| Wärmeschrank                       | Kendro            |
| Megafuge 1,0 R                     | Kendro Laboratory |
| Inverses Mikroskop TMS             | Nikon             |
| Mikroskop Diaphot                  | Nikon             |
| Mikroskop Axiovert 200M            | Zeiss             |
| Partikelzählgerät CASY® 1 TTC      | Schärfe System    |
| Rotationsmikrotom RM 2145          | Leica             |
| Zentrifuge 5810                    | Eppendorf         |

### 4.4 Antikörper

Im Folgenden (Tabellen 7-8) werden die verwendeten Antikörper tabellarisch aufgelistet.

*Tabelle 7: Antikörper für die Immunhistochemie.*

| Antikörper | Klon    | Herkunft     | Spezifität                         | Firma | Verdünnung |
|------------|---------|--------------|------------------------------------|-------|------------|
| IgG1       | DAK-GO1 | monokl. Maus | Isotypkontrolle                    | Dako  | -          |
| IgG2       | DAK-GO5 | monokl. Maus | Isotypkontrolle für PCNA           | Dako  | -          |
| anti-hEGFR | E30     | monokl. Maus | Rezeptor                           | Dako  | 1:50       |
| vWF        | F8/86   | monokl. Maus | Endothel cytoplasmatisches Protein | Dako  | 1:100      |

|                            |         |              |   |          |                 |
|----------------------------|---------|--------------|---|----------|-----------------|
| CD31                       | JC 70 A | monokl. Maus | Endothel<br>Oberflächenprotein                  | Dako     | 1:100           |
| CD105                      | SN6h    | monokl. Maus | Endothel<br>Proliferationsmarker                | Dako     | 1:100           |
| PCNA                       | PC 10   | monokl. Maus | Melanomzellen<br>Proliferationsmarker           | Biocarta | 1:50            |
| Anti-<br>Human<br>Melan A  | A103    | monokl. Maus | Melanomspezifisches<br>Transmembran-<br>protein | DAKO     | 1:100           |
| Anti-<br>Zytokeratin<br>10 | DEK-10  | monokl. Maus | Früher<br>Differenzierungs-<br>marker           | BioGenex | 1:200-<br>1:500 |
| Anti-<br>Zytokeratin<br>16 | LL 025  | monokl. Maus | Hyperproliferations-<br>marker                  | BioCarta | 1:200-<br>1:400 |

Tabelle 8: Antikörper für die Durchflusszytometrie.

| Antikörper                   | Klon       | Herkunft                                | Spezifität                          | Ansatz                            | Firma      |
|------------------------------|------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|------------|
| FITC<br>IgG1κ                | MOPC<br>21 | monokl. Maus                            | Isotypkontrolle                     | für 1 Mio<br>Zellen<br>20 µL AK   | Pharmingen |
| FITC<br>F(ab <sub>2</sub> ') | -          | Kaninchen<br>anti Maus<br>Immunglobulin | Sekundärantikörper                  | für 1 Mio<br>Zellen<br>5-10 µL AK | Dako       |
| FITC CD<br>90                | AS02       | monokl. Maus                            | Fibroblasten<br>spezifischer Marker | für 1 Mio<br>Zellen<br>5-10 µL AK | Dianova    |
| Mouse-IgG<br>2b              | -          | monokl. Maus                            | Isotypkontrolle                     | für 1 Mio<br>Zellen<br>5-10 µL AK | Dako       |
| PE IgG1κ                     | MOPC<br>21 | monokl. Maus                            | Isotypkontrolle                     | für 1 Mio<br>Zellen<br>20 µL AK   | Pharmingen |

|               |       |              |                                       |                                      |            |
|---------------|-------|--------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------|
| PE CD31       | WM-59 | monokl. Maus | Endothel<br>Oberflächen-<br>protein   | für 1 Mio<br>Zellen<br>20 $\mu$ L AK | Pharmingen |
| FITC<br>CD105 | SN6   | monokl. Maus | Endothel<br>Proliferations-<br>marker | für 1 Mio<br>Zellen<br>40 $\mu$ L AK | Biozol     |

#### 4.4.1 Prinzip der Immunomagnetischen Separierungsmethode (MACS)

Ausgehend von magnetischen Partikeln definierter Größe ist ein Verfahren entwickelt worden, das erlaubt, Zellen mit Hilfe von Partikel an- oder abzureichern. Diese Partikel, „Magnetobeads“ oder „Dynobeads“ genannt, haben einen superparamagnetischen Kern und sind umhüllt von einer Polystyrolbeschichtung. Superparamagnetisch ist die Fähigkeit, in einem starken Magnetfeld magnetische Eigenschaften zu erwerben, die nach Entfernen des Magnetfeld wieder verschwinden. Dadurch können die Partikel nicht verklumpen. Die Polystyrolbeschichtung ist in den hier aufgeführten Fällen mit spezifischen Antikörpern versehen, so dass die Magnetobeads an Oberflächenmarker-positive Zellen binden, dadurch wird eine Auftrennung in Marker-positive und Marker-negative Zellen möglich. Im Folgenden wird die MACS Sortierung schematisch dargestellt.

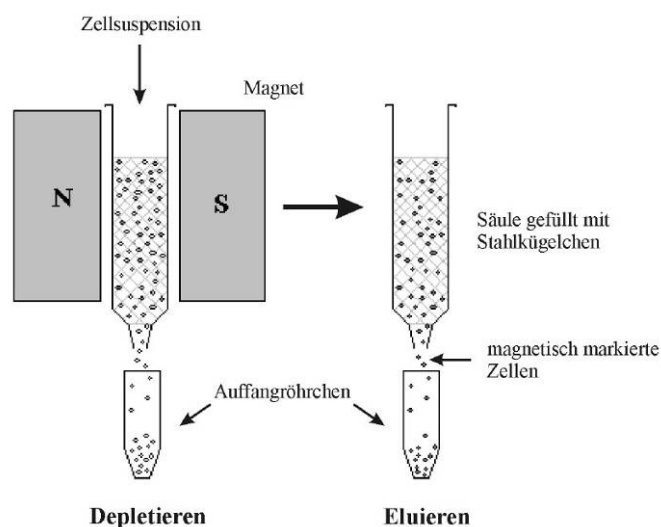


Abb.9: MACS-System [132].

Die MACS – Methode kann zur Anreicherung (Positivsortierung) oder zum Ausschluss (Negativsortierung) einer Zellpopulation aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Die Separationsstrategie ist bei der Selektion von Melanozyten eine Negativselektion, d.h. es adhären alle Zellen an der Säule, die nicht den gewünschten Phänotyp besitzen. Die restlichen, ungefärbten Zellen werden in der Negativfraktion aufgefangen. Die Endothelzellen werden mit einer Positiv-Anreicherungsstrategie isoliert, d.h. die gewünschten Zellen befinden sich nach dem Säulenlauf in der Säule und müssen als Positivfraktion mit 5 ml MACS-Puffer unter Druck eluiert werden. Vorgehen wie in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Probenvorbereitung für die MACS-Sortierung.

|                        | <b>Postivsortierung</b> | <b>Negativssortierung</b>                |
|------------------------|-------------------------|--|
| Verwendeter Antikörper | CD 105 (Endothelzellen) | Anti-Fibroblasten<br>MicroBeads          |
| Inkubationszeit        | 6°C-12°C; 15 min        | 30 min bei RT                            |
| Eingesetzte Zellzahl   | 10 <sup>8</sup> Zellen  | 10 <sup>6</sup> - 10 <sup>7</sup> Zellen |

#### 4.4.1.1 Probenvorbereitung

Folgende Schritte sind für die MACS – Vorbereitung nötig:

- Passagieren der Zellen (4.6.9)
- Aufnahme der Zellen in 80 µl PBS<sup>-</sup>/BSA-Lösungen
- Inkubation mit 20 µl Antikörper (Tab 9)
- Waschen mit 2 ml PBS<sup>-</sup>/ EDTA und Zentrifugation mit 1000 rpm, 5 min
- Pellet in 500 µl PBS<sup>-</sup>/ EDTA aufnehmen
- Äquibrierung der MACS-Säule mit PBS<sup>-</sup>/ EDTA
- Aufgabe der Zellsuspension auf MACS-Säule
- Waschen der Säule mit 10 ml PBS<sup>-</sup>/EDTA-Lösungen
- Entfernen des Magneten
- Zellen mit PBS<sup>-</sup>/ EDTA-Lösungen mit Hilfe eines Stempels von der Säule entfernen
- Bestimmung der Zellzahl beider Fraktionen
- Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen



Zur Überprüfung der Methode wurde die Abreicherungs-effizienz durchflusszytometrisch bestimmt (4.5).

## **4.5 Durchflusszytometrie**

Das Durchflusszytometer diente bei den Versuchen zur Analyse der:

- Effizienz der MACS-Methode
- Effizienz der transfizierten Zellen
- Zellzyklusanalyse

### **4.5.1 Zellzyklusanalyse**

Während der Proliferation durchlaufen alle Zellen den Zellzyklus. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, quantitative Mengen bezüglich des DNA-Gehaltes der proliferierenden Zellen zu bestimmen und dabei indirekt auf die Zahl der Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus zu schließen. Die Zellen werden durch die beschriebenen Vorbehandlungsmethoden (4.5.2.1 – 4.5.2.3) für Propidiumjodid durchlässig gemacht. Das Propidiumjodid ist stark basisch und kann gut in den saueren Zellkern eindringen. Der Farbstoff lagert sich in die helikale Struktur der DNA ein (Interkalation). Durch den Laserstrahl des Zytometers wird der Farbstoff angeregt und zur Fluoreszenz gebracht. Bei der durchflusszytometrischen Bestimmung des Zellzyklus wird zusätzlich zu SSC/FSC Pulse Area (Signalfläche) gegen Pulse Width (Signalweite) aufgetragen. Somit können zusammenhängende Zellen (Dubletten), die einen erhöhten Anteil von Zellen in der S-Phase vortäuschen können, durch gezielte Auswahl dieser Zellen ausgeschlossen werden. Weiterhin wird in einem Histogramm die Zellzahl über FL-2 (Propidiumjodid) aufgetragen.

#### **4.5.1.1 Modifizierte Methode nach Lindl**

Zuerst wird eine Citratlösung mit Detergenz hergestellt: 0,5 ml Triton X-100 und 2,1 g Zitronensäuremonohydrat werden auf 100 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die zu untersuchenden Zellen werden in einer Konzentration von  $10^5$ – $10^6$  eingesetzt, passagiert und in 250  $\mu$ l Citratlösung resuspendiert. Dann wird 500  $\mu$ l Ethanol (70%) langsam zugetropft und ca. 1 min inkubiert. Die Zellen anschließend abzentrifugiert (5 min bei 2000 rpm), in 250  $\mu$ l Citratlösung resuspendiert und 12,5  $\mu$ l

Propidiumlösung mit einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Nach ca. 10 min Inkubation können die Proben durchflusszytometrisch bestimmt werden.

#### **4.5.1.2 Methanol-Fixierung**

Eine Konzentration von  $10^5$ – $10^6$  Zellen werden passagiert und in 75 µl PBS<sup>-</sup> resuspendiert. Anschließend werden die Zellen in 175 µl 100% Methanol (-20°C) aufgenommen. Die Endkonzentration der Zellen in 70% Methanol beträgt  $1 \times 10^6$  Zellen/ml. Anschließend wird 1 Stunde bei 4°C inkubiert, eiskaltes PBS<sup>-</sup> zugegeben und zentrifugiert. Das Pellet aufgeschüttelt, in PBS<sup>-</sup> resuspendiert und 12,5 µl Propidiumjodid in einer Konzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Danach erfolgt die Zugabe von RNase mit einer Endkonzentration 50 µg/ml. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln können die Proben durchflusszytometrisch gemessen werden.

#### **4.5.1.3 DNA Färbung in Zell-Lysepuffer**

Zuerst wird der Zell-Lysepuffer hergestellt: 0,5 ml Triton X-100 mit 0,2 % BSA werden mit PBS<sup>+</sup> auf 100 ml aufgefüllt. Die Zellen ( $10^5$  –  $10^6$ ) anschließend passagiert und in 250 µl Zell-Lysepuffer resuspendiert. Danach wird 12,5 µl Propidiumjodid zugegeben (Stammlösung 1 mg/ml, Endkonzentration 50 µg/ml). Nach 15 min Inkubation im Dunkeln bei RT kann durchflusszytometrisch gemessen werden.

## **4.6 Zellbiologische Methoden**

*Lindl 1994 und Freshney 2000*

### **4.6.1 Zellzählung**

Das Messprinzip mit dem CASY-Partikelzählgerät beruht auf einer Widerstandsänderung an der Messkapillare, sobald die Zellen (als „Isolator“) in die Messpore eintreten. Eine Zellsuspension wird mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare mit definierter Geometrie angesaugt. An die Kapillarstrecke ist über 2 Platinelektroden eine Spannung angelegt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Intakte Zellen werden in erster Näherung

als Isolator betrachtet. Es kommt zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke, die ein Maß für das Volumen der Zellen ist. Die Anzahl der Widerstandserhöhungen pro Messung entspricht der Anzahl der Zellen (Schärfe System, Reutlingen, Germany). Gemessen wurden jeweils  $3 \times 400 \mu\text{l}$  der Zellsuspension. Die Zellzahl ergab sich aus dem Mittelwert, wobei die entsprechende Verdünnungen zu berücksichtigen waren. Ebenso erfolgte die Mittelwertsangabe des Zelldurchmessers bzw. -volumens.

#### **4.6.2 Vitalitätsbestimmung**

Der Test dient der Unterscheidung von lebenden und toten Zellen. Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau auf. Aufgrund funktionierender Transportsysteme wird der Farbstoff von lebenden Zellen sofort wieder ausgeschleust. Damit bleiben vitale Zellen ungefärbt. Tote Zellen transportieren den Farbstoff nicht nach außen und erscheinen daher blau gefärbt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann. Die Farbstoffaufnahme ist stark pH-abhängig mit einem Maximum bei 7,5. Deshalb sollte in diesem pH-Bereich gearbeitet werden [114].

Die entnommenen  $100 \mu\text{l}$  der Zellsuspension werden im Verhältnis 1:1 mit Trypanblaulösung gemischt. Unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer können die nicht angefärbten, lebenden Zellen und die blau angefärbten, toten Zellen getrennt voneinander ausgezählt werden. Die Summe aus beiden Zählungen entspricht der Gesamtanzahl der zu untersuchenden Zellen.

Die Berechnung der Vitalität bezog sich auf nachstehende Formel:

Gleichung 1:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

#### **4.6.3 Kryokonservierung**

Zuerst wird die Zellzahl bestimmt, die Zellen abzentrifugiert und in Einfriermedium aufgenommen, so dass die Endkonzentration an Zellen  $1 \times 10^6/\text{ml}$  bis  $2 \times 10^6/\text{ml}$  beträgt. Die Kryoröhrchen mit je  $100 \mu\text{l}$  Zellsuspension,  $900 \mu\text{l}$  serumhaltigem Kultivierungsmedium und  $100 \mu\text{l}$  DMSO-Zusatz werden in  $1,5 \text{ ml}$  Kryoröhrchen

aliquotiert. Nach Zugabe von DMSO kommen die Röhrrchen sofort in einen Kryostaten, der die Zellen auf  $-12^{\circ}\text{C}$  abkühlt. Nach 10 min wird die schlagartige Kristallisation der Zellsuspension durch Klopfen der Röhrrchen ausgelöst. Nach weiteren 10 min im Kryostaten erfolgt die Überführung in ein Dewar-Gefäß ( $\text{N}_2$ -Gasphase) für 2 h und abschließend die Einlagerung in einen Kryotank mit Flüssigstickstoff.

#### **4.6.4 Auftauen von Zellen**

Zellen aus dem Kryotank sind bis sich die Zellsuspension verflüssigt im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Danach erfolgte die rasche Überführung in ein Zellkulturgefäß mit 10 ml vorgelegtem Kultivierungsmedium. Nach Zentrifugation für 3 min bei 1000 rpm wird der Überstand verworfen und das Pellet in entsprechender Menge frischen Mediums resuspendiert. Zur Bestimmung der Überlebensrate mittels Trypanblaufärbung werden 100  $\mu\text{l}$  entnommen und abschließend die Suspension in Zellkulturflaschen definiert ausgesät.

#### **4.6.5 Zellseparationsmethoden**

Zur Entfernung von Stromazellen aus Endothelzell- und Melanozytenkulturen, kamen unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Die Trennungen beruhen auf zwei unterschiedlichen Eigenschaften, zum einen der unterschiedlichen Adhärenzeigenschaft der Zellen und zum anderen auf dem Vorhandensein spezifischer Zelloberflächenmarker. Anschließend wurde die Reinheit durchflußzytometrisch analysiert. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Separationsverfahren kurz zusammengefasst.

##### **Endothelzellen**

- Separation mit unterschiedlichen Einwirkzeiten von  $\text{PBS}^-/\text{EDTA}$
- Immunomagnetische Separierungsmethode (MACS)

##### **Melanozyten**

- Zugabe von 25  $\mu\text{g/ml}$  Geneticin zum MGM-Medium
- Verkürzung der Einwirkzeit des Trypsins ( $< 1$  min)
- Immunomagnetische Separierungsmethode (MACS)

#### **4.6.6 Beschichtung von 24 Well-Inserts**

Die Inserts der 24-Well-Gewebekulturplatte wurden mit einer Kollagenlösung von 50 µg/ml in 0,1 % Essigsäure beschichtet, nach mehrmaligem Schwenken abgesaugt und ÜN bei 37 °C getrocknet. Das Beschichtungsmedium wird entfernt und die Endothelzellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  Zellen/ml ausgesät.

#### **4.6.7 Allgemeine Arbeitsmethoden der Zellkultur**

Alle Arbeiten zur Zellkultur sind unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Flow Box ausgeführt. Glaspipetten, Präparierbesteck und Einwegartikel waren sterilisiert, bzw. autoklaviert. FCS wurde 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert, aliquotiert und bei – 20°C gelagert. Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch, soweit nicht anders beschrieben, im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die Zellkultivierung erfolgte in Kulturflaschen aus speziell behandeltem Polystyrol, in Chamber-slides (8-Kammer Kultivierungssystem), sowie in Gewebekulturplatten mit 6- bzw. 24-Wells. Regelmäßige phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen sind am Invert-Mikroskop mit 50- und 100-facher Vergrößerung erfolgt, die Photodokumentation entstand am AxioVision Meta 200 (Zeiss) mit angeschlossener Bildverarbeitungssoftware (Axiovision).

#### **4.6.8 Humane Zellen**

Die Anlage von Primärkulturen aus humanem Material (Präputien) wurde uns freundlicherweise von der Kinderchirurgie des Olgakrankenhauses in Stuttgart und des Klinikums in Ludwigsburg zur Verfügung gestellt. Das Material stammte von Spendern im Alter von 6 Monaten bis 12 Jahren. Die isolierten Zellen sind mit dem Alter des Spenders und dem Datum der Isolation bezeichnet. In folgender Abbildung 10 wird eine Übersicht über die isolierten Zellen gegeben.

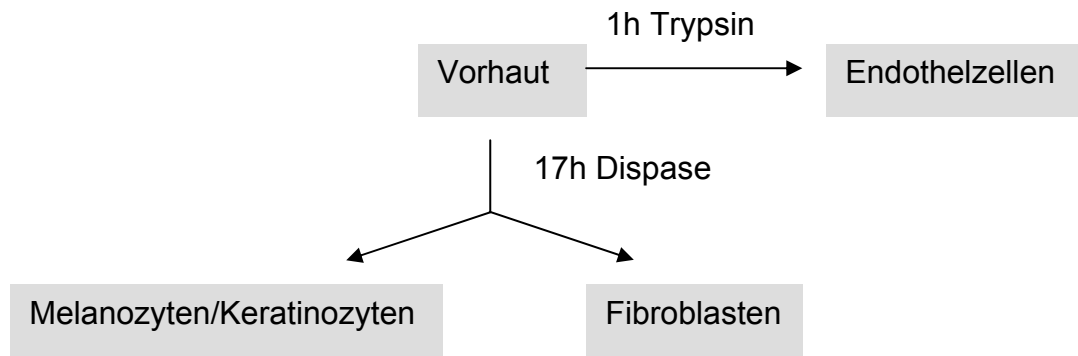


Abb. 10: Isolierung von humanen epidermalen und dermalen Zellen aus Vorhäuten.

#### 4.6.8.1 Epidermale Zellen

Die Isolierung und Anzucht der epidermalen Zellen folgte folgendem Schema:

- Mehrfaches Waschen des Materials in sterilem PBS<sup>-</sup>
- Zerkleinern des Materials in ca. 2 mm<sup>2</sup> große Stücke und Einlegen in 2 U/ml Dispase für 17 h bei 4°C
- Abziehen der Epidermis mit Hilfe von sterilen Pinzetten, zerkleinern mit einem Skalpell und Einbringen der Gewebestückchen in 0,25 % Trypsin/ EDTA-Lösung für 20 min
- Suspendieren der Gewebestücke und Inaktivieren der Enzymlösung mit 1 ml FCS
- Zentrifugieren bei 1000 rpm für 3 min und absaugen der Trypsinlösung.
- Aufnehmen des Pellets in KBM ready-Medium für Keratinozyten und in Melanocyte-Growth-Medium (MGM) für Melanozyten. Danach erfolgte die Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen
- Medienwechsel nach 4 Stunden, um nicht adhärente, tote Zellen abzuspülen.
- Zellen in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultivieren

Die Identifizierung der Zellen wurde morphologisch durchgeführt.

#### Melanozyten

Zur Charakterisierung der Melanozyten kam die Antikörperfärbung mit MART-1 zum Einsatz. Für Untersuchungen wurden Melanozyten in den Passagen 2-8 eingesetzt. Zur Beseitigung auftretender Kontaminationen der Kulturen mit Bindegewebszellen sind verschiedene Separationsmethoden ausgetestet worden.

#### 4.6.8.2 Fibroblasten

Die Isolation der Fibroblasten folgte folgendem Schema:

- Nach mechanischem Abtragen der Epidermis wird die Dermis mit dem Skalpell zerkleinert und für 30 bis 45 min in 500 U/ml Kollagenase Typ 4 bei 37°C inkubiert
- Abzentrifugieren bei 1000 rpm für 5 min und vorsichtiges Absaugen des Überstandes
- Aufnehmen des Pellets in DMEM + 10% FCS, resuspendieren und erneut zentrifugieren
- Absaugen des Überstandes und Aufnahme des Pellets in 2 ml DMEM + 10 % FCS
- Überführen in eine unbeschichtete 75/182 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche
- Nach 1 bis 2 Tagen vorsichtig 10/15 ml DMEM+ 10 % FCS zugefügen
- Alle 3 Tage ein Medienwechsel durchführen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

#### 4.6.8.3 Endothelzellen

Die humanen Endothelzellen wurden als gepoolte Zellkultur aus Biopsien von mindestens 3 verschiedenen Spendern eingesetzt. Zur Präparation mikrovaskulärer Endothelzellen ist das Material in 2 mm<sup>2</sup> große Stücke zerkleinert und zur Gewebedissoziation 1 Stunde in 0,25 % Trypsin/ EDTA-Lösung bei 37 °C inkubieren. Danach wird wie folgt weiter verfahren:

- 3 Mal waschen der Zellstücke mit PBS/EDTA-Lösung
- Die Gewebestücke mit der Dermisoberfläche nach oben in eine mit 37°C warmen ECG-Medium gefüllte Petrischale überführen
- Ausstreichen der mikrovaskulären Endothelzellen unter leichtem Druck mit dem Skalpellmesser
- Zellsuspension anschließend über ein steriles 100 µm Metallgitter filtrieren
- das Filtrat für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugieren
- Resuspendierung des Zellpellets mit 10 ml ECG-Medium
- Aussaat der Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche
- Nach 4 Stunden Kultivierung erfolgt ein Medienwechsel, um die Kontamination von Fibroblasten zu reduzieren
- Medienwechsel erfolgt alle 2 Tage

Die Charakterisierung der Endothelzellen erfolgte mit Immunhistochemischen Methoden. Zum Einsatz kam der Proliferationsmarker CD 105, der von Willebrand Faktor (vWF) und das Oberflächenprotein CD 31. Die humanen Endothelzellen wurden für Versuche in der Passage 2 eingesetzt.

#### **4.6.9 Subkultivierung**

Die Subkultivierung der Zellen erfolgte je nach verwendetem Zelltyp. Epithelzellen, Endothelzellen und Melanozyten werden bei 70-80%iger Konfluenz subkultiviert, die anderen Zelltypen bei konfluentem Monolayer. Ausnahmen von dieser Regel betrafen Kultivierungen zur Beobachtungen der Bildung kapillarähnlicher Strukturen von Endothelzellen.

Das Zellkulturmedium wird gegen 0,05%iges EDTA ausgetauscht (1/5 des Mediumvolumens) und die adhärennten Zellen damit zum Komplexbilden vor allem von  $\text{Ca}^{2+}$  und zum Lösen desmosomaler Zellkontakte, inkubiert.

Die Bestimmung der entsprechenden Zellzahlen erfolgte in einem elektronischen Zählgerät (CASY-1). Die Zellzählungen erfolgten in einer 1:100 (CASYTON-Lösung) Verdünnung.

##### **4.6.9.1 Keratinozyten und Melanozyten**

Die Subkultivierung folgte folgendem Schema:

- 2 Mal mit PBS<sup>-</sup>/EDTA waschen und jeweils 10 Min bei 37 °C inkubieren Bei der Subkultivierung von Melanozyten wird die Einwirkzeit der PBS/EDTA-Reaktion auf einmalig 2 min verkürzt.
- Zugabe von 3 ml 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation von 3 min bei 37°C
- Der enzymatische Ablösevorgang wird unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Durch vorsichtiges Klopfen am Flaschenboden wird der Ablösungsvorgang beschleunigt
- Trypsin-EDTA-Reaktion mit 1 ml FCS abstoppen bzw. mit 5 ml Soy Bean-Inhibitor (bei Melanozyten)
- Zellsuspension dann für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugieren
- Zellpellet in 2 ml KGM-Medium für Keratinozyten und 2 ml MBM-Medium für Melanozyten aufnehmen



- Zellzählung im Casy-Partikelzählgerät und die Zellen in einer Verdünnung von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>, in Zellkulturflaschen aussäen

#### **4.6.9.2 Fibroblasten**

Zum Aufbau der Hautäquivalente und zur Bestimmung der Transformationseffizienz transformierter Zellen (4.5.2) wird diese Zellart bis zur 5. Passage mehrfach subkultiviert. Die Subkultivierung folgte dem Schema:

- 1 Mal mit PBS<sup>-</sup>/EDTA waschen
- Zugabe von 3 ml 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation von 3 min bei 37°C
- Der enzymatische Ablösevorgang wird unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Durch vorsichtiges Klopfen am Flaschenboden wird der Ablösungsvorgang beschleunigt
- Abstoppen des enzymatischen Prozesses mit DMEM + 10% FCS Medium
- Die Zellsuspension für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugieren
- Überstand absaugen und das Zellpellet in DMEM + 10% FCS Medium aufnehmen und resuspendieren
- Im Casy-Partikelzählgerät die Zellzahl bestimmen und in Zellkulturflaschen in einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml aussäen

#### **4.6.9.3 Endothelzellen**

Die Subkultivierung folgte folgender Vorgehensweise:

- Zellen mit PBS<sup>-</sup>/EDTA spülen danach für 10 min bei 37 °C inkubieren.
- Zugabe von 3 ml 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation von 3 min bei 37°C
- Anschließend die enzymatische Reaktion mit ECG-Medium abstoppen
- Die Zellsuspension bei 1000 rpm für 5 min zentrifugieren
- Das Zellpellet in neuem ECG-Medium aufnehmen
- Die Zellzahl bestimmen und  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Zellkulturflaschen aussäen

#### **4.6.9.4 Testen unterschiedlicher Medienzusätze für Endothelzellen**

Zur Integration der Endothelzellen in das Hautmodell werden verschiedene Medien und Zusätze auf ihre proliferationsfördernde Eigenschaften ausgetestet. Zur Ermittlung des Wachstumsverhaltens wurde die Zunahme der Zellzahlen pro ml ermittelt. Folgende Medien sind untersucht worden:

- Basismedium: ECG - MV – Medium
- Basismedium + VEGF-Zusatz
- Airlift – Medium mit und ohne VEGF-Zusatz
- Basismedium: KBM – Medium

Die Endothelzellen wurden in der 2. Passage in 24-Well-Gewebekulturplatten in einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  Zellen ausgesät.

Täglich werden die Zellen geerntet (4.6.9.3) und gezählt (4.6.1). Dies wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen durchgeführt. Zur Ermittlung der Zellzahlen mit Standardabweichungen erfolgten Dreifachbestimmungen. Die Generationszahl (N) gibt an, wieviele Teilungen die Zelle durchlaufen hat und wird folgendermaßen ermittelt:

Gleichung 1:

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

|                  |   |
|------------------|---|
| N:               | Zellzahl nach n Teilungen (Anzahl der Zellen bei der Ernte) |
| n:               | Anzahl der Teilungen  |
| N <sub>0</sub> : | Ausgangszellzahl (Anzahl der Zellen bei der Aussaat)        |

**Gleichung 2: Standardabweichung (Varianz):**

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

#### 4.6.9.5 Wachstumsverhalten der Endothelzellen

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden Endothelzellen in der 2. Passage eingesetzt. Untersucht wurde das Wachstumsverhalten auf Kollagenbeschichteten bzw. unbeschichteten 25 cm<sup>2</sup> Kulturgefäßen (4.6.6). Als Kultivierungsmedium diente ECG-Medium mit bzw. ohne VEGF-Zusatz in einer Konzentration von  $c = 10$  ng/ml. Alle 2 Tage erfolgte ein Medienwechsel. Nach 2, 7, 30 und 60 Tagen wurden die Zellen morphologisch untersucht. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.

Tabelle 10: Unterschiedliche Kultivierungsbedingungen der Endothelzellen.

| Bedingung | Medium     | Zeitraum [d] | Beschichtung |
|-----------|------------|--------------|--------------|
| 1         | ECG        | 2, 7, 30, 60 | -            |
| 2         | ECG + VEGF | 2, 7, 30, 60 | -            |
| 3         | ECG        | 2, 7, 30, 60 | Kollagen     |
| 4         | ECG + VEGF | 2, 7, 30, 60 | Kollagen     |

#### 4.6.9.6 Melanomzelllinien

Die Subkultivierung der Melanomzelllinien erfolgte nach dem Schema wie unter 4.6.9.2 beschrieben. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Zellkulturflaschen ausgesät.

#### 4.6.10 Transfektion

Für die Transfektionen kamen nur Melanozyten aus Reinkulturen und aufgrund der benötigten Zellzahlen erst ab der 2. Passage zum Einsatz. Weiterhin ist darauf geachtet worden, dass sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Zellen ab der 9-ten Passage konnten nicht mehr zur Transfektion eingesetzt werden. Es kamen Konzentrationen von 2 µg und 4 µg Plasmid-DNA pEGFP-N1 zum Einsatz. Bei herkömmlichen Plasmidpräparationen sind in der präparierten DNA meist Endotoxin (Lipopolysaccharide) enthalten, die aus der Zellwand von gramnegativen Bakterien (*E. coli*) stammen. Diese Endotoxine wirken sich negativ auf die Transfektionseffizienz aus, daher wurden die Transfektionen mit und ohne endotoxinfreie Plasmid-DNA durchgeführt.

#### Liposomale Transfektion

- Am Vortag der Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  –  $4 \times 10^5$  Zellen/Well in eine 6-Well Platte ausgesät
- Am folgenden Tag wurden 2 bzw. 4 µg Plasmid-DNA in Serum- und antibiotikafreiem Medium verdünnt. Parallel dazu wurde 3 - 10 µl Transfektionsreagenz in dem selben Medium verdünnt
- Anschließend erfolgte das Zusammenführen beider Lösungen und 20 min Inkubation bei RT

- Tröpfchenweise zupipettieren des DNA-Liposomenkomplexes zu den Zellen und durch Schwenken der Platte verteilen
- 24 h bis 16 Tage nach dem Ansatz konnte die Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie bzw. FACS-Analyse nachgewiesen werden

### **Nukleofektion**

- Melanozyten in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  -  $5 \times 10^5$  Zellen in je 100  $\mu\text{l}$  NHEM-Neo Nucleofector<sup>TM</sup> Solution aufnehmen und mit 2 bzw. 4  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mischen
- Die DNA-Zellsuspension in eine zertifizierte Küvette pipettieren und in den Nucleofector stellen
- das Programm U-16 oder U-20 (vom Hersteller angegebene Programme) auswählen und starten
- Sofort nach Beendigung der Nukleofektion 500  $\mu\text{l}$  vorgewärmtes MGM-Medium zu den Zellen pipettieren
- 8 nM EGF in ein Well vorlegen und mit MGM-Medium auffüllen
- Zellen mit speziellen Plastik Pipetten in eine mit Medium befüllte 6-Well Platte überführen
- im Abstand von 2 Tagen Mediumwechsel, entsprechend mit MGM und mit bzw. ohne 8 nM EGF
- Nachweis der Transfektionseffizienz nach 24 h bis 10 Tage nach Ansatz mittels Fluoreszenzmikroskopie bzw. FACS-Analyse
- nach 4 bzw. 10 Tagen Durchführung einer Zellzyklusanalyse

#### **4.6.10.1 Klonierungsversuche**

Für die Unterscheidung der Klonbildung von transfizierten Zellen, wurden Melanozyten in einer Konzentration von  $1 \times 10^2$  –  $1 \times 10^3$  Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Da Melanozyten *in vitro* geringe Klonbildung zeigten, wurden die Zellen außerdem nach der Methode von Linde in einen Weichagar eingesät.

Zur Vorbereitung wurde 2%iger Agar in deionisiertem Wasser gelöst, 15 min bei 121°C autoklaviert und bei 45°C im Wasserbad gehalten. Das Mischungsverhältnis des Agars zum Medium (MGM) betrug 1:4. Je 15 ml davon sind in eine Petrischale gegossen worden (Grundagar). Die eingesetzte Zellzahl betrug  $1 \times 10^4$  Zellen in 800  $\mu\text{l}$  Medium, diese Mischung wurde in 1,2 ml Agar-Medium-Lösung pipettiert und auf

den Grundagar gegeben. Die Weiterkultivierung erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Das Zellwachstum wurde jeden Tag mikroskopisch verfolgt.

## **4.7 Analytische Methoden**

*Lindl 1999*

### **4.7.1 Histologische Schnittpräparate**

Die Fixierung aller Gewebeäquivalente erfolgte in einer Bouin's-Lösung. Die verwendete Bouin's-Lösung ist formaldehydhaltig und bewirkt die Quervernetzung aller vorhandenen Proteine. Damit ist für die Äquivalente eine Unterbrechung aller inter- und intrazellulären Stoffwechselprozesse gewährleistet. Der zum Fixationszeitpunkt existierende strukturelle Zustand wird festgehalten und bewahrt.

Die Entnahme der zu fixierenden Präparate erfolgte steril, alle weiteren Schritte sind unter insterilen Bedingungen durchgeführt worden.

Die Fixation der Äquivalente lief in folgenden Schritten ab:

- Äquivalente für 1 h in ausreichendes Volumen von Bouin's-Lösung geben
- Danach in vorbereitete Einbettkassetten überführen
- 1 h in destilliertem Wasser inkubieren
- Anschließend erfolgte die stufenweise Wässerung, Entwässerung und Paraffindurchtränkung im Einbettautomat.

Die programmierten, einzelnen Schritte im Einbettautomat sind in Tabelle 11 festgehalten.

Tabelle 11: Arbeitsschritte im Einbettautomaten.

| Schritt                    | Zeit [h] |
|----------------------------|----------|
| Leitungswasser I           | 1        |
| Leitungswasser II          | 1        |
| Ethanol 70 vol%            | 1        |
| Ethanol 90 vol%            | 1        |
| Ethanol 96 vol%            | 1        |
| Isopropanol I              | 1        |
| Isopropanol II             | 1        |
| Isopropanol / Xylol<br>1:1 | 1        |
| Xylol I                    | 1        |
| Xylol II                   | 1        |
| Flüssig-Paraffin I         | 3        |
| Flüssig-Paraffin II        | 3        |

Nach Entnahme aus dem Automaten folgte die manuelle Einbettung in, mit Flüssig-Paraffin befüllte Metallschalen und die Lagerung bei 4°C, um das Paraffin auszuhärten.

Das Schneiden der Gewebeblöcke fand mit einem Rotationsmikrotom statt. Es wurden Gewebeschnitte von 2 µm Dicke hergestellt. Zur Streckung wurden die Schnitte in ein Wasserbad mit 40°C überführt, und aus diesem direkt auf geeignete Objektträger aufgezogen. Für die histologische Färbungen kamen unbeschichtete, für die immunhistochemische Färbungen polysine beschichtete Objektträger zum Einsatz. Die vollständige Trocknung der Schnitte erfolgte auf einer Heizplatte bei 50°C.

#### 4.7.2 Entfernung des Paraffins

Bestimmte Inhaltsstoffe des Einbettungsmediums können unspezifische Hintergrundfärbungen sowie eine Inhibition der spezifischen Färbung verursachen. Deshalb ist dieses Medium vor allen Färbeprozessen zu eliminieren.

Nach schmelzen des Paraffins erfolgte die Lagerung der Objektträger für 30 min in einem Wärmeschrank bei 60°C. Danach wurden sie sofort für 10 min in Roticlear-Lösung überführt, um das Paraffin zu entfernen. Nach einem Bad in frischer Roticlear-Lösung folgte das Eintauchen für jeweils 2 min in eine absteigende Ethanolreihe von je 2 × 96 vol%, 70 vol% und 50 vol%. Abschließend mit destilliertem Wasser spülen.

### 4.7.3 Histologische Färbung organotypischer Kulturen

Zur histologischen Behandlung der vorbereiteten Gewebeschnitte (4.7.1) kam die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zum Einsatz. Hämatoxylin färbt alle basophilen Zell- und Gewebestrukturen, wie Kerne und einige Zytoplasmabestandteile mit blauer Farbe, Eosin alle azidophilen Anteile des Zytoplasma mit roter Farbe. Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die einzelnen Schritte.

Tabelle 12: HE – Färbeschritte.

|     |  |           |
|-----|--|-----------|
| 1.  | Färben mit Hämatoxylin-Lösung                                  | 10 min    |
| 2.  | Spülen mit Aqua dest. zur Entfernung überschüssiger Farblösung |           |
| 3.  | Differenzieren mit 0,25% HCl / Ethanol 50 vol%                 | 3 sec     |
| 4.  | Spülen mit Aqua dest.  |           |
| 5.  | Bläuen mit warmem Leitungswasser                               | 1 min     |
| 6.  | Färben mit Eosin-Lösung  | 1 min     |
| 7.  | Spülen mit Aqua dest. zur Entfernung überschüssiger Farblösung |           |
| 8.  | Differenzieren mit Ethanol 70 vol%                             | 3 sec     |
| 9.  | Entwässern mit Ethanol 96 vol%                                 | 3 sec     |
| 10. | Entwässern mit Isopropanol                                     | 2 × 5 min |
| 11. | Inkubieren mit Rotihistol (Xylol-Substitut)                    | 2 × 5 min |
| 12. | Eindecken mit Clearium (nichtwässriges Eindeckmittel)          |           |

#### 4.7.4 Immunhistochemie

##### 1. Peroxidase-Färbung

Biotin Streptavidin Amplified Detektion System – Kit von BIO Genex, Kalifornien, USA

Die Peroxidase Färbung stellt ein empfindliches Verfahren dar, bei dem Proteine als Antigene mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper verwendet werden. Mittels eines von der Peroxidase umgesetzten Substrates wird die Position des Antigens dauerhaft sichtbar gemacht. Als Substrat diente Aminoethylcarbazol (AEC) rot. Gegenfärbung der Zellkerne kann mit Hämalaun erfolgen. Tabelle 13 zeigt die Methode der Färbung.

*Tabelle 13: Biotin Streptavidin Amplified Detektion System.*

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Multi-Link:             | Sekundärantikörper (Anti-Maus, Anti-Guinea pig, Anti-Ratte) = konzentriertes biotinyliertes Anti-Immunglobulin in PBS, stabilisiert mit Trägerprotein, 0,09% Natriumazid und 1% Humanserum |
| Label:                  | Markierungsenzym = konzentriertes Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Streptavidin in PBS, stabilisiert mit Trägerprotein und 0,01% Thiomersal   |
| Substrat/<br>Chromogen: | AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)- Konzentrat in N,N-Dimethylformamid  |

##### 2. Immunofluoreszenz

Zum Nachweis eines Antigens kann statt des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers auch ein Fluorochrom-markierter Antikörper verwendet werden. Dieser Zweitantikörper der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, ist nach Wahl mit FITC (grün) oder Texas red (rot) gekoppelt.

Die Färbung der präparierten Schnitte (4.7.2) erforderte im Vorfeld eine Antigendemaskierung, die aus einer Hitzevorbehandlung mit Zitratpuffer besteht. Die Fixierung mit formaldehydhaltigen Lösungen verursacht bei Proteinen Quervernetzungen und im Verlauf der Einbettung in Paraffin verändert sich ihre 3-D Struktur. Mit einer Antigendemaskierung (Target Retrieval) können



Quervernetzungen aufgebrochen und die Konformation der Epitope wiederhergestellt werden. Außerdem werden mit dem Zitrat Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) entfernt. Diese Vorbehandlung erfolgte auf Empfehlung des Herstellers bei allen verwendeten Primärantikörpern.

Verdünnt wurden die Konzentrate mit den entsprechenden, mitgelieferten Pufferlösungen nach Anweisung des Herstellers. Als Waschpuffer diente TBS (Tris) – Puffer pH 7,4.

## **4.8 Mikrobiologische Methoden**

*Schlegel 1999*

### **4.8.1 Herstellung kompetenter Bakterien**

Zur erfolgreichen Transformation werden kompetente Bakterienzellen benötigt. Dies geschieht durch die Behandlung der Bakterien mit Calciumchlorid. Hierfür werden 10 ml konzentriertes LB-Medium 1:1 mit sterilem Wasser verdünnt. Die in  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  lagernden DH5 $\alpha$ - Zellen werden aufgetaut und 60  $\mu\text{l}$  Zellsuspension in 20 ml LB-Medium pipettiert. Diese Vorkultur ÜN bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttler inkubieren. 500 ml gebrauchsfertiges (1:1 verdünntes) LB-Medium mit 2,5 ml Vorkultur animpfen und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 bei  $37^{\circ}$  schütteln. Die folgenden Schritte müssen auf Eis durchgeführt werden. Für die Zentrifugationen wurde eine Kühlzentrifuge ( $4^{\circ}\text{C}$ ) verwendet. Nach Erreichen der OD von 0,6 sollen die Zellen gekühlt und anschließend 15 min bei 4200 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mittels einer gekühlten Pipette in 100 ml kaltem TFB 1 (Puffer) resuspendiert und anschließend für 10 min bei 4200 rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen und das Pellet in 20 ml TFB 2 (Puffer) aufgenommen werden. Die kompetenten Zellen werden aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **4.8.2 Stammhaltung**

Zur langfristigen Lagerung transformierter Bakterien wurden Glycerinstocks angelegt. Hierfür sind die transformierten DH5 $\alpha$ - Zellen in 10 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika-Zusatz angeimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Schüttler

inkubiert worden. Die Bakteriensuspension ist bei 4200 rpm 5 min abzentrifugiert und das Bakterienpellet mit 1 ml einer 25%-Glycerinlösung versetzt und anschließend bei – 80°C eingefroren worden.

#### **4.8.3 Chemische Hitzeschocktransformation**

Zunächst werden kompetente DH5 $\alpha$ - Zellen (4.8.1.) 20 min auf Eis aufgetaut und davon 100  $\mu$ l mit 1  $\mu$ l Plasmid-DNA versetzt und vorsichtig gemischt. Eine Negativkontrolle von *E.coli* ohne Plasmid ist mitgeführt worden. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock im vorgewärmten Wasserbad für 1 min bei 42 °C und eine anschließende Inkubation von 5 min auf Eis. Zusätzlich sind diesem Ansatz 900  $\mu$ l LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz zupipettiert und 45 min bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden kurz bei 20000 rpm manuell abzentrifugiert und 900  $\mu$ l Medium abgenommen. Anschließend erfolgte im Rest des Überstandes die Resuspendierung der Zellen, die Ausplattierung auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz und dann die Abdichtung mit Parafilm. Inkubation ÜN bei 37° C. Nur die Bakterien mit dem integrierten Antibiotika-Resistenzgen bilden auf den Selektionsagarplatten Kolonien.

#### **4.8.4 Candida albicans**

Das epidermale Hautmodell diente als Testsystem um verschiedene *Candida albicans* Stämme auf ihr invasives und adhäsives Verhalten zu charakterisieren. Die 2 Transkriptionsfaktoren, EFG1p und CPH1p sind für die Virulenz von *Candida albicans* essentiell. Zum Einsatz für die Untersuchungen kamen verschiedene Stämme mit unterschiedlicher Deletionen dieser Gene. Im Folgenden sind die einzelnen Stämmen aufgelistet:

- Sc5314 Wildtyp [56]
- Can 16 (*cph1::hisG/cph1::hisG::URA::hisG*)
- Can 34 (*cph1::hisG/cph1::hisG, efg1::hisG/efg1::hisG::URA3::hisG*) [105]
- Can 33 (*efg1::hisG/efg1::hisG, URA3::hisG*)

Die Anzucht der Stämme erfolgte aus einer Stock-Kultur in Glycerol ÜN in YPD (Hefeextrakt/Pepton/Dextrose) Medium mit 2% Glucose. In einer Konzentration von  $1 \times 10^2$  -  $1 \times 10^3$  Zellen werden diese Stämme auf das Hautmodell ausgesät.

## 4.9 Molekularbiologische Methoden

*Sambrock et al. (1989)*

### 4.9.1 Plasmid-Isolierung im analytischen Maßstab

Die Plasmid-Isolierungen im analytischen Maßstab sind mit dem „QIAprep-spin Plasmid Kit“ der Firma Quiagen durchgeführt worden. Am Vortag der Isolierung sind 10 ml LB-Medium mit Antibiotika-Zusatz einer Einzelkolonie der Aggarplatte angeimpft und ÜN bei 37° C im Schüttler inkubiert. Danach wird folgendermassen weiterverfahren:

- Nach 12-16 h werden die unter Selektionsdruck wachsenden transformierten Bakterien bei 4200 rpm für 5 min abzentrifugiert
- Pellet in 250 µl P1 RNase-haltigem Lysispuffer resuspendieren
- Zusatz von 250 µl P2 Denaturierungspuffer und 350 µl Puffer N3 aus der Bakteriensuspension zur Fällung der genomischen DNA und Proteine
- Aufgabe der Lösung auf die QIAprep Säule, an der die Plasmid-DNA bindet
- Waschen der Säule mit 500 µl TB Guanidinhydrochlorid-haltigem und 750 µl PE Ethanol-haltigem Puffer mit mehreren kurzen Zentrifugationsschritten
- Eluieren der Plasmid-DNA mit 50 µl sterilem, bidestilliertem Wasser

### 4.9.2 Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab

Die Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab erfolgte mit dem QUIAGEN „Endofree“ Kit. Dabei ist zu beachten, dass auch verwendete Geräte (Glasröhrchen, Pipetten usw.) endotoxinfrei sind. Dies ist durch eine Hitzesterilisation bei 180 °C über Nacht gewährleistet.

Aus dem Glycerinstock sind 150 ml LB-Selektionsmedium abgeimpft und ÜN bei 37°C im Schüttler inkubiert worden. Die Isolierung folgte folgendem Schema:

- Nach 12-16 h wird die Bakteriensuspension in 50 ml Blue Caps proportioniert, bei 4200 rpm für 10 min abzentrifugiert und in insgesamt 10 ml Puffer P1 resuspendieren
- Zugabe von 10 ml Puffer 2 und vorsichtiges Homogenisieren
- Inkubation für 5 min bei RT

- Zugabe von 10 ml Puffer 3 und vorsichtiges Homogenisieren. Die Zugabe von Puffer 3 bewirkt die Fällung der genomischen DNA, Proteine und anderen Zellbestandteilen
- Aufgabe der Suspension auf ein „QIAfilter Maxi Cartridge“ mit Verschlusskappe
- Inkubation für 10 min bei RT
- Abnehmen der Verschlusskappe und Filtration des Lysats in ein 50 ml Blue Cap
- Zugabe zum filtrierten Lysat von 2,5 ml Puffer ER, Homogenisierung und Inkubation für 30 min auf Eis
- Equilibrierung des „QIAGEN-tip“ mit 10 ml Puffer QBT
- Zusetzen des filtrierten Lysats
- Säule mit je 30 ml Puffer QC waschen, die DNA mit 15 ml Puffer QN eluieren und mit 10,5 ml endotoxinfreiem Isopropanol fällen
- Mischen der Lösung und sofort Zentrifugation bei 19000 rpm
- Pellet mit 5 ml endotoxinfreiem 70 % Ethanol waschen und nochmals 10 min bei 19000 rpm zentrifugieren
- Überstand vorsichtig dekantieren und das Pellet in 500 µl Puffer lösen

#### **4.9.3 Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung erfolgte mit bidestiliertem Wasser im Verhältnis 1:200 und Messung der Absorption bei 260 nm. Für die Berechnung der Konzentration doppelsträngiger DNA wurde ein Näherungswert von 50 µg (ml x OD<sub>260</sub>) verwendet. Die Berechnung basierte auf folgender Gleichung:  $c_{DNA} [ng/\mu l] = 50 \times 200 \times OD_{260}$ .

Verunreinigung durch Nukleinsäuren werden durch die zusätzliche Messung der OD bei 280 nm und durch die Bildung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  berücksichtigt. Als Richtwert gilt hierbei ein Wert von  $OD_{260}/OD_{280} > 1,8$ .

#### **4.9.4 Restriktionsverdau und gelelektrophoretische Auftrennung von DNA**

Die Überprüfung der erhaltenen Plasmid-DNA bzw. der Plasmid-Isolierung im analytischen und präparativen Maßstab ist durch ein Restriktionsverdau und

anschließende gelelektrophoretische Auftrennung durch ein Agarosegel belegt worden. Der Verdau ist in folgendem Pippetierschema dokumentiert.

Tabelle 14: Ppetierschema.

| Volumen      | Zusatz               |
|--------------|----------------------|
| 1 µl         | BSA                  |
| 1,5 µl       | pDNA                 |
| 0,5 µl       | 1. Restriktionsenzym |
| 0,5 µl       | 2. Restriktionsenzym |
| 6,5 µl       | Wasser               |
| <b>10 µl</b> | <b>Gesamtvolumen</b> |

Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA:

- Inkubation des Ansatzes für 60 min bis 12 h bei 37°C
- Zugabe von 5 µl Blaupuffer
- Herstellung eines 1%igen Agarosegels: 0,5 mg Agarose mit 50 ml einfach konzentriertem TBE-Puffer versetzen
- Lösen des Agarosegels in der Mikrowelle für 2 min bei 750 W
- Agaroselösung nach Abkühlen auf ca. 60°C in die Gelgießvorrichtung eingießen
- Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid zur Gelgießvorrichtung
- Nach Erstarren das Gels in eine Flachbett-Agarosegelkammer mit 1 x TBE-Puffer überführen
- Proben in die Vertiefungen des Agarosegels und jeweils rechts und links der Proben eine 10 kb-Leiter als Standard einpipettieren
- Anlegen einer Spannung von 120 V (400 mA)
- Dauer der Elektrophorese 30 – 45 min

Die Visualisierung und Dokumentation der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit einem Gel-Dokumentationsgerät mit fotografischer Einrichtung. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte mittels einer 2log-Größenmarker Leiter der Firma New England Biolab.

#### **4.9.5 Methoden zur Proteinbestimmung**

Die Menge an vorhandenen Zytokinen in Zellkulturüberständen kann mittels ELISA bestimmt werden. Hierzu werden mit Antikörpern beschichtete 96-Well Platten verwendet, die Antigene aus der applizierten Testsubstanz binden. Nach Abwaschen nicht gebundener Substanz wird ein zweiter, an das Antigen bindender Antikörper zugegeben, der kovalent mit einem Enzym gekoppelt ist. Die Enzymmoleküle setzen anschließend ein zugegebenes Chromogen in ein farbiges Endprodukt um.

Das mit zellulärem Protein angereicherte konditionierte Medium wird den organotypischen Kulturen entnommen kurz abzentrifugiert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur Messung der Zytokinausschüttung wurden Medien von Hautäquivalenten über die gesamte Inkubationsdauer von 3-72 h zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Der Nachweis von IL-1 $\alpha$  erfolgte über Kits der Firma R&D-Systems nach Anweisung des Herstellers. Es wurden Dreifachwerte bestimmt.

#### **4.10 Organotypische Kulturen**

Das Hautmodell besteht aus humanen Fibroblasten in einer Typ I-Kollagenmatrix und darauf aufgesäten primären Keratinozyten. Das Kollagen und die Gelgießlösung werden vorgelegt und auf Eis gestellt. Zunächst werden die Fibroblasten passagiert in einer Konzentration von und  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in der Gelgießlösung aufgenommen und sofort luftblasenfrei in das Kollagen einpipettiert. Mit Hilfe einer Multistep Pipette mit Spritze und Spitze wird das Gemisch aufgenommen, gleichzeitig gemischt und je 500  $\mu\text{l}$  in eine 24-Well Platte mit speziellem Insert (Fa. Nunc) pipettiert. Danach erfolgte die Inkubation der Gele bei  $37^{\circ}$  für 5 min im Brutschrank. Nach Ausgelieren der Gele werden diese mit ca. 1,5 ml pro Well DMEM, 10% FCS, 1% Gentamycin versetzt und ÜN bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am folgenden Tag folgte das Absaugen des Mediums. Auf das Gel werden 25  $\mu\text{l}$  Fibronectin in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  pipettiert und für  $\frac{1}{2}$  Stunde in den Brutschrank gestellt.

Anschließend erfolgt die Aussaat der Keratinozyten. Die Keratinozyten werden passagiert, und je  $1 \times 10^5$  Zellen in 50  $\mu\text{l}$  KMBR mit 5% FCS auf die Gele pipettiert, 20 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend werden die Gele mit KMBR + 5% FCS submers gesetzt. In insgesamt 5 Tagen wird die FCS-Konzentration von 5% FCS auf 0% FCS

in KMBr reduziert. Danach folgte die Weiterkultivierung der Hautgele für 12 - 14 Tagen an luftexponierter Umgebung.

Nach dieser Zeit sind die Hautäquivalente für entsprechende Testungen einsatzbereit. Die folgende Abbildung gibt den Aufbau schematisch wieder.

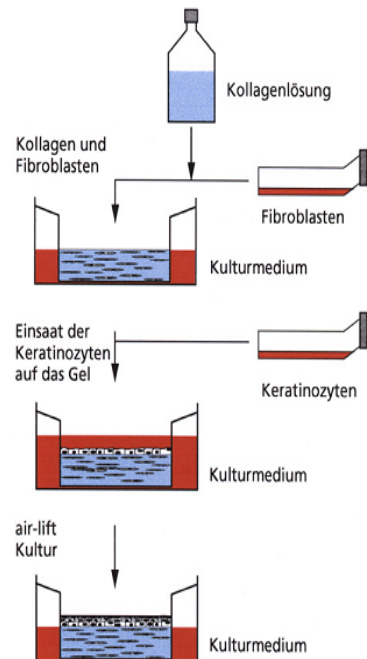


Abb.11: Schematischer Aufbau des Basishautmodells.

#### 4.10.1 Humanes 3-D Hautmodell als Testsystem

Das 3-D humane Hautmodell berücksichtigt die dritte Dimension und nähert sich dadurch dem physiologischen System. Es ist gut geeignet um die Pathogenese verschiedener Krankheiten auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Mit diesem *in vitro* Modell können phänotypische Veränderungen verschieden applizierter Medikamente visualisiert werden und dadurch Einflüsse und Wirkungen bestimmter Substanzen analysiert werden. Im Folgenden werden die zellulären Erweiterungen und die Etablierung des 3-D Hautmodelles als *in vitro* Testsystem dargestellt.

##### 4.10.1.1 *in vitro* Wundheilungsmodell

Im Rahmen eines durch das BMBF geförderten Projekts wurde ein *in vitro* Wundheilungsmodell etabliert und auf seine Funktionalität überprüft. Untersucht werden sollte, ob sich ein Phänotyp vergleichbar mit normaler Wundheilung einstellt.

Mehrere Marker, die in der humanen Wundheilungskinetik eine Rolle spielen sollen an dem *in vitro* Modell untersucht werden. Folgende Zeitpunkte wurden als Parameter für Untersuchungen gewählt: 6 h, 12 h, 48 h und 72 h nach Verletzung.

Die reverse Transkriptionspolymerase Kettenreaktion (RT-PCR) erreicht aufgrund der Amplifikationsreaktion eine hohe Sensivität und eignet sich zum Nachweis geringer Molekülmengen. Sie wurde verwendet um Transkripte mit geringer Kopienzahl nachzuweisen. Für die Charakterisierung der verwundeten Hautäquivalente mit Hilfe von Real Time PCR wurden Marker ausgewählt, die entweder von Fibroblasten oder Keratinozyten exprimiert werden, und deren Expression im normalen Wundheilungsverlauf reguliert werden. Favorisiert sind diejenigen Targetgene, die ein sezerniertes Produkt codieren. Verglichen wurden die Expressionsstärken mit dem „house keeping gene“ Cyclophilin. Getestet wurden folgende Produktkandidaten (Tabelle 15).

Tabelle 15: Produktkandidaten.

| Kandidaten                                       | Bemerkungen                           |
|--|---------------------------------------|
| mrp8/mrp14                                       | Hyperproliferatives Epithel in Wunden |
| Calgranulin C                                    | Chemaotaktische Funktion              |
| Hydroxyprostaglandinhydrogenase                  | Beteiligt am Prostaglandinabbau       |
| $\alpha$ 1-Antichymotrypsin (Alpha1-ACT)         | Serinprotease Inhibitor               |
| Dipeptidylpeptidase I-Inhibitor<br>(Cathepsin C) | Hydrolase                             |

Die Proteine Mrp8/Mrp14 und Calgranulin C wurden von der Firma Switch Biotech in Bakterien rekombinant exprimiert, gereinigt und so zur Verfügung gestellt. Der DPPI-Inhibitor wurde ebenfalls von der Firma Switch Biotech synthetisiert und für die Versuche gestellt. Zu Unterschiedlichen Zeitpunkten: 6h, 12h, 24h, 48h und 72h nach Verletzung wurden die Effekte der Inkubation von Produktkandidaten auf das "verwundete Hautäquivalent" immunhistologisch analysiert. Parallel dazu wurde die induzierte Sekretion durch die Verletzung in den Medienüberständen der



Hautäquivalente durch ELISA quantifiziert. Als Kontrolle diene ein unverletztes Äquivalent.

#### **4.10.1.1.1 Verwundungstechnologie**

Eine einheitliche Wundsetzung der Hautäquivalente mit einem Durchmesser von 4 mm wurde durch einen blitzlampengepumpten Festkörperlaser erreicht. Dieser ist nötig, da die Stanzbiopsien, die an freiwilligen Probanden für Wundheilungsstudien entnommen wurden, auch 4 mm Durchmesser aufweisen, was eine gute Vergleichbarkeit der *in vivo* und *in vitro* Situation, im Hinblick auf die RT-PCR, gewährleistet. Das aktive Lasermedium ist ein Erbium-Yttrium-Aluminium-Granat (Er:YAG-Laser). Die Pulsdauer eines Pulses beträgt ca. 300 ms. Die Pulsfrequenz beträgt 1 Hz. Der Laserstrahl wird mit Hilfe eines Strahlgelenkarms zur Probe geführt und mit einer Linse ( $f=100\text{mm}$ ) auf einen Fleckdurchmesser von 4 mm zusammengeführt.

#### **4.10.1.2 *in vitro* Tumormodell**

Es soll eine Systemerweiterung des Hautmodells mit Hautmelanomen durchgeführt werden. Die Herstellung des dermalen Anteils (Fibroblasten in Biomatrix) erfolgt wie in 4.10 beschrieben. Die Melanomzellen werden geerntet, in DMEM + 10% FCS aufgenommen, resuspendiert und zur Einsaat auf das Kollagengel bereitgestellt. Dann folgt die vorsichtige Zugabe von  $3 \times 10^4/50 \mu\text{l}$  Melanomzellen auf die Oberfläche der Biomatrix. Nach 30 min Inkubationszeit werden die Inserts mit Medium submers aufgefüllt und im Brutschrank 18 h belassen. Verdeutlicht wird diese Methode durch die folgende schematische Darstellung (Abbildung 12).

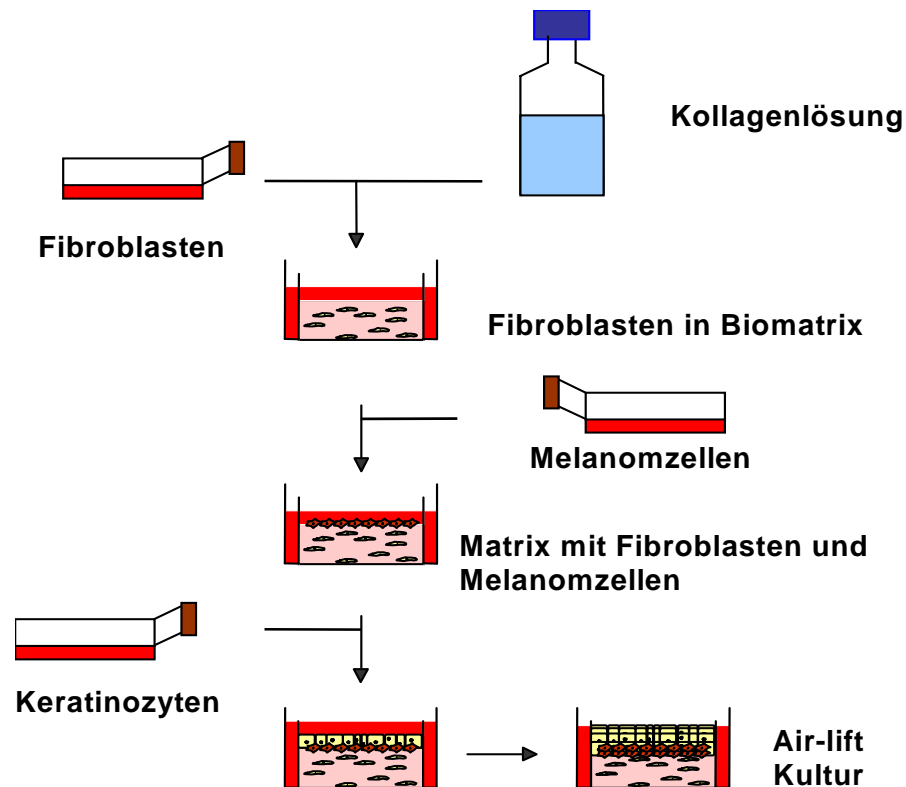


Abb.12: Schematische Darstellung des Aufbaus.

Zur Integration kamen folgende Melanomzelllinien: M 13, BLM, SK Mel 28 und Mel Yuso.

Ein weiterer Ansatz bestand in der Integration primärer humaner transformierter Melanozyten. Hierfür wurden die Melanozyten durch ein induzierbares Proto-Onkogen (Xmrk) konditional transformiert (4.6.10). Durch den Einsatz eines Konstruktes, das den extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors mit der intrazellulären Domäne von Xmrk funktionell kombiniert, soll eine reversible, d.h. induzierbare Tumorzelllinie erhalten werden, die dann in das Hautmodell integriert werden soll. Zunächst wurde jedoch eine geeignete Einsaatmethode mit etablierten Melanomzelllinien in das 3-D Basishautmodell etabliert.

#### 4.10.1.3 *in vivo* Angiogenesemodell

Parallel zur Entwicklung der Implantation von Hautmelanomen sollen Maßnahmen und erste Validierungen zur Implantation von humanen mikrovaskulären Endothelzellen in das Hautmodells durchgeführt werden. Das Modell basiert auf der Invasion von primären mikrovaskulären Endothelzellen und Tumorzellen in eine 3-D

Biomatrix. Die Integration der Endothelzellen in das Basismodell erfolgte als Monolayerkultur auf einer mit Kollagenlösung beschichteten Insertmembran (Nunc). Die Melanomzellen wurden vor Aussaat der Keratinozyten als Gel in die Dermis integriert. Der epidermale Anteil wurde getrennt von dem dermalen Anteil kultiviert und nach 12 Tagen Kultivierung auf den dermalen Teil aufgesetzt.

Abbildung 13 erläutert den Aufbau dieser Methode. Der Aufbau gliedert sich in 3 Abschnitte:

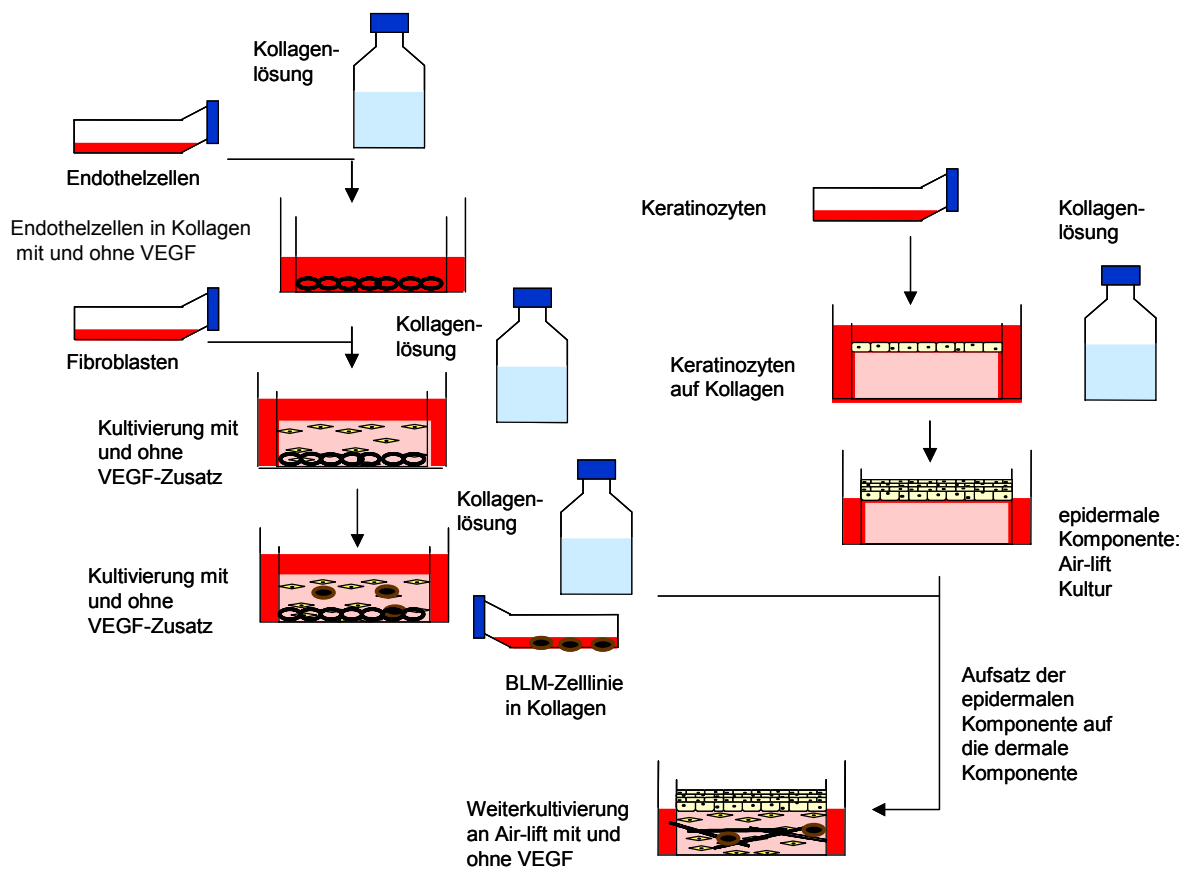


Abb. 13: Schema zum Aufbau des in vitro Angiogenesemodells.

**Aufbau des dermo-endothelialen Tumoräquivalents:*****Integration der Endothelzellen***

Hierfür wurden die Endothelzellen gemäß Abschnitt 4.6.8.3 und 4.6.9.3 präpariert, subkultiviert und in der 2. Passage eingesetzt. Es wurden  $5 \times 10^4$  Zellen in einem Volumen von 400  $\mu\text{L}$  ECG-VEGF Medium aufgenommen und in die mit Kollagen beschichteten Inserts (4.6.6) ausgesät. Nach 3 h Kultivierung erfolgte die vollständige Submerssetzung der Wells mit ECG-MV-VEGF-Medium. Die Zellen wurden für 2 Tage vorkultiviert. Dann wird die dermale Komponente wie unter 4.10 beschrieben aufgebaut und auf die Endothelzellen aufgesetzt und für 37 Tage mit diesem Medium weiterkultiviert. Mediumwechsel erfolgt alle 2 Tage.

***Integration der Melanomzellen***

Zur Integration der Melanomzellen werden diese zunächst subkultiviert und dann 1000 Zellen in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  Gelmischung aufgenommen.

Nach Inkubation der Gel-Zellmischung von 30 min bei 37 °C wird die Melanom-Gel-Mischung auf das dermale-endotheliale Äquivalent aufgesetzt und mit ECG-VEGF-Medium submers gesetzt. Danach wird die getrennt gezüchtete epidermale Komponente auf die dermale aufgesetzt.

***Aufbau des epidermalen Äquivalents***

Der Aufbau und die Kultivierung erfolgte wie unter 4.10 beschrieben. Nach 12 Tagen Airlift-Kultivierung ist der epidermale Anteil auf den dermalen Anteil gesetzt worden.

Die Kultivierung des vollständigsten *in vitro* Angiogenesemodells erfolgte für 4 weitere Tage mit dem Airlift-Medium. Anschließend wurde das *in vitro* Modell zur histologischen und immunhistologischen Auswertung fixiert.

#### 4.10.1.4 *In vitro* Infektionsmodell

Mit dem 3-D Hautmodell soll die Fähigkeit zur Invasion und Adhäsion unterschiedlicher *Candida albicans* Stämme analysiert werden. Die Hefestämme sind in DMEM Medium mit 1% Agar bis zu einer Zellkonzentration von  $10^3$  Zellen/ml angezogen worden. Im Anschluß daran wurden kleine Stücke mit einer sterilen Pipette ausgeschnitten und am Tag 12-14 der Airlift-Kultur auf das Äquivalent aufgesetzt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten: 0 h, 18 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Infektion konnten die Effekte der Inkubation verschiedener *Candida albicans* Stämme histologisch untersucht werden. Für die histologischen Auswertungen kam die PAS Methode zum Einsatz. Die PAS-Färbung ist eine histochemische Färbung, bei der insbesondere kohlenhydrathaltige Komponenten z.B. Glykoproteine, Muzine und Glykogen mit Hilfe von Perjodsäure und Schiff-Reagens nachgewiesen werden können. Durch die im PAS-Reagens vorhandene Perjodsäure werden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidiert, die dann mit dem im Schiff-Reagens vorhandenen schwefelsauren Fuchsin rot-violette Komplexe bilden und so im histologischen Bild erscheinen. Dazu ist eine definierte Zellzahl von  $10^2$ - $10^3$  an Can34 ( $\Delta$ cph1  $\Delta$ efg1), Can33 ( $\Delta$ efg1), Can16 ( $\Delta$ cph1) oder Sc5314 (Wildtyp) auf die Hautmodelle gegeben worden. Die *Candida* Stämme wurden in Weichagar eingebettet und in einem definierten Stück von ca. 4 mm im Durchmesser, auf die Modelle gegeben.

## 5 Ergebnisse

Die Entwicklung von *in vitro* Testsystemen für neu entwickelte Therapeutika im Bereich der Dermatologie sollen dazu dienen, die Zahl der Tierversuche im Validierungsprozess eines Produktkandidaten deutlich zu vermindern. Derartige Testsysteme sollen auch in der Tumorforschung dazu beitragen, dass Kandidaten in einer frühen Entwicklungsphase schnell und kostengünstig für eine Weiterentwicklung selektiert werden können. Als Testsystem kommen u.a. 3-D Zellkulturen zum Einsatz, die in ihrer Zellzusammensetzung und Struktur der menschlichen Haut ähneln. Der Vorteil eines solchen Modells gegenüber Zellkulturexperimenten mit isolierten Zellen liegt darin, dass die verschiedenen Zelltypen in Kontakt stehen und so auch indirekte Effekte analysiert werden können. Als Testsysteme wurden folgende Modelle etabliert:

- *in vitro* Modell für die Wundheilung
- *in vitro* Modell zur Untersuchung der Invasivität von Melanomen
- *in vitro* Modell zur Untersuchung der Angiogenese
- *in vitro* Modell für Infektionsstudien

### 5.1 Verwendete Zellen

Die Präputien hatten je nach Alter des Spenders und Operationsmethode unterschiedliche Größe und enthielten einen unterschiedlichen Anteil an Fettgewebe, die sorgfältig entfernt werden müssen. Für die Anlage der verwendeten Zellen wurden Präputien von jüngeren Spendern (0,5 – 6 Jahre) bevorzugt, da diese Zellen eine bessere Proliferation zeigten.

#### **Humane primäre Keratinozyten und Fibroblasten**

Je nach Größe des Ausgangsmaterials konnten Keratinozyten in eine 75 cm<sup>2</sup> bzw. 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche verteilt werden und zeigten nach 6-9 Tagen eine 80%-ige Konfluenz. Fibroblasten zeigten zu Beginn der Kultivierung ein sehr langsames Wachstum. Konfluenz wurde in der Primärkultur einer mittleren Zellkulturflasche erst nach durchschnittlich 12 Tagen erreicht. Ab der 1. Passage konnte bei Fibroblasten ein starker Anstieg in der Proliferation beobachtet werden. Bei Einsaat von  $2 \times 10^5$  Zellen in eine große Zellkulturflasche (182 cm<sup>2</sup>) konnte nach 9 Tagen Konfluenz beobachtet werden (Abbildung 14).

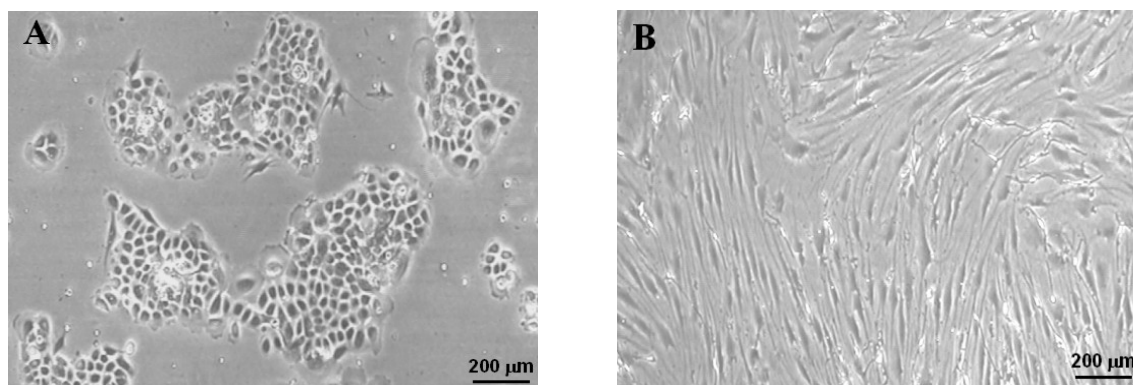


Abb.14: Phasenkontrastaufnahme primärer Keratinozyten (A) und Fibroblasten (B). Die Keratinozyten zeigen ein klonales Wachstum, die Fibroblasten zeigen die typische Fibroblastenmorphologie und einen konfluenten Zellrasen.

### **Isolierung und Subkultivierung primärer Melanozyten**

Die Isolierung primärer epidermaler Melanozyten erfolgte mit den unter 4.6.8.1 beschriebenen Methoden. Melanozyten wuchsen bei allen 3 Isolierungsmethoden in der Primärkultur in Kokultur mit Keratinozyten. Die Keratinozyten zeigten nach 6-9 Tagen klonales Wachstum (Abbildung 14). Nach durchschnittlich 8 Tagen wurde die Keratinozyten-Melanozyten Kokultur erstmals subkultiviert. Keratinozyten erwiesen sich wesentlich unempfindlicher gegenüber Trypsin-Behandlung als Melanozyten. Nach der 1. Subkultivierung der Zellen lösten sich die Melanozyten schon nach ca. 1 min ab, während die Keratinozyten noch adhären waren. In die 1. Passage verschleppte Keratinozyten konnten durch den hohen Kalziumgehalt des melanozytenspezifischen Mediums (MGM) nicht mehr adhären. Melanozytenkulturen waren deshalb in der 1. Passage zu 95% frei von Keratinozyten (Abbildung 15).

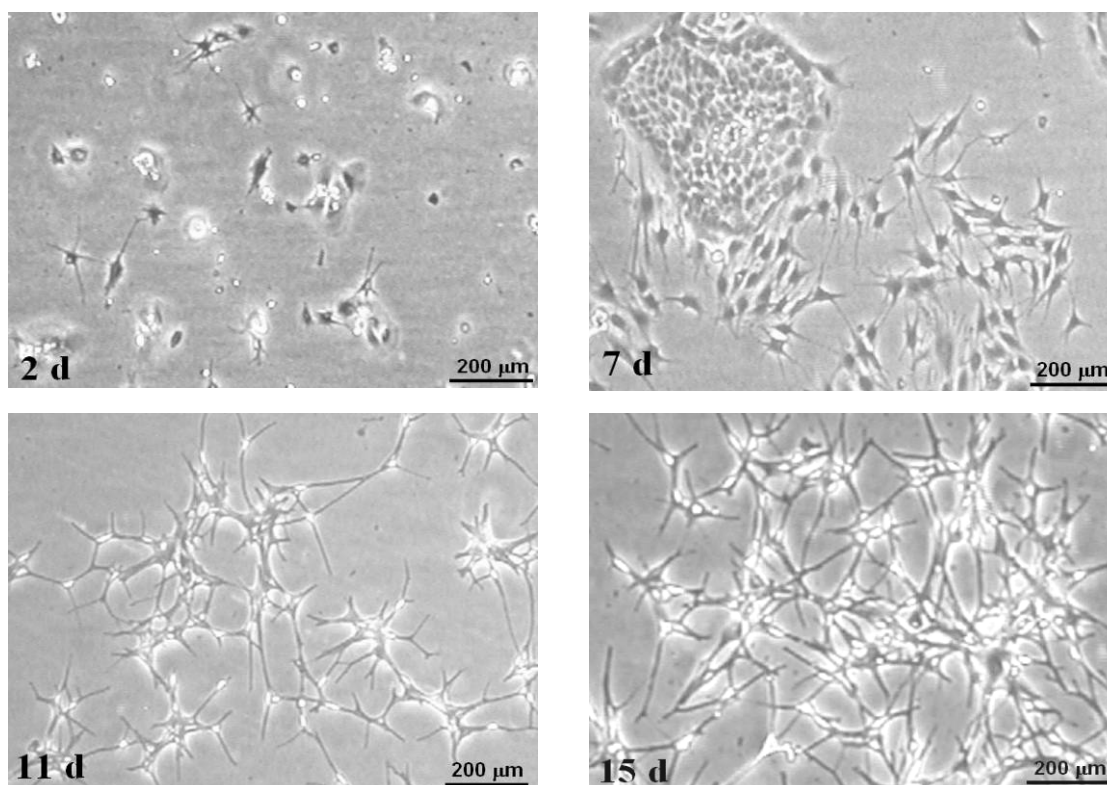


Abb.15: Phasenkontrastaufnahmen von primären humanen Melanozyten nach verschiedenen Zeitpunkten, Tag 2 und Tag 7 zeigt die Primärkultur, Tag 11 und Tag 15 die 1. Passage.

### Charakterisierung humaner Melanozyten

Humane Melanozyten zeigten bei der Kultivierung eine sehr unterschiedliche Morphologie. Zu Beginn hatten die meisten Zellen eine fibroblastenähnliche Form. Bei längerer Kultivierung bildeten die Melanozyten immer mehr Fortsätze, was sich schließlich zur typischen „Starlet“- Form der Melanozyten mit bis zu zehn Ausläufern ausbildete (Abbildung 16).

Ein deutlicher Unterschied war in der Morphologie von Melanozyten aus negriden (dunkle Haut) und kaukasischen (helle Haut) Spendern festzustellen. Präputien von negriden Spendern waren seltener, wurden jedoch aufgrund des höheren Anteils an Melanosomen bevorzugt verwendet. Negride Melanozyten waren im Vergleich zu den kaukasischen Spendern größer und zeigten oftmals eine „Triangel“ oder „mehreckige“ Form (Abbildung 16 B). Bei der Kultivierung von negriden Melanozyten konnte eine verstärkte Braunfärbung des Mediums durch starke Abgabe des Farbstoffes Melanin in das Kultivierungsmedium beobachtet werden.



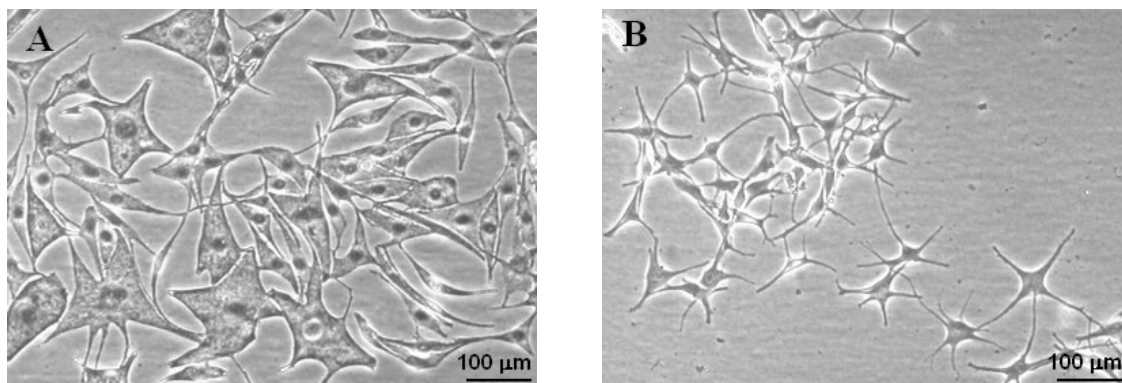


Abb.16: Phasenkontrastaufnahme primärer humaner Melanozyten der 1. Passage, isoliert aus Präputien eines negriden (A) und eines kaukasischen Spenders (B).

### Immunzytologischer Nachweis von primären Melanozyten

Zur näheren Charakterisierung der isolierten Melanozyten und eine Unterscheidung zu Fibroblasten sichtbar darzustellen, wurde eine Antikörperfärbung eingesetzt. MART-1 färbt spezifisch maligne (bösaartig) und benigne (gutartig) Melanozyten. Die den Melanozyten oft morphologisch sehr ähnlichen Fibroblasten werden nicht gefärbt. Mit dieser Färbung war es überdies möglich, bei einer stärkeren Vergrößerung Melanosomen in den Melanozyten sichtbar zu machen (Abbildung 17).



Abb.17: Lichtmikroskopische Aufnahme auf Chamber Slides fixierter humaner Melanozyten, gefärbt mit MART-1. Ungefärbte Zellen sind Fibroblasten.

## Isolierung und Subkultivierung von primären mikrovaskulären Endothelzellen

Für eine Zellzahl von ca.  $1-2 \times 10^6$  wurden Zellen aus 3 Spendern gepoolt. Nach ca. 3 h adhärten die Zellen und bei Aussaat einer hohen Zelldichte, in der die Zellen vermehrt Zell/Zell-Kontakt hatten, konnte bereits nach 3 Tagen das typische „Kopfsteinpflaster“-Muster (Cobblestone) beobachtet werden (Abbildung 18 A). Die Primärkulturen waren unterschiedlich stark mit Bindegewebszellen kontaminiert. Durch verschiedene Separationsmethoden (5.3) ist eine Kontamination dieser Zellen verhindert worden.

Nach 4-tägiger Kultivierung der Endothelzellen in ECG-Medium wurden die Zellen morphologisch untersucht (Abbildung 18). Nach 7 Tagen Kultivierung in ECG-Medium hatten die Zellen eine charakteristische, pflastersteinartige Morphologie angenommen. Laut Literatur ergibt sich eine maximale Wachstumsdichte mit  $10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  [156]. Diese Morphologie ist in allen Kulturen bis zur 5. Passage gleich. Nach 6-8 Tagen Kultivierung konnte wie Abbildung 18 A und B zeigt eine Zunahme im Zellvolumen beobachtet werden. In der 2. Passage veränderte sich die Morphologie der Zellen von der pflastersteinartigen polygonalen zur spindelförmigen, länglichen Form (Abbildung 19 A und B). Es bildeten sich ringförmige oder auch polyedrische Strukturen heraus. Die Zellen der 3. Passage zeigen in Abbildung 19 B eine Vergrößerung ihres Zellvolumens. Diese Veränderung war nicht kontinuierlich bei allen Zellen der 3. Passage zu beobachten.

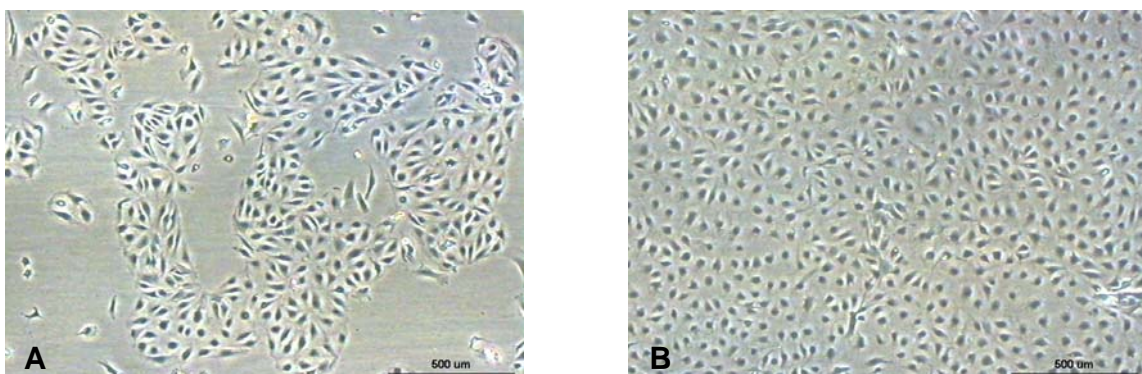


Abb.18: Phasenkontrastaufnahme einer Primärkultur von Endothelzellen: (A) Nach 3 Tagen Kultivierung (B) nach 7 Tagen Kultivierung.

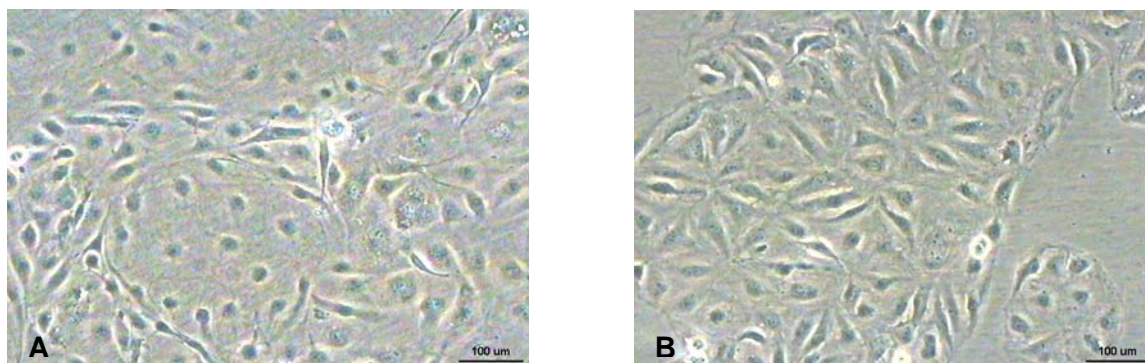


Abb.19: Phasenkontrastaufnahme von Endothelzellen: 2. Passage (A) und 3. Passage (B).

### Langzeitkultivierung der Endothelzellen

Veränderungen in der Morphologie der Zellen wurden nach Zugabe von Faktoren zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Als stimulierende Faktoren gilt die Kollagen-Typ-I Beschichtung in den Zellkulturflaschen, der Zusatz von VEGF ( $c = 10 \text{ ng/ml}$ ) und die Kombination von beiden Faktoren (Tabelle 16).

Tabelle 16: Kultivierungsbedingungen.

| Kult.-Bedingung | Kult.-Medium | Kult.-Zeitraum [d] | Beschichtung |
|-----------------|--------------|--------------------|--------------|
| 1               | ECG          | 2,7,30,60          | -            |
| 2               | ECG + VEGF   | 2,7,30,60          | -            |
| 3               | ECG          | 2,7,30,60          | Kollagen     |
| 4               | ECG + VEGF   | 2,7,30,60          | Kollagen     |

Die folgenden lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Zellen in der 2. Passage nach Kultivierung von 2 und 60 Tagen anhand der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.

➤ Kultivierungsbedingung 1:

In der Kontrolle zeigten die Zellen polygonale und vereinzelt spindelförmige Morphologie. Das typische Kopfsteinpflastermuster trat mit der Kultivierung von ECG-Medium auf (Abbildung 18).

➤ Kultivierungsbedingung 2:

Die Morphologie der Zellen zeigten längs gerichtete polygonale Strukturen. Die Zellen nahmen eine spindelförmige und in die Länge gezogene Form an und



bildeten lange Fortsätze aus (Abbildung 20 A). Eine 100-fache Vergrößerung zeigt die ringförmige Aneinanderheftung dieser Fortsätze (Abbildung 20 D).

➤ Kultivierungsbedingung 3:

Hier trat eine starke Ausbildung langer Fortsätze und spindelförmigen in die Länge gezogenen Strukturen auf (Abbildung 20 B und E).

➤ Kultivierungsbedingung 4:

Hier wurden keine morphologischen Unterschiede hinsichtlich der Kultivierungsbedingungen 2 und 3 beobachtet.

Charakteristisch traten nach 60 Tagen Kultivierung mit VEGF-Zusatz tubuläre Strukturen auf (Abbildung 20 C und F). Diese Beobachtung weist auf eine verstärkte Migration und Proliferation der Endothelzellen hin. Für die Integration der Endothelzellen in das Hautäquivalent wurde daher die Kultivierungsbedingung 2 ausgewählt.

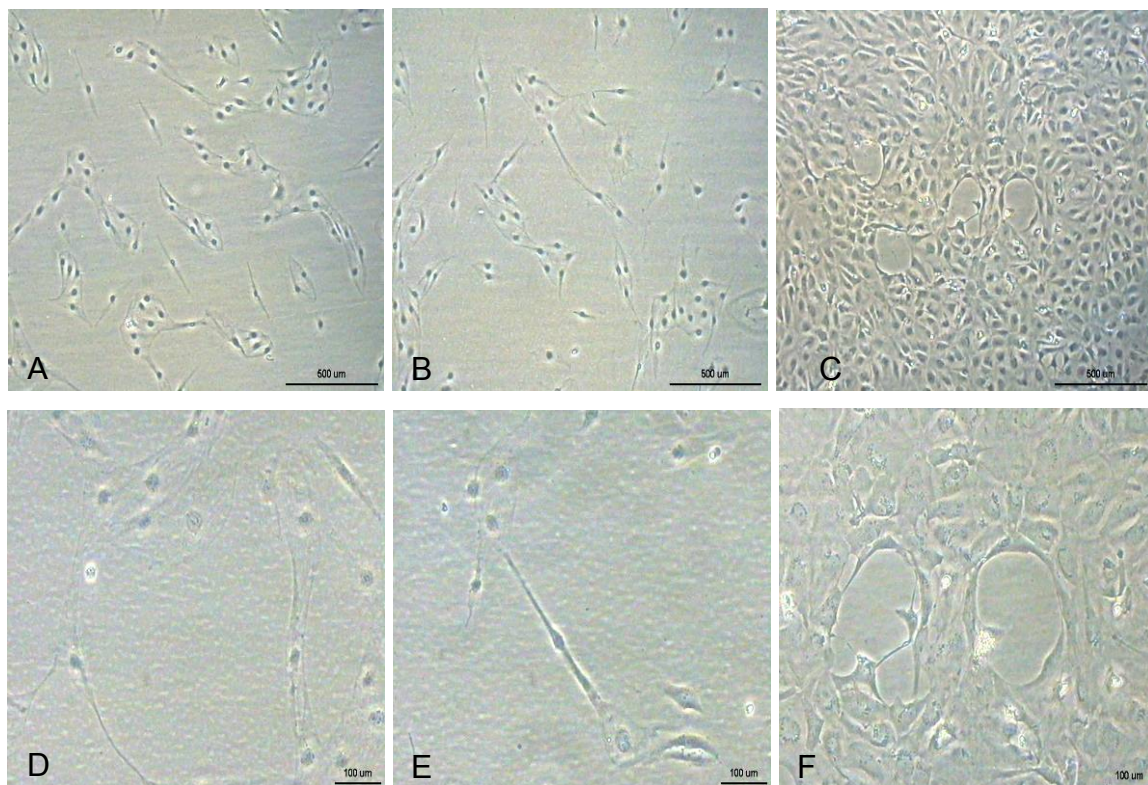


Abb.20: Endothelzellen in der 2. Passage nach 2 Tagen Kultivierungen. (A) Endothelzellen auf Kollagen beschichteten Zellkulturflaschen + ECG-Medium, (B) Endothelzellen + ECG-VEGF-Medium, (C) Endothelzellen + ECG-VEGF-Medium nach 60 Tagen, Abb F entspricht Abb. C in 100-facher Vergrößerung Abb. D entspricht Abb. A in 100-facher Vergrößerung, Abb. E entspricht Abb. B in 100-facher Vergrößerung.

## Immunhistologische Charakterisierung humaner mikrovaskulärer Endothelzellen

Zur Charakterisierung der Endothelzellen wurden die Zellen immunzytologisch vor dem Einsatz der Versuche mit den 3 Markern, vWF, CD 31 und CD 105 angefärbt. Die Abbildung 21 zeigen Endothelzell-Kulturen in Chamber Slides in der 1. und 5. Passage, die nach der immunologischen BSA-Detektionsmethode angefärbt wurden. Die Zellen zeigen bis zur 5. Passage die Ausbildung des vW-Faktors (Abbildung 21 A). Die Ausbildung des Oberflächenproteins CD 31 und der Proliferationsmarker CD 105 konnte bis zur 2. Passage nachgewiesen werden (Abbildung 22).

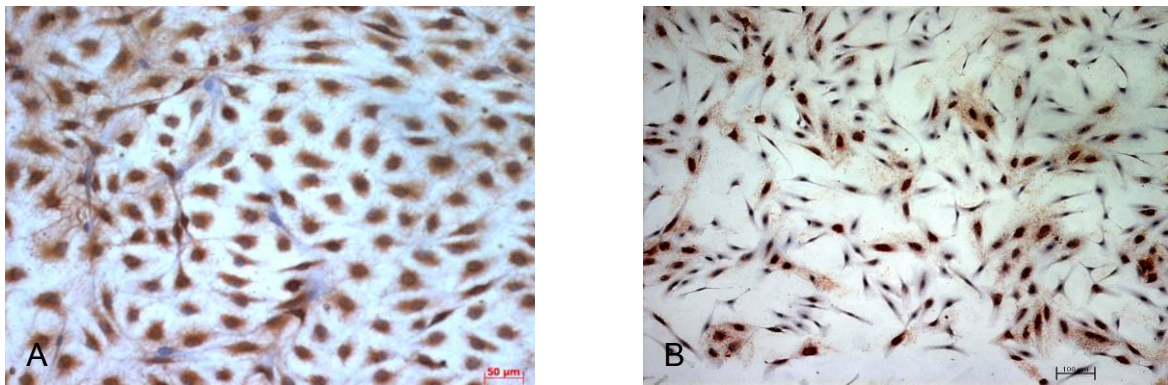


Abb.21: Immunzytologische Färbung mit vWF (A) Endothelzellen, 2. Passage; (B) Endothelzellen, 5. Passage.

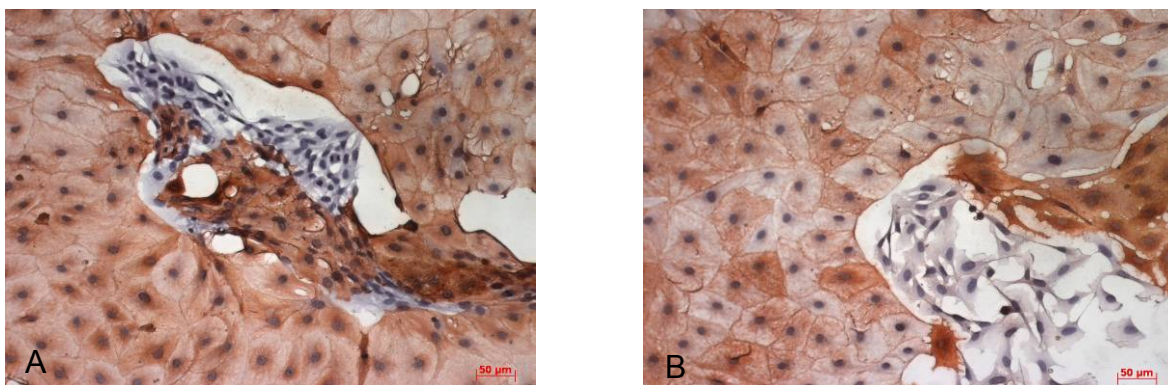


Abb.22: Immunhistologische Färbung; (A) Endothelzellen, 2. Passage CD 31; (B) Endothelzellen, 2. Passage CD105.

### 5.1.1.1 Mediumzusammensetzung

Die Zellen wurden wie unter 4.6.9 beschrieben ausgesät und jeden Tag gezählt. In den Medien „KBM-Medium“ und „Airlift-VEGF-Medium“ zeigten die Endothelzellen kein Wachstum. Sie lagen mit einer Zellzahl von  $9 \times 10^3$  Z/ml nach 8 Tagen

Kultivierung genauso hoch wie bei der Einsaat. Erwartungsgemäß zeigten die Zellen im ECGM + VEGF Medium eine deutliche exponentielle Wachstumsphase. Nach 8 Tagen Kultivierung war hier die Zellzahl bei  $1 \times 10^5$  Zellen. Die Zellzahl beim Einsatz des ECGM-Medium ohne VEGF-Zusatz lag nach 8 Tagen Kultivierung bei  $8 \times 10^4$  Z/ml (Abbildung 23).

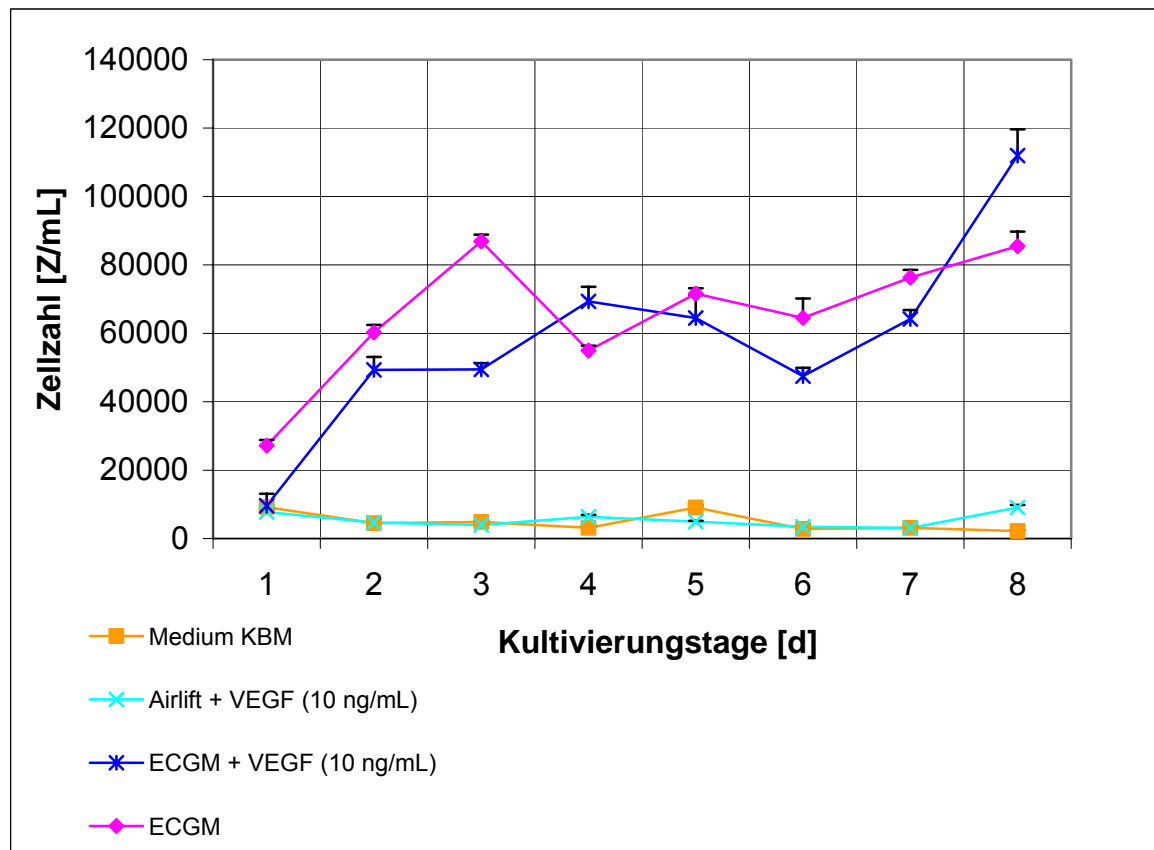


Abb. 23: Wachstumskurve von mikrovaskulären Endothelzellen in verschiedenen Medien.

## 5.2 Überlebensrate nach Kryokonservierung

Alle verwendeten Zelllinien ließen sich nach der in Abschnitt 4.6.3 beschriebenen Methode ohne Schwierigkeiten kryokonservieren. Nach 5-monatiger Lagerungszeit im Stickstofftank bei  $-196^{\circ}\text{C}$  wurde anhand je eines Aliquots die Überlebensrate nach dem Auftauen durch die Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung überprüft. In der folgenden Tabelle (Tabelle 17) sind die Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 17: Überlebensraten der Melanomzelllinien nach Kryokonservierung [Mittelwert  $\pm$  s].

| Zelllinie | Überlebensrate [%] |
|-----------|--------------------|
| SK-Mel-28 | 82,4 $\pm$ 2,78    |
| BLM       | 77,3 $\pm$ 8,79    |
| M 13      | 79,6 $\pm$ 6,32    |
| HEK 293   | 75,6 $\pm$ 4,85    |

Nach dem Auftauen konnten die konservierten Zellen problemlos in DMEM + 10% FCS + 1% Gentamycin kultiviert werden. Die Beobachtung der proliferierenden Kulturen im Phasenkontrastmikroskop ergab, dass morphologische Veränderungen nicht erkennbar waren. Auch Wachstumsverhalten und –geschwindigkeit unterschieden sich nicht von Vergleichszellen, die nicht kryokonserviert wurden.

### 5.3 Zellseparation zur Reinkulturgewinnung

Zur Vermeidung einer Kontamination mit Bindegewebszellen in der Primärkultur wurden unterschiedliche Methoden ausgetestet. Im Folgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Methoden beschrieben.

#### 5.3.1 Endothelzellen

Durch den Anteil an Serum (5% - 10% FCS) und den Wachstumsfaktoren (EGF, ECGS) im ECG-Medium konnte je nach Präparation ein geringes Wachstum an Fibroblasten morphologisch (Abbildung 24 A, B, D) nachgewiesen werden. Als Marker für die Endothelzellen diente der vW-Faktor (Abbildung 24 C).



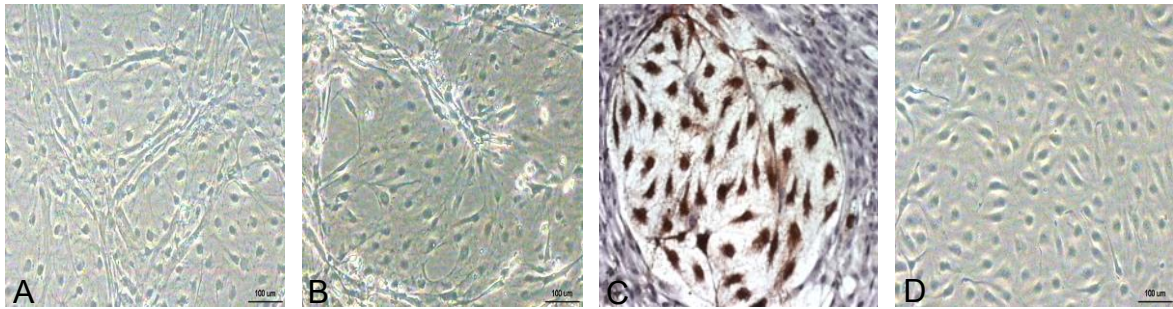


Abb.24: Phasenkontrastaufnahme Separation mit PBS<sup>-</sup>/EDTA-Lösung: (A) Endothelzellen mit Fibroblasten, (B) Inkubation mit PBS<sup>-</sup>/EDTA der Endothelzellen -Fibroblasten Kultur; (C) Immunhistologische Färbung, vWF; (D) Reine Endothelzellen -Kultur.

Ein erhöhtes Fibroblastenwachstum führte nach kurzer Kultivierungszeit zum Überwachsen der Endothelzell-Kultur (Abbildung 24 A). Zur Separation dieser teilweise heterogenen Zellpopulation wurden 2 Verfahren angewendet, die MACS-Methode (5.3.1.1) mit CD 105 Microbeads und die PBS<sup>-</sup>/EDTA-Separationsmethode (5.3.1.2).

#### 5.3.1.1 Immunseparationsmethode (MACS)

Durch diese Trennungsmethode ist die anschließende Weiterkultivierung der Zellen möglich. Die Methode hat aber eine Erhöhung der Passagenzahl der Endothelzellen zur Folge. Eine Verwendung der Zellen in der 2. Passage für die Integration in das Hautäquivalent ist dadurch nicht mehr möglich. Aus diesem Grund wurde die MACS-Separation nicht weiter verfolgt.

#### 5.3.1.2 Unterschiedliche Einwirkzeiten von PBS<sup>-</sup>/EDTA

Mit dieser Methode konnte die Hemmung des Fibroblastenwachstums und die Entfernung dieser Zellen durch Inkubation mit PBS<sup>-</sup>/EDTA – Lösung erreicht werden (4.6.5). Die Fibroblasten lösen sich nach kurzer Zeit ab, nicht aber die Endothelzellen (Abbildung 24 B). Die Reinheit der erhaltenen Endothelzell-Kulturen wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Durchflusszytometrische Analyse vor und nach der Separierung mit der PBS<sup>-</sup>/EDTA-Lösung.

Die Auswahl der Endothelzellpopulationen zeigten bei der Isotyp-Kontrolle (Abbildung 25) eine unspezifische Bindung im FL2-Height Bereich von 0 bis  $10^1$  (Abbildung 26 A und D) im Gegensatz zur FITC CD 105 spezifischen Bindung der Zellen vor und nach der Behandlung mit PBS<sup>-</sup>/EDTA im FL2-Height Bereich von  $10^1$  bis  $10^3$  (Abbildung 26 B und E). Die Ergebnisse der Isotypkontrolle und der



gemessenen Proben sind zusätzlich im Histogramm dargestellt (Abbildung 26 G, H, I). Im Bereich des Markers M1 gelten die detektierten Fluoreszenzsignale als positiv, was durch den grünen Peak im Bereich des Markers bei der Vermessung von unbehandelten und behandelten Zellen mit PBS<sup>-</sup>/EDTA dargestellt ist (Abbildung 26 H und I). Die Isotyp-Kontrolle innerhalb des Markers M1 ist negativ (Abbildung 26 G).

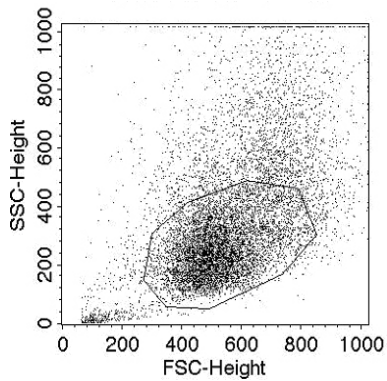


Abb.25: Density Plot (FSC/SSC) der Isotypkontrolle (IgG1-FITC), GATE ist die ausgewählte Hauptpopulation.

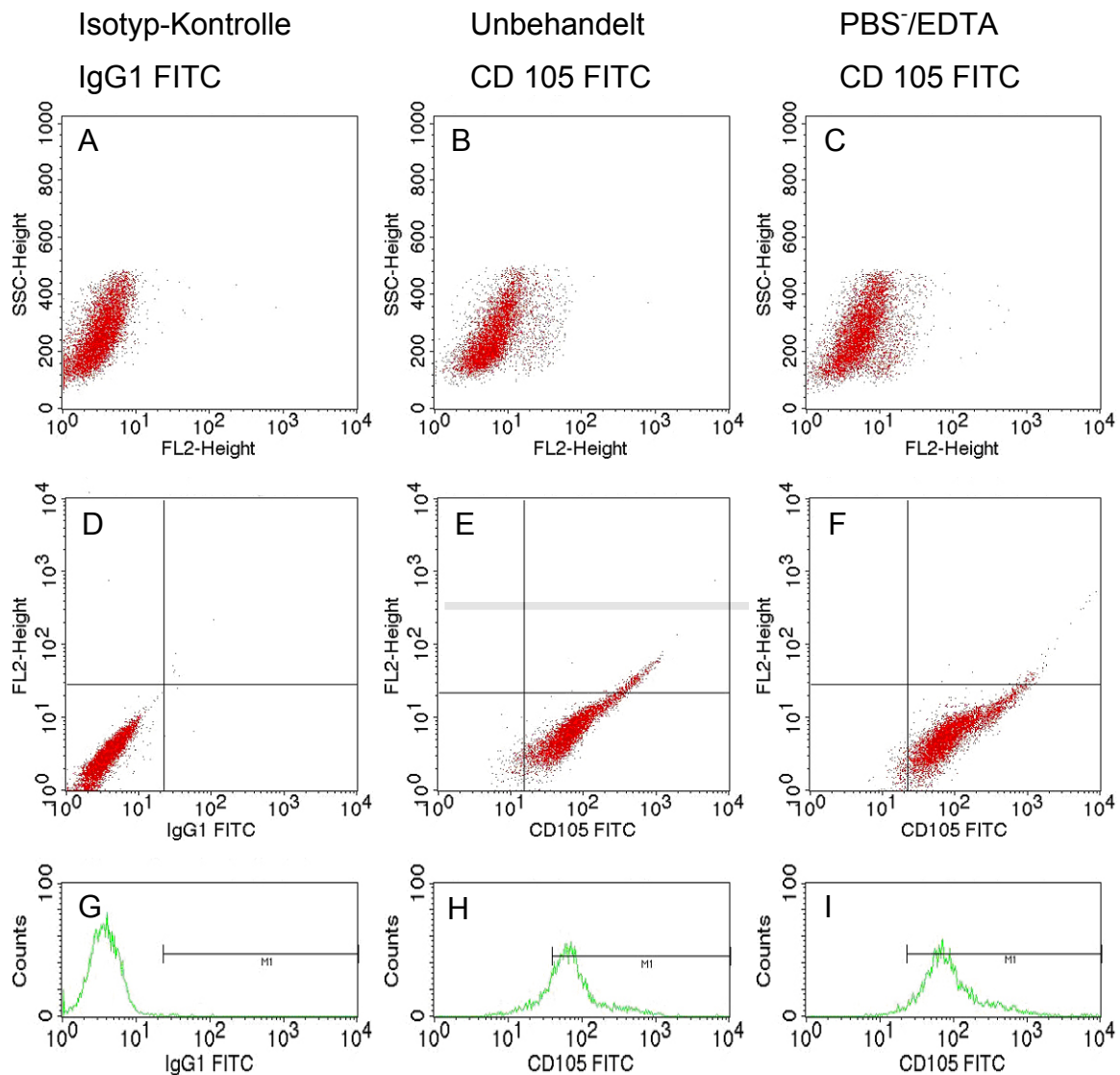


Abb.26: Durchflusszytometrische Analyse einer Endothelzellen – Fibroblasten - Mischkultur, gefärbt mit CD 105 (FITC gekoppelt).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Tabelle 18 dargestellt. Bei einer Endothelzellkultur ohne Behandlung mit PBS-/EDTA wurden von 5206 vermessenen Zellen, 77,14 % als CD 105 FITC-positive Zellen detektiert. Bei einer Endothelzellen-Kultur mit Behandlung von PBS-/EDTA wurden von 6563 vermessenen Zellen 97,09 % als CD 105 FITC-positive Zellen detektiert. Durch einen geringen Anteil an Fibroblasten kann nach 4 Tagen Kultivierung die Endothelzell-Kultur mit diesen Zellen durchwachsen sein und somit die Ausbildung der Endothelzell-Morphologie stören (Abbildung 24 A).

Tabelle 18: Ergebnisse der FACS-Messung.

| Antikörper             | Marker | Events | % ausgewählter Zellen | % Total |
|------------------------|--------|--------|-----------------------|---------|
| IgG1 FITC              | All    | 6946   | 100,00                | 69,46   |
| Isotyp-Kontrolle       | M1     | 2      | 0,03                  | 0,02    |
| CD105 FITC             | All    | 6492   | 100,00                | 64,92   |
| Unbehandelt            | M1     | 5206   | 77,14                 | 52,06   |
| CD105 FITC             | All    | 6760   | 100,00                | 67,60   |
| PBS <sup>-</sup> /EDTA | M1     | 6563   | 97,09                 | 65,63   |

Aufgrund der positiven Detektion von 97,09 % CD105 FITC-positiven Zellen nach Separation mit PBS<sup>-</sup>/EDTA wurde diese Separationsmethode beim Auftreten des Fibroblastenwachstums angewendet.

### 5.3.2 Melanozyten

Das vollständige Entfernen von FCS in der Melanozyten Kultivierung konnte das Fibroblastenwachstum nicht verhindern. Daher wurden weitere Methoden zur Entfernung von Fibroblasten getestet.

#### 5.3.2.1 Zugabe von Geneticin

Aus der Literatur ist bekannt, dass Geneticin das Wachstum von Fibroblasten unterdrückt [66]. Daraufhin wurde versucht mittels 25 µg/ml Geneticin das Wachstum der Bindegewebszellen zu hemmen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Kulturen, die mit Geneticin behandelt wurden zu denjenigen ohne Geneticin Zusatz zum Medium.

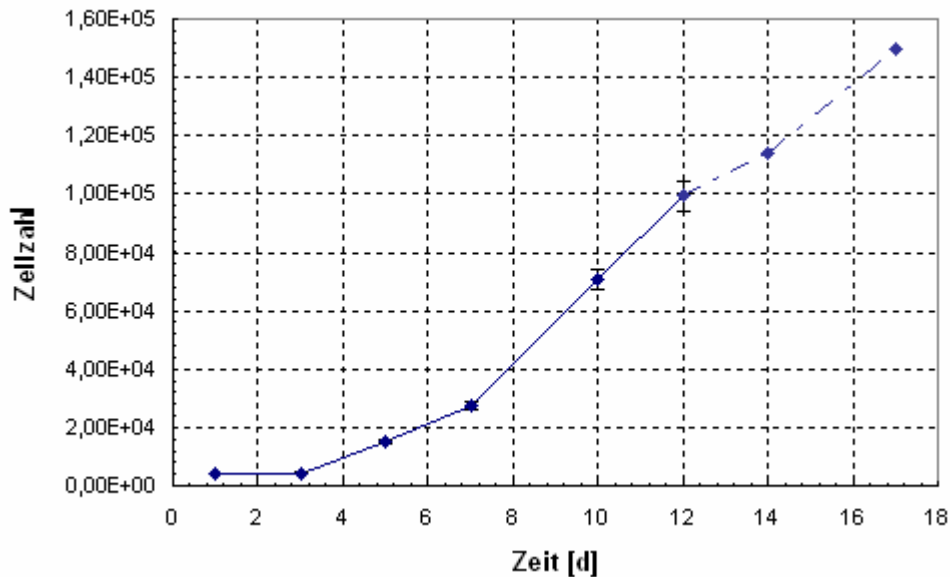


Abb. 27: Wachstumskurve primärer humaner Melanozyten; ab dem 12. Tag wurde ein Fibroblastenwachstum (----) mikroskopisch festgestellt, was schließlich zum Überwachsen der Melanozyten führte.

### 5.3.2.2 Unterschiede in der Einwirkungszeit von Trypsin

Zum Separieren von Fibroblasten und Melanozyten erwies sich diese Methode als nicht geeignet. Die Fibroblasten wurden mit in die nächste Passage der Melanozytenkultur verschleppt, was zu einem erneuten Fibroblastenwachstum führte.

### 5.3.2.3 Immunomagnetische Separationsmethode (MACS)

Beim Einsatz der MACS-Säule konnten Fibroblasten erfolgreich aus Melanozytenkulturen entfernt werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunomagnetischen Separationsmethode dargestellt:

Die nachstehenden Abbildungen 28 zeigen Phasenkontrastaufnahmen einer Melanozytenkultur vor und nach MACS Separation.

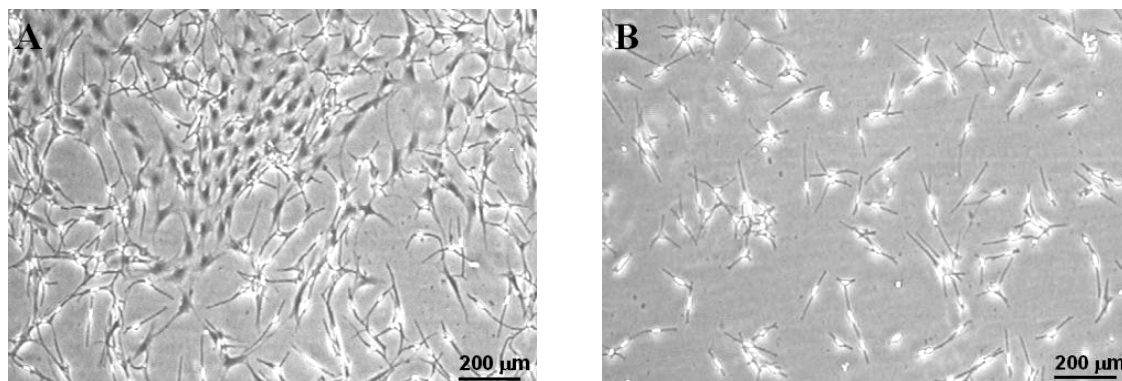


Abb.28: Phasenkontrastaufnahme einer Melanozytenkultur vor (A) und nach (B) MACS-Anwendung.

Notwendig bei der Anwendung von MACS war eine ausreichende Ausgangszellzahl von mind.  $1 \times 10^6$  Zellen der Mischkultur, da sonst eine zu geringe Ausbeute der Melanozyten erreicht wurde. Die Effizienz der MACS-Säule, wurde anschließend durch eine FACS-Analyse nachgewiesen. Abbildung 30 zeigen die durchflusszytometrische Analyse von Melanozyten vor und nach der MACS-Anwendung.

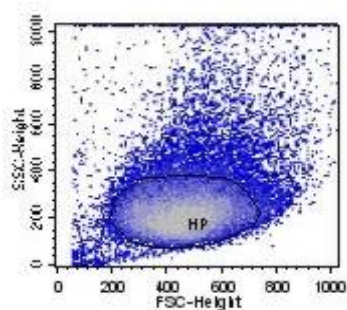


Abb.29: Density Plot (FSC/SSC) der Isotypkontrolle (IgG1-FITC), HP ist die gatede Hautpopulation.

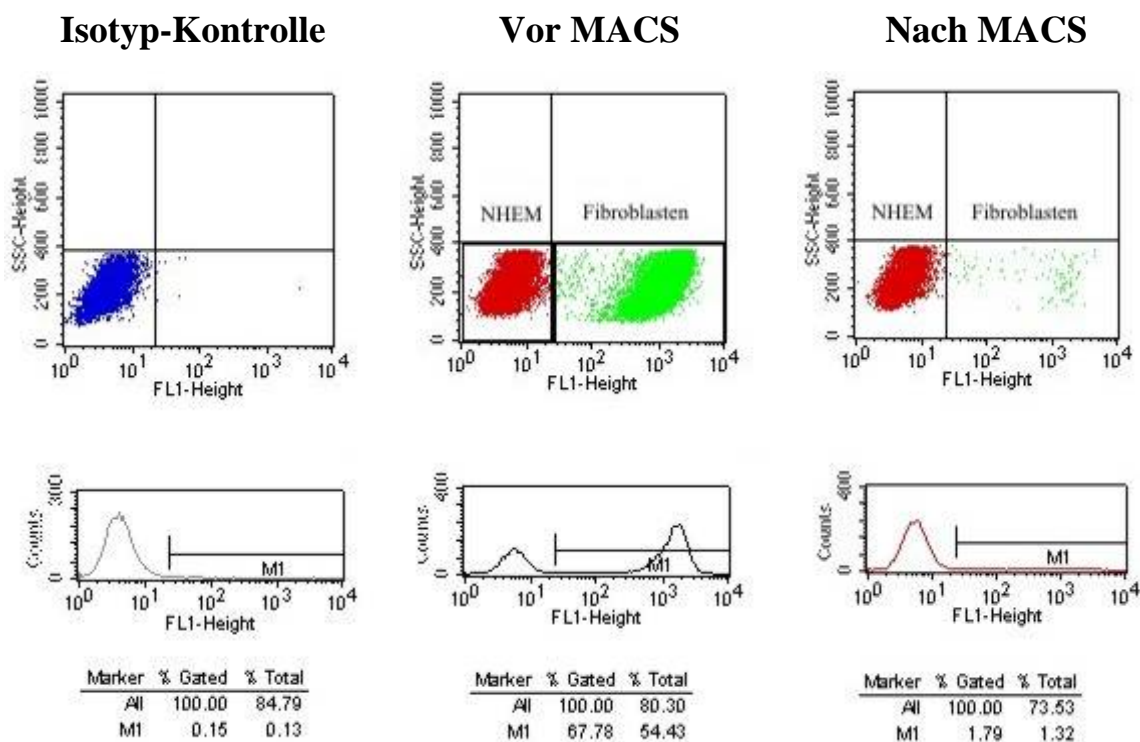


Abb.30: Durchflusszytometrische Analyse einer Melanozyten-Fibroblasten-Mischkultur, gefärbt mit einem Anti-Fibroblasten-AK (FITC-gekoppelt).

Der durchflusszytometrische Nachweis zeigte, dass nach der Separation durch MACS der Anteil der Fibroblasten in der Melanozytenkultur nur noch bei 1,8 % lag. Mittels MACS konnte in der folgenden Kultivierungszeit ein Überwachsen der Melanozyten mit Fibroblasten verhindert werden. Bei ca. 60 % der durch MACS aufgereinigten Melanozytenkulturen konnte eine hoch reine Kultur erhalten werden. Bei den restlichen Fällen kam es nach der MACS-Anwendung zu einem erneuten Fibroblastenwachstum. Durch wiederholte MACS-Aufreinigung konnte diese erneute Kontamination mit Fibroblasten verhindert werden. Um Unterschiede zwischen Melanozyten und Fibroblasten im FCS/SSC festzustellen, wurden die Fibroblasten (aus der Abbildung „Vor MACS“) nochmals aussortiert. Sie zeigten jedoch bezüglich Größe und Granularität die gleichen Eigenschaften wie Melanozyten.

## 5.4 Plasmidpräparationen

Für die Plasmidpräparation findet das Programm „Clone Manager“ Anwendung. Hierbei werden die Sequenzen in das Programm kopiert und geeignete Restriktionsenzyme für den Kontrollverdau herausgesucht (Plasmidkarten siehe 4.2). Geeignet klassifizierte Enzyme schneiden im Vektor oder im Insert das Plasmid jeweils nur einmal und zeigen gut unterscheidbare Fragmentgrößen im Agarose-Gel. Jedes Plasmid wurde mit 2 Restriktionsenzymen verdaut. Für das Plasmid pRK5-HER-mrk (8405 bp) fiel die Wahl auf die Enzyme XbaI und EcoRV, für pRK5-Xmrk-ATP (8299 bp) auf XbaI und BsrGI. Für das Plasmid pSP64-erbB stand keine komplette Sequenz zur Verfügung, von der Arbeitsgruppe Prof. Scharl (Würzburg) ist die Größe des Inserts mit 560 bp (kloniert mit Aval und Sall) angegeben worden. Dieses Plasmid kann mit EcoRI linearsiert werden, Schnittstellen und Fragmentgrößen sind in der nachfolgenden Tabelle 19 aufgeführt.

*Tabelle 19: Schnittstellen der Enzyme zur Kontrolle.*

| Plasmid       | Enzyme      | Schnittstellen | Fragmentgrößen |
|---------------|-------------|----------------|----------------|
| pRK5-HER-mrk  | XbaI/ EcoRV | 942/ 4300      | 5047/ 3358     |
| pRK5-Xmrk-ATP | XbaI/ BsrGI | 938/ 4463      | 4774/ 3525     |
| pSP64-erbB    | AvaI/ Sall  | —              | 3000/ 560      |

Zuerst wurden Mini-Präparationen mit den aus Würzburg gesendeten Plasmid-DNA „Originalen“ mit anschließendem Kontrollverdau durchgeführt. Zur Gewinnung größerer Mengen endotoxinfreier Plasmid-DNA wurde später der QUIAGEN „Endofree“ (Maxi Prep) eingesetzt (siehe 5.2.2). Der Kontrollverdau erfolgte jeweils mit den oben genannten Restriktionsenzymen und lieferte die erwarteten Ergebnisse. Die aus dem Agarose-Gel ermittelten Fragmentgrößen der Plasmide pRK5-HER-mrk, pSP64-erb und RK5-Xmrk-ATP zeigten die gleichen Längen wie jene aus dem Programm „Clone Manager“ (Abbildung 31). Damit wurden die Plasmid-Präparationen als erfolgreich beurteilt.

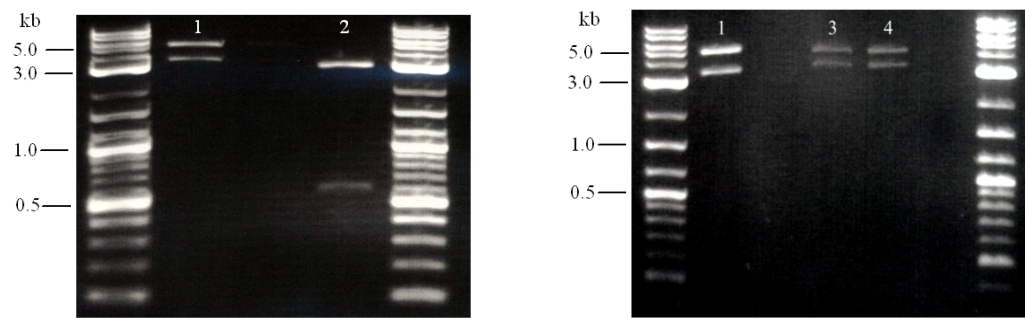


Abb.31: Kontrollverdau der Plasmide pRK5-HER-mrk (1), pSP64-erbB (2) und RK5-Xmrk-ATP (3+4).

Zusätzlich wurden noch Linearisierungen mit jeweils einem Restriktionsenzym zur Bestätigung der Plasmidgröße durchgeführt.

Beim Kontrollverdau des Plasmid pEGFP-N1 sind sowohl eine Linearisierung mit *StuI* (4,7 kb) als auch ein Verdau mit *SnaBI* und *PvuII* durchgeführt worden. Die Fragmentgrößen für den Verdau mit *SnaBI* und *PvuII* sollten 2210, 1913 und 620 bp betragen, was aber auf dem Agarose Gel nicht eindeutig zu erkennen war (Abbildung 32). Deshalb sollten zusätzlich zur Überprüfung der Funktionalität des pEGFP-N1-Plasmids eine bekannt transfizierbare Zelllinie HEK 293 mittels Lipofectamine 2000 transfiziert und das Ergebnis im Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

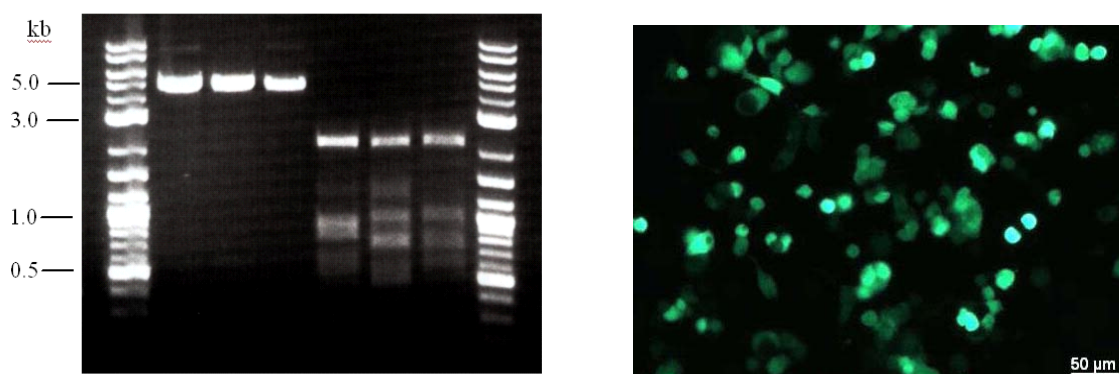


Abb. 32: Links: Kontrollverdau des Plasmid pEGFP-N1 (3-fach Ansatz, links die Linearisierungen mit *StuI*. Rechts der Verdau mit *SnaBI* und *PvuII*). Rechts: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HEK 293 Zellen, mittels Lipofectamine 2000 mit pEGFP-N1 transfiziert.



Die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung von pEGFP-N1 transfizierten HEK 293 Zellen lieferte ein eindeutig positives Ergebnis, damit konnte die pEGFP-N1 DNA-Präparation für die folgenden Versuche verwendet werden.

## 5.5 Transfektion

Für den Vergleich der Reagenzien bzw. Methoden kamen jeweils Zellen des gleichen Spenders in der gleichen Passage zum Einsatz. Zur Etablierung einer geeigneten Transfektionsmethode wurde das Plasmid pEGFP-N1 auf die effektivste Methode hin überprüft. Hierfür sind 3 Transfektionsreagenzien auf Liposomenbasis und jeweils 2 verschiedene DNA-Konzentrationen 2 µg und 4 µg sowie endotoxinfreie- bzw. endotoxinhaltige DNA getestet worden. Folgende 2 Methoden kamen zum Einsatz:

- Liposomale Transfektion
- Nucleofektion

Anschließend wurden die von der Arbeitsgruppe Prof. Scharfl überlassenen Konstrukte pRK5-HER-mrk, pRK5-Xmrk-ATP und pSP64-erbB anhand ihrer Plasmidkarten überprüft und mit der zuvor etablierten Methode transfiziert.

### 5.5.1 Liposomale Transfektionen mit pEGFP-N1

Die Transfektionen erfolgten wie unter 4.2.1 beschrieben und wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse ausgewertet. Die FACS-Einstellungen sind jeweils mit nicht transfizierten Zellen durchgeführt und die Zellen auf die Hauptpopulation aussortiert worden. Die untenstehenden Abbildungen zeigen eine repräsentative Analyse der 3-fachen Bestimmung. Für die Untersuchungen konnten bei DNA-Konzentrationen von 2 µg Plasmid - DNA mit Lipofectamine 2000 24 h nach Transfektion  $1,9 \pm 1,7$  %, mit FuGene  $2,0 \pm 0,8$  % und mit Metafectene  $0,5 \pm 0,2$  % Transgenexpression erreicht (Abbildung 33) werden. Die Unterschiede in der Transgenexpression nach 24 h unter Verwendung von Lipofectamine 2000 und FuGene 6 waren beim Einsatz von 2 µg Plasmid-DNA sehr gering (Abbildung 33).

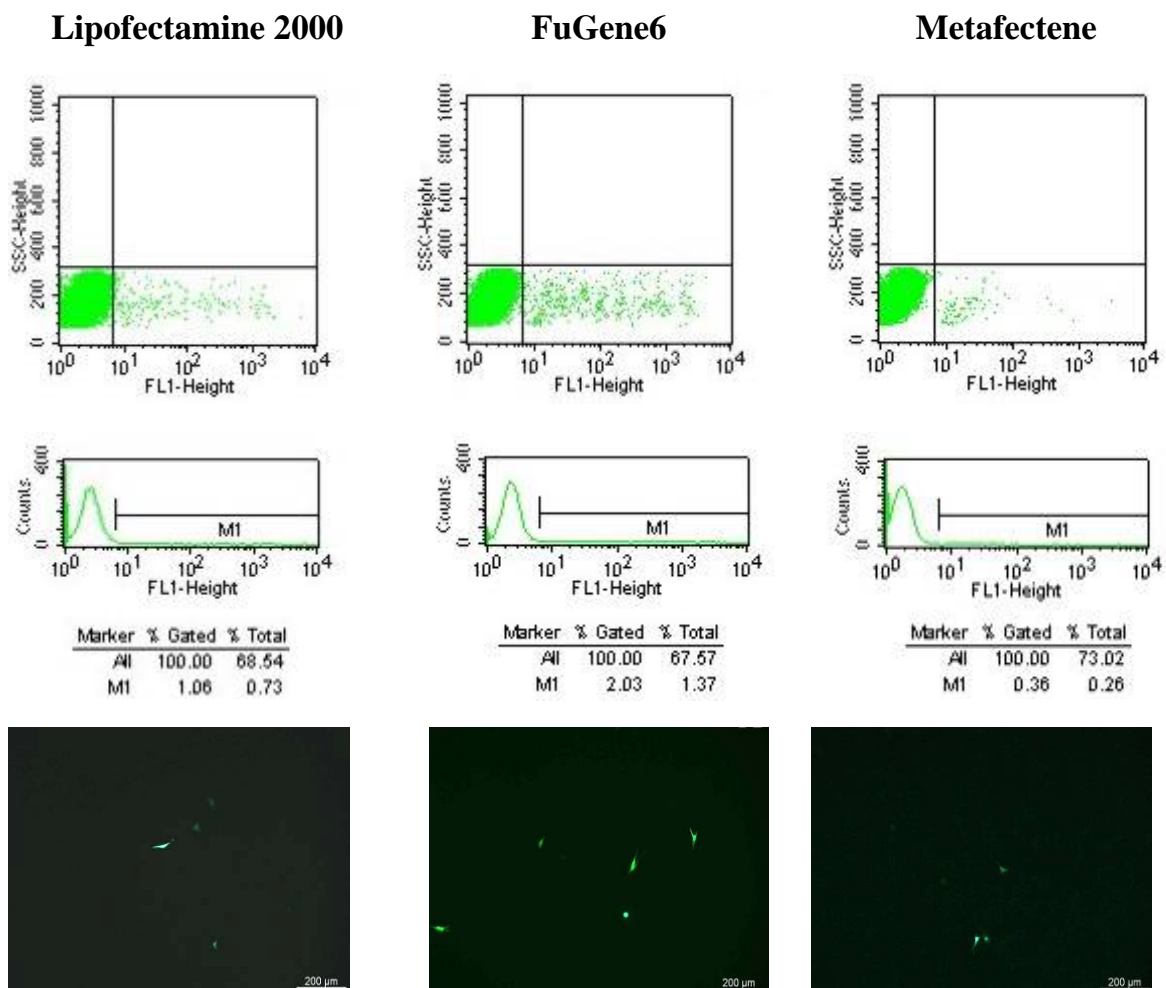


Abb.33: Durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis 24 h nach Transfektion primärer humaner Melanozyten (5. Passage) mit 2 µg pEGFP-N1 und 3 verschiedenen Transfektionsreagenzien auf Liposomenbasis.

Mit FuGene 6 ist eine Transgenexpression von  $1,7 \pm 0,9$  %, mit Lipofectamine 2000  $6,5 \pm 5,0$  % und mit Metafectene  $0,8 \pm 0,2$  % erreicht worden. Bei einer Menge von 4 µg Plasmid - DNA konnte mit Lipofectamine 2000 ein Höchstwert von 8,6 % Transgenexpression erreicht werden. Metafectene wurde aufgrund der niedrigen Expressionen nicht weiter getestet.

Folgende Tabelle 20 gibt eine Übersicht über die erzielten Versuche der Transfektionsexpression.

Tabelle 20: Zusammenfassung der Transfektionsexpression.

|  | <b>FuGene 6</b> | <b>Lipofectamine 2000</b> | <b>Metafectene</b> |
|--|-----------------|---------------------------|--------------------|
| Transfektionsexpression bei Einsatz von 2 µg Plasmid-DNA | 2,0 ± 0,8 %     | 1,9 ± 1,7 %               | 0,5 ± 0,2 %        |
| Transfektionsexpression bei Einsatz von 4 µg Plasmid-DNA | 1,7 ± 0,9 %     | 6,5 ± 5,0 %               | 0,8 ± 0,2 %        |

In der folgenden Abbildung 34 sind die Werte schematisch aufgetragen.

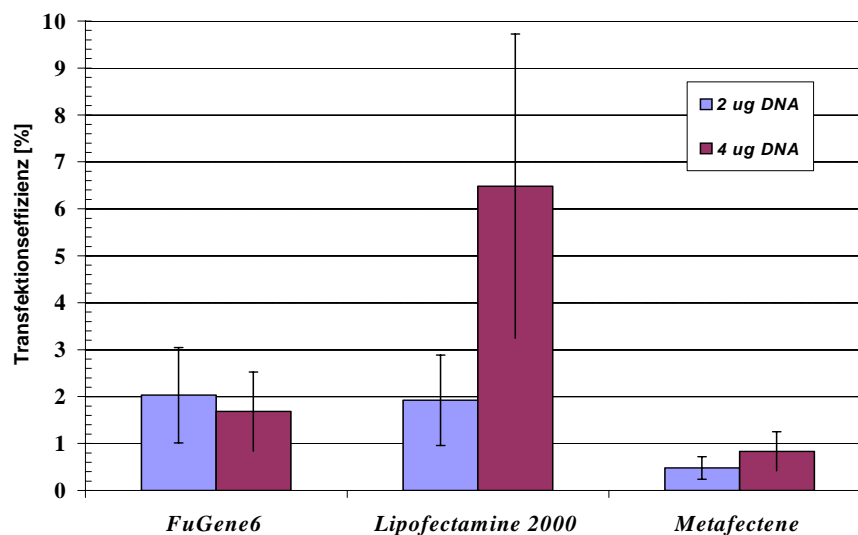


Abb.34: Transfektionseffizienzen der mit pEGFP-N1 transfizierten Melanozyten nach 24 h mit Ansätzen 2 verschiedener DNA-Konzentrationen und 3 verschiedene Reagenzien auf Liposomenbasis.

Die Unterschiede in der Transfektionseffizienz bei Transfektion endotoxinfreier bzw. endotoxinhaltiger Plasmid-DNA sind mit den Reagenzien Lipofectamine 2000 und FuGene 6 untersucht worden. Dreifach Bestimmungen mit jeweils 4 µg DNA zeigen keine signifikanten Unterschiede der Transfektionseffizienz nach 24 h zwischen endotoxinfreier und endotoxinhaltiger DNA.

Mit Lipofectamine 2000 und einer Plasmid-Konzentration von 4 µg DNA konnte die höchste Transfektionseffizienz nach 24 h erzielt werden (Abbildung 34). Daher kam für weitere Experimente eine Plasmid Konzentration von 4 µg DNA und die

Liposomale Methode zum Einsatz. Zusätzlich zur Transfektionseffizienz ist noch die Kinetik der Expression bestimmt worden. Hierfür sind Melanozyten mit pEGFP-N1 transfiziert und die Transgenexpression nach 24, 48 und 72 h durchflusszytometrisch bestimmt worden. Innerhalb von 72 h veränderte sich die Transgenexpression minimal und lag bei  $5 \pm 1$  %. Daran anschließend konnte die Kinetik auf 10 Tage ausgedehnt werden (Abbildung 35).

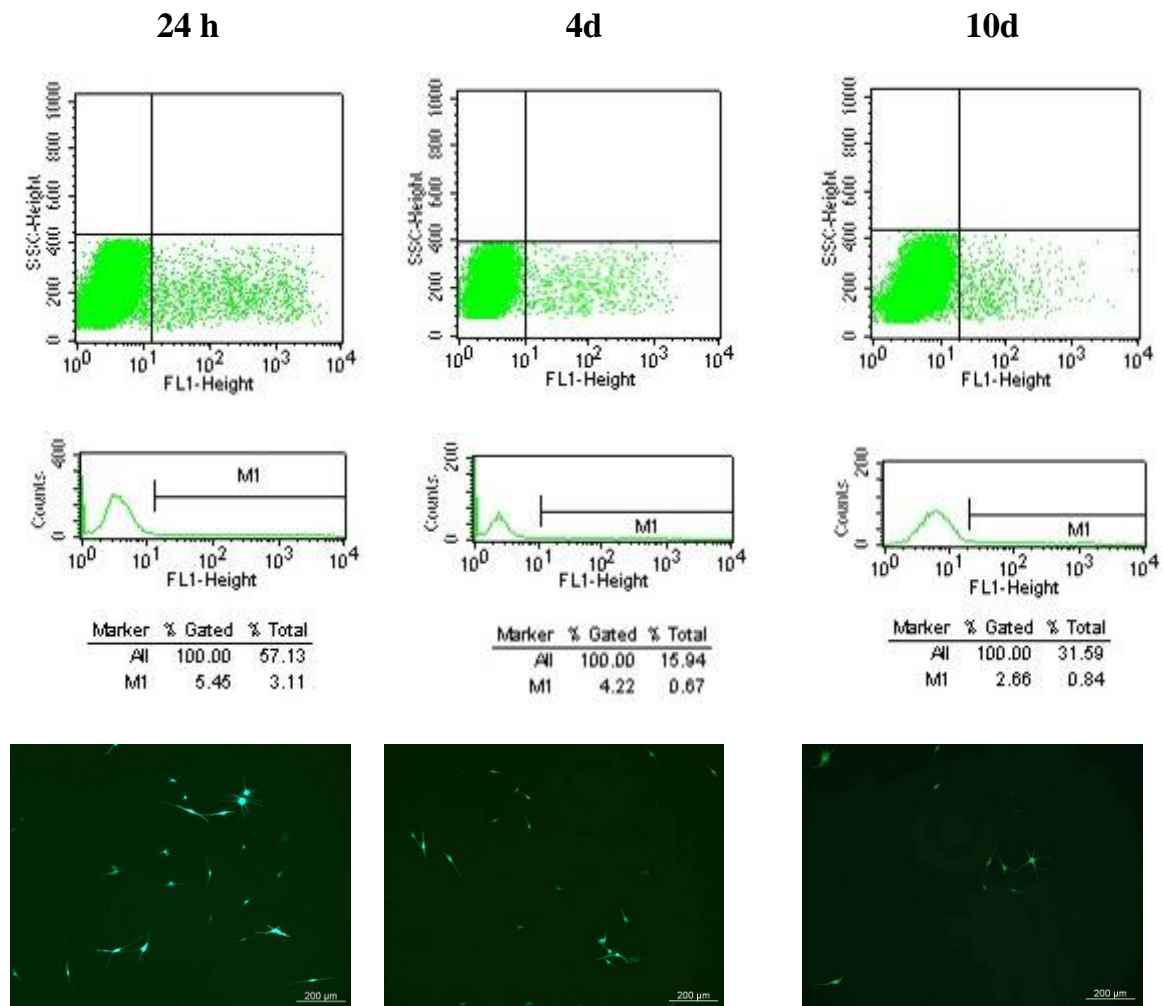


Abb.35: Durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der pEGFP-N1 Transgenexpression primärer humaner Melanozyten nach verschiedenen Zeitpunkten. Verwendet wurden 4  $\mu$ g Plasmid-DNA und Lipofectamine 2000.

In den ersten 4 Tagen veränderte sich die Transgenexpression nur gering und lag mit 5,5 % bei 24 h und mit 4,2 % bei 4 Tagen im Schwankungsbereich. Nach 10 Tagen war die Transgenexpression bezüglich des Anfangswertes auf die Hälfte (2,7 %) gesunken (Abbildung 35). Bei allen Transfektionen waren die Zellen nach lichtmikroskopischer Beurteilung im Vergleich zum Wildtyp nach der Transfektion

erheblich geschädigt. Die Zellen sind teilweise nicht mehr adhären und kugelten sich ab. Auch die morphologisch typische „Starlet“-Form der Melanozyten war nicht mehr eindeutig zu erkennen. Ebenso zeigten sich viele Zelltrümmer. Zudem löste sich nach der Transfektion ein Teil der Zellen ab und wurde beim Mediumwechsel mit abgesaugt. Vor jeder FACS-Analyse ist eine Zellzählung durchgeführt worden. Bei den transfizierten Zellen konnte ein geringeres Zellwachstum als beim Wildtyp festgestellt werden. Zusätzlich wurde eine Aussage über die Vitalität der Zellen mittels FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurde Propidiumjodid zum Rest der Zellsuspension gegeben und mittels durchflusszytometrischer Analysen der Anteil an toten Zellen durch die Rot-Fluoreszenz (FL-2) bestimmt.

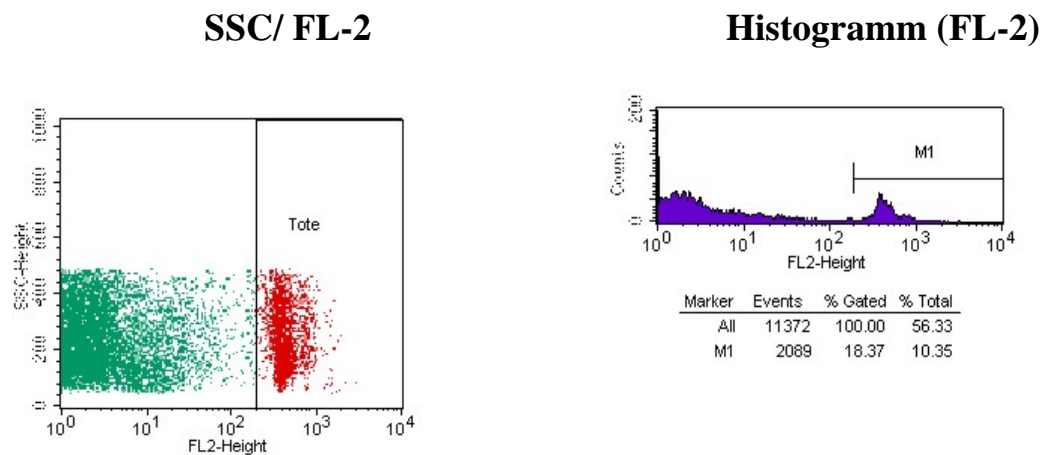


Abb.36: Durchflusszytometrische Analyse mit PI-Färbung zur Bestimmung des Anteils an toten Zellen der pEGFP-N1 transfizierten Melanozyten 4d nach Transfektion.

Der Anteil toter Zellen lag bei der Liposomalen Methode zwischen 16 und 26 % (Abbildung 36).

### 5.5.2 Transfektion mit pEGFP-N1 durch Nukleofektion

Zunächst wurden die Plasmid - DNA Konzentrationen variiert und das nach Herstellerangaben (Fa. Amaxa) empfohlene Programm U-20 für primäre Melanozyten am Nukleofektor eingestellt.

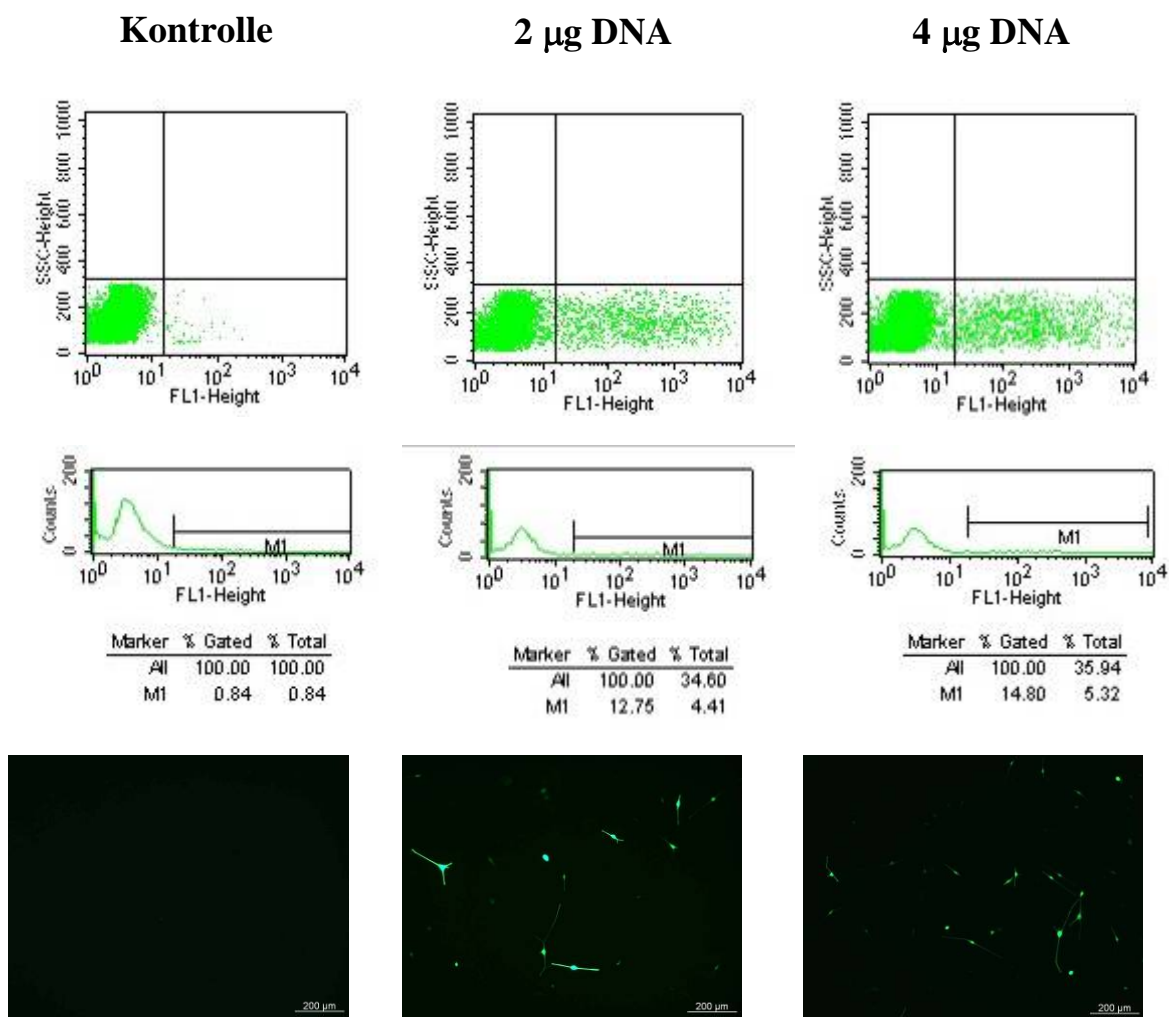


Abb.37: Durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Nukleofektion (Programm U-20) primärer humaner Melanozyten mittels 2 bzw. 4  $\mu$ g Plasmid-DNA (p-EGFP-N1).

Die durchflusszytometrische bzw. fluoreszenzmikroskopische Analyse der pEGFP transfizierten Melanozyten zeigte beim Einsatz von 4  $\mu$ g Plasmid-DNA (14,8 %) gegenüber 2  $\mu$ g Plasmid-DNA (12,8 %) wie auch schon bei der liposomalen Transfektion eine höhere Transfektionseffizienz nach 24 h. Aufgrund der höheren Transfektionseffizienz kam für weitere Versuche jeweils 4  $\mu$ g Plasmid-DNA pEGFP-N1 zum Einsatz.

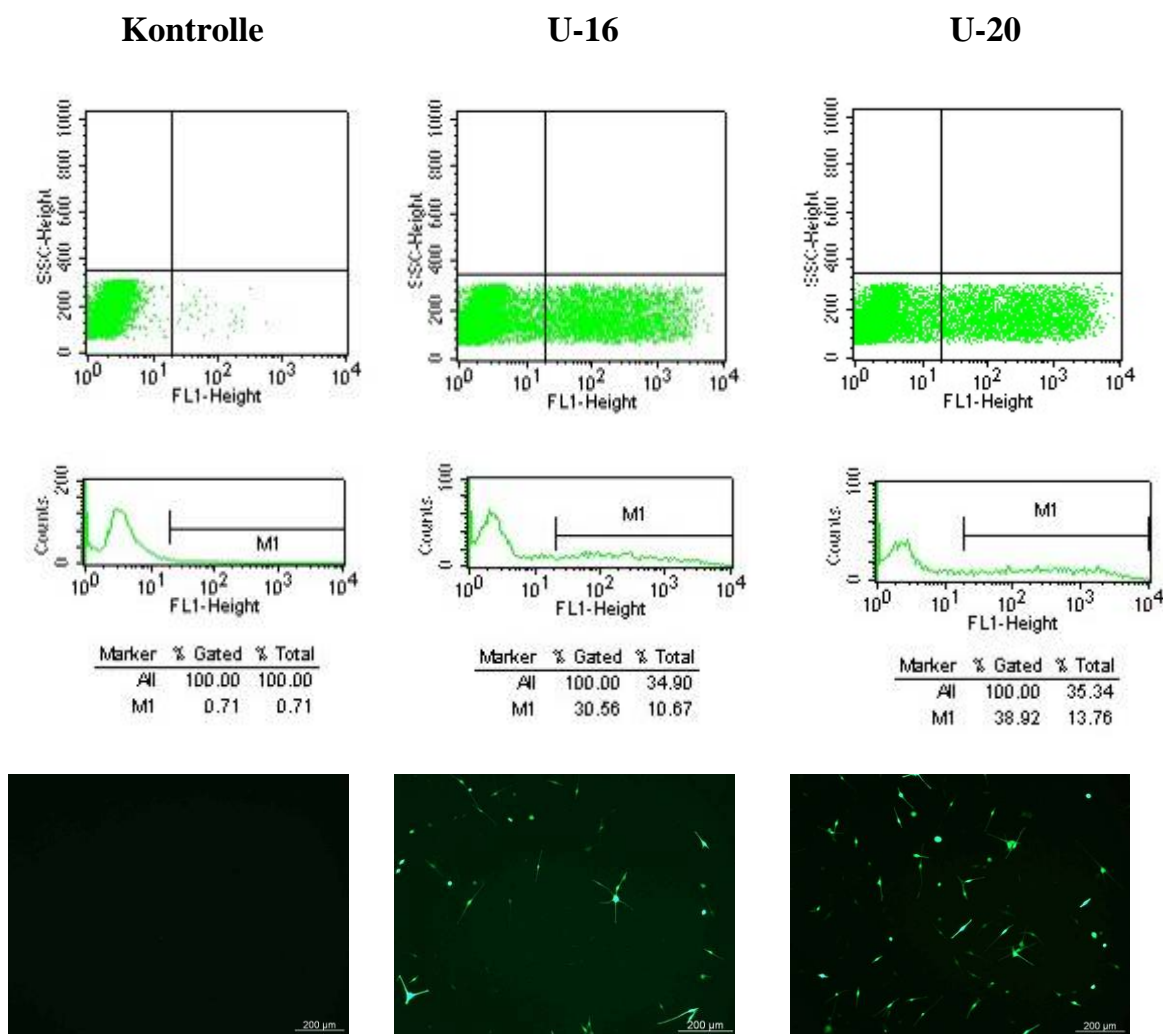


Abb.38: Durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Nukleofektion primärer humaner Melanozyten mit Programm U-16 bzw. U-20 und 4 µg Plasmid-DNA (p-EGFP-N1).

Das speziell für isolierte Melanozyten entwickelte Programm U-16 ist dem herkömmlichen Programm U-20 verglichen worden. Es konnte mit dem Programm U-16 nach 24 Stunden eine Effizienz von 30,6 %, mit U-20 38,9 % Transfektionseffizienz erreicht werden (Abbildung 38).

### 5.5.2.1 Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse

Für die Transfektion der primären Melanozyten sind folgende Versuchsbedingungen als am besten erachtet worden (Tabelle 21):

Tabelle 21: Zusammenfassung der besten Transfektionsmethoden.

| <b>liposomale Transfektion</b> | <b>Nucleofektion</b>        |
|--------------------------------|-----------------------------|
| 4 µg Plasmid – DNA pEGFP-N1    | 4 µg Plasmid – DNA pEGFP-N1 |
| Lipofectamine 2000             | Programm: U - 20            |
| 24 h nach Transfektion         | 24 h nach Transfektion      |

### **5.5.3 Transfektion mit pRK5-HER-mrk**

In den FACS-Analysen mit pRK5-HER-mrk transfizierten Melanozyten konnte gezeigt werden, dass der EGF-Rezeptor von transfizierten Zellen mittels des Antikörpers EGFR1 durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus zeigten die Wildtyp-Zellen mit EGF stimuliert und nicht stimuliert erwartungsgemäß nach Färbung mit FITC-gekoppeltem EGFR-AK keine Fluoreszenz.

Anschließend wurden die Melanozyten mit den zuvor ermittelten Bedingungen jeweils einmal liposomal bzw. durch den Nucleofektor transfiziert. Überprüft wurde die Vergleichbarkeit mit pEGFP. Für die liposomale Transfektion wurden 4 µg DNA eingesetzt und Lipofectamine 2000 verwendet, am Nucleofektor wurde das Programm U-20 eingestellt und ebenfalls 4 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Analysen erfolgten hierbei in 3-facher Bestimmung. Für die liposomale Transfektion wurde eine Transfektionseffizienz von  $2,8 \pm 0,8$  % nach 24 h erreicht, für die Transfektion mittels Nucleofektor  $18,9 \pm 2,5$  %.



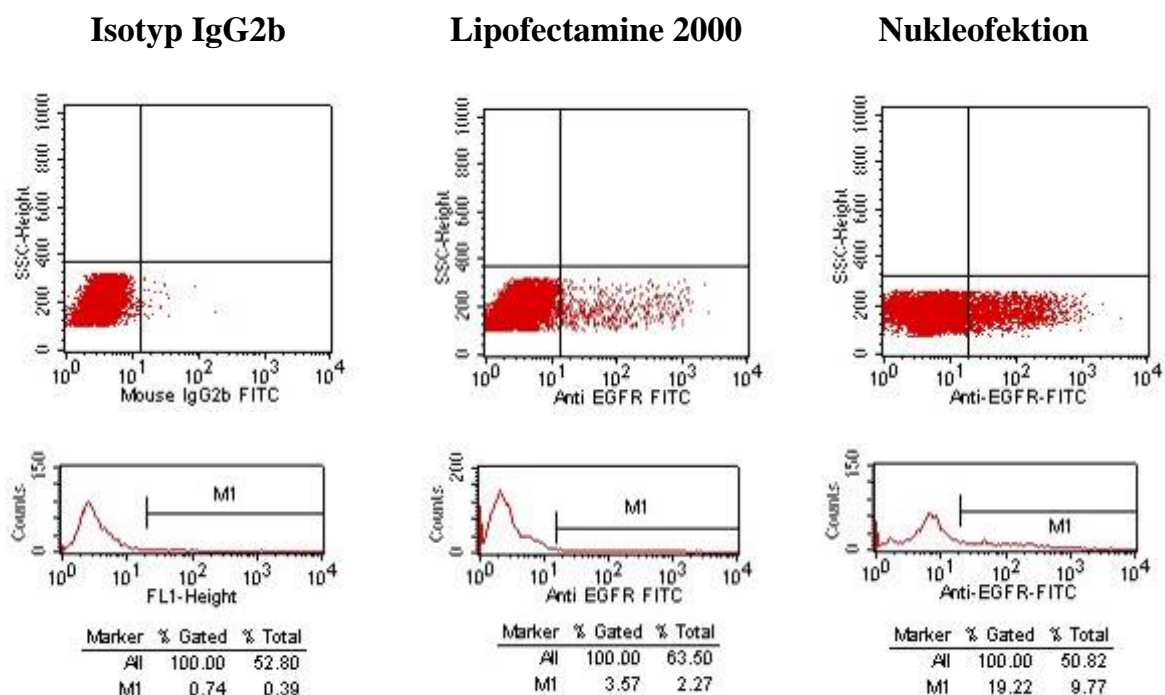


Abb.39: Durchflusszytometrischer Nachweis der pRK5-HER-mrk Transgenexpression primärer humaner Melanozyten nach 24 h. Verwendet wurden 4  $\mu$ g Plasmid-DNA und Lipofectamine 2000 bzw. Nukleofektion mit Programm U-20 und 4  $\mu$ g Plasmid-DNA.

Abbildung 39 zeigt die Ergebnisse der Analysen mit den höchsten Transfektionseffizienzen nach 24 h. Die Transgenexpressionen nach 24 h von pRK5-HER-mrk transfizierten Zellen mittels Lipofektion (3,6 %) und Nukleofektion (19,2 %) korrelierten mit den zuvor erhaltenen EGFP-Werten. Zusammengefasst sind die Ergebnisse in Tabelle 22. Die Transfektion der Melanozyten mit pRK5-HER-mrk konnte somit mit dem EGFR-Antikörper erfolgreich nachgewiesen werden.

Die weiteren Analysen wurden mit 4  $\mu$ g Plasmid-DNA mittels des Nukleofectors durchgeführt.

Tabelle 22: Zusammenfassung der Transfektion mit pRK5-HER-mrk und pEGFP-N1 .

|   | pRK5-HER-mrk                                | pEGFP-N1                                    |
|---|---|---|
| <b>Menge Plasmid</b>                    | 4 µg  | 4 µg  |
| <b>Zeitpunkt der Transgenexpression</b> | 24 h  | 24 h  |
| <b>Expression</b>                       | Nukleofektion: 19,2 %<br>Lipofektion: 3,6 % | Nukleofektion: 14,8 %<br>Lipofektion: 8,6 % |

#### 5.5.4 Vergleich der Transgenexpression

Es wurde die Transgenexpression von pRK5-HER-mrk transfizierten Zellen mit und ohne Stimulation von EGF nach unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen. Nach der Transfektion wurden die Zellen bis zu 10 Tage weiterkultiviert und jeweils eine pRK5-HER-mrk transfizierte Zellpopulation gleich nach der Transfektion mit 8 nM EGF behandelt. Nach 24 h erfolgte der erste Nachweis der Transgenexpression. Beim 24 h-Wert wurde aufgrund der Annahme, dass nach 24 Stunden bezüglich der Transgenexpression noch kein Unterschied zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Zellen zu beobachten sein wird, auf den Ansatz einer zweiten Zellpopulation verzichtet.

Nach 4 und 10 Tagen erfolgte dann jeweils ein Nachweis für EGF-behandelte bzw. nicht behandelte Zellen. Die Transgenexpression nach 24 h korrelierten mit zuvor durch EGF erhalten Werten und lag bei 28,0 %. Nach 4 Tagen sank die Transgenexpression auf 8,2 % (ohne EGF) bzw. 9,8 % (mit EGF). Nach 10 Tagen konnten deutliche Unterschiede innerhalb der Transgenexpressionen beobachtet werden. Während bei den unbehandelten Zellen die Expression auf 1,8 % sank, blieb sie bei den EGF-behandelten Zellen mit 8,2 % annähernd konstant (Abbildung 40). Dieser Versuch wurde in 3-fach Bestimmung durchgeführt und aufgrund der erforderlichen Zellzahlen wurden Zellen von 3 unterschiedlichen Spendern mit unterschiedlicher Passage verwendet. Abbildung 40 zeigt die durchflusszytometrische Analyse (Dot Plot) der Transfektion NHEM-pRK5-HER-mrk 3 nach 10 Tagen mit bzw. ohne Stimulation von EGF.

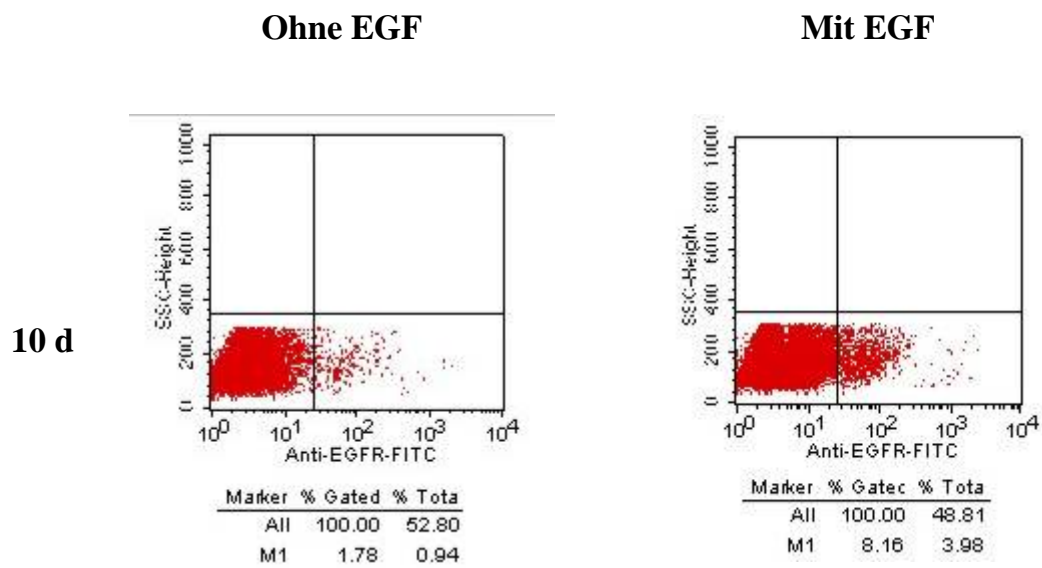


Abb.40: Durchflusszytometrischer Nachweis der Transfektion pRK5-HER-mrk 3 nach 10 Tagen mit bzw. ohne Stimulation von EGF.

Die folgende Abbildung 41 zeigt die Anzahl transfizierter Melanozyten mit NHEM-pRK5-HER-mrk.

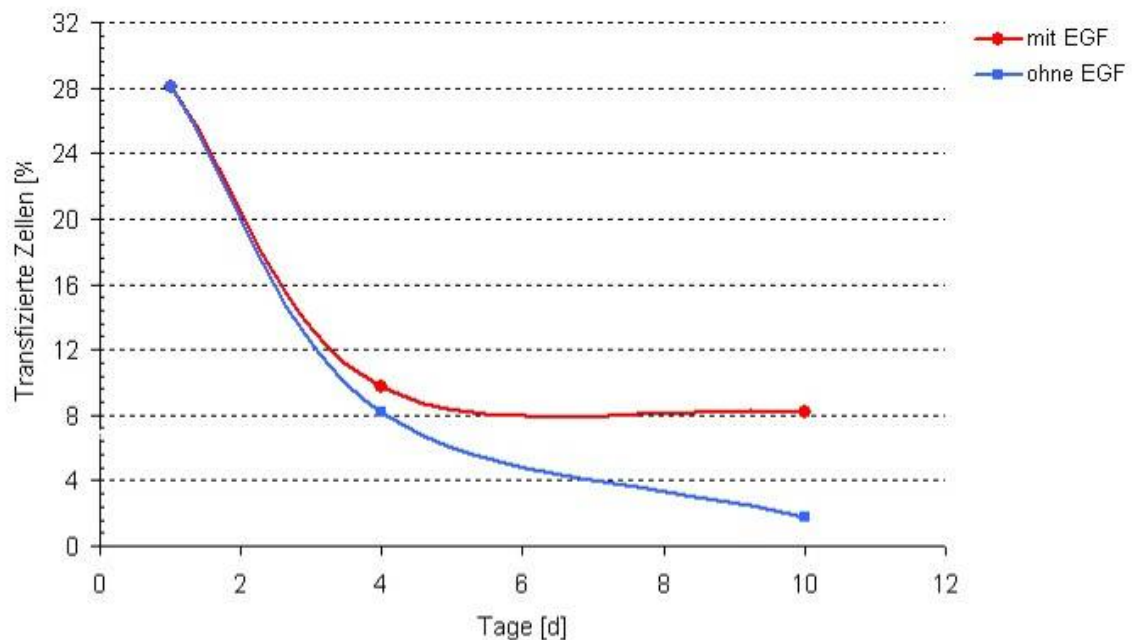


Abb.41: Verlauf der Kinetik von pRK5-HER-mrk transfizierten Melanozyten in % der Transfektionsmethode 3.

Es konnte kein klarer Unterschied zwischen den EGF-behandelten bzw. unbehandelten Zellen festgestellt werden. In Tabelle 23 sind die Ergebnisse der NHEM-pRK5-HER-mrk Transfektionen 1-3 zusammengefasst.

*Tabelle 23: Prozentualer Anteil transfizierter Melanozyten nach verschiedenen Zeitpunkten mit bzw. ohne Simulation mit EGF.*

|                | <b>24 h</b> | <b>4 Tage</b> |     | <b>10 Tage</b> |     |
|----------------|-------------|---------------|-----|----------------|-----|
|                |             | ohne/mit EGF  |     | ohne/mit EGF   |     |
| Transfektion 1 | 34,1        | 15,1          | 7,7 | 1,8            | 3,7 |
| Transfektion 2 | 5,3         | 6,9           | 3,9 | 1,3            | 1,4 |
| Transfektion 3 | 28,0        | 8,2           | 9,7 | 1,8            | 8,2 |

### **5.5.5 Zellzyklusanalyse**

Zur Bestimmung der Transformation von Zellen wurde die Methode der Zellzyklusanalyse ausgewählt. Zur Ermittlung einer geeigneten Vorbehandlungsmethode primärer Zellen für die Zellzyklusanalyse, wurden 3 Methoden an dermalen Fibroblasten getestet (Abbildung 42).

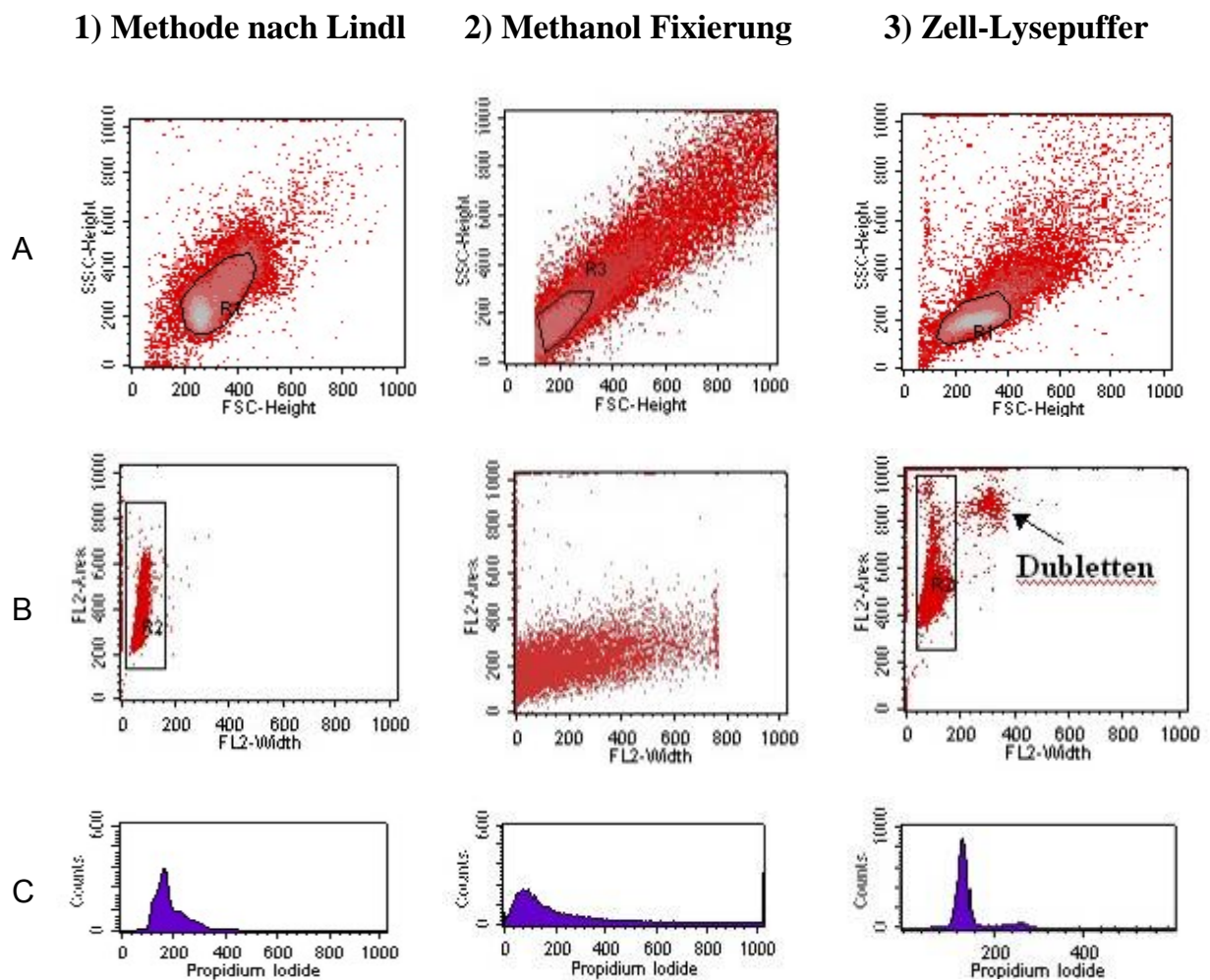


Abb.42: Zellzyklusanalyse nach 3 verschiedenen Methoden. (A) zeigt die Density-Plots, B zeigt die Auftragung FL-A über FL-W (Zellen aussortiert auf die HP) und (C) die zugehörigen Histogramme.

Wichtig bei der Auswertung von Zellzyklusanalysen ist eine relativ scharfe Begrenzung der einzelnen Peak (G1, S, G2/M) zu erhalten, um das Histogramm mittels des Programms „Mod Fit“ auswerten zu können. Bei der Methode nach Lindl [114] wurde ein homogenes Bild der Zellen im FSC/SSC erhalten, im Histogramm war es aber nicht möglich, einzelne Peak zu definieren. Zusätzlich wurde versucht, die Zellen mit RNase zu behandeln, was aber zu keiner Verbesserung des Ergebnisses führte. Die Vorbehandlung der Zellen durch die Methanol-Fixierung ergab ein völlig inhomogenes FACS-Bild im FCS/SSC. Es war nicht möglich, die Zellen auf eine Hauptpopulation einzustellen. Die Vorbehandlung der Zellen im Zell-Lyse Puffer nach Methode 3 (Abbildung 42) ergab eindeutig die Identifizierung von Dubletten. Im Histogramm war es möglich, die Peak (G1, S, G2/M) manuell und mittels des Programms ModFit 6.0

festzulegen. Diese Methode wurde nochmals mit primären Melanozyten getestet und erwies sich als geeignet für die folgenden Zellzyklusanalysen.

### 5.5.5.1 Zellzyklusanalyse mit NHEM-pRK5-HER-mrk transfizierten Zellen

Die Effizienz transfizierter Zellen sollte mittels Zellzyklusanalysen untersucht werden. Aufgearbeitet sind die Zellen nach der Methode 3. Hierfür wurden unterschiedliche Zeitpunkte nach Transfektion (Tabelle 19) hinsichtlich des Zellzyklus analysiert. Die folgenden Untersuchungen wurden an NHEM-pRK5-HER-mrk transfizierten Zellen durchgeführt und die erhaltenen S-Phasen miteinander verglichen. Transformierte Zellen zeigen eine erhöhte Proliferation und damit eine erhöhte S-Phase im Zellzyklus. Verglichen sind jeweils die S-Phasen der Wildtyp-Zellen, der pRK5-HER-mrk transfizierten Zellen mit bzw. ohne EGF Stimulation. Sowie Zellen, die mit pSP64-erbB (Positivkontrolle) bzw. mit pRK5-Xmrk-ATP (Negativkontrolle) transfiziert worden sind.

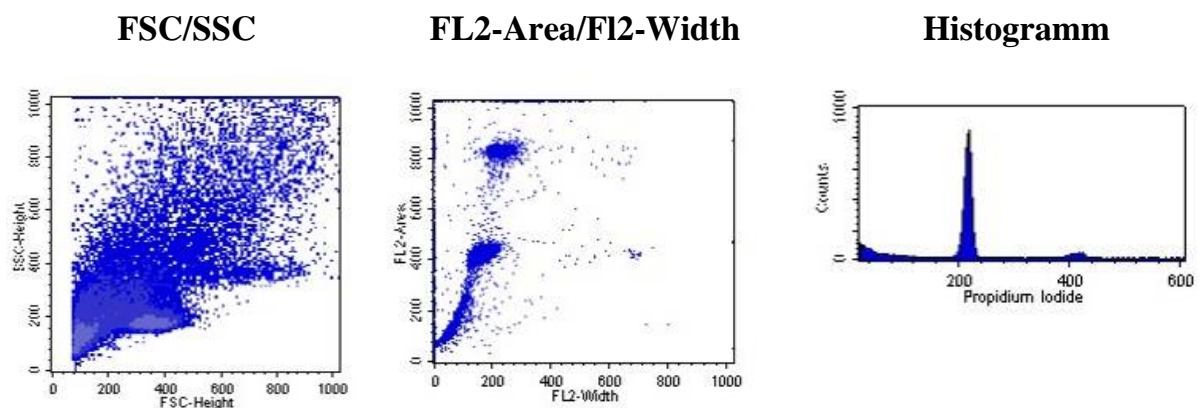


Abb.43: Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus der Wildtyp-Zellen.

Zur exakteren Auswertung wurden die Daten in das Programm ModFit 6.0 kopiert (Abbildung 44).

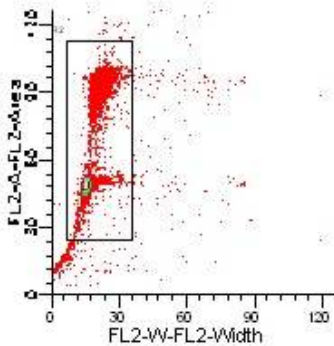


Abb 44: FL2-Area/ FL-Width Density Plot in ModFit. Darstellung der Wildtyp-Zellen.

Dort wurden in der Auftragung FL2-Area/ FL-Width durch Aussortierung Dubletten ausgeschlossen. Die ausgewählte Zellpopulation ist in einem Histogramm aufgetragen und Peaks definiert worden (Abbildung 43). Das Verhältnis G2/G1 konnte hierbei konstant gehalten werden. Die Prozentzahlen der einzelnen Phasen sind abschließend vom Programm berechnet worden. Jeweils am Tag 4 und Tag 10 nach Transfektion wurde zusätzlich zum EGF-Rezeptor als Nachweis die Zellzyklusanalyse durchgeführt. In Abbildung 45 werden die in ModFit ausgewerteten Zellzyklusanalysen der Transfektion NHEM-pRK5-HER-mrk am Tag 4 aufgezeigt.



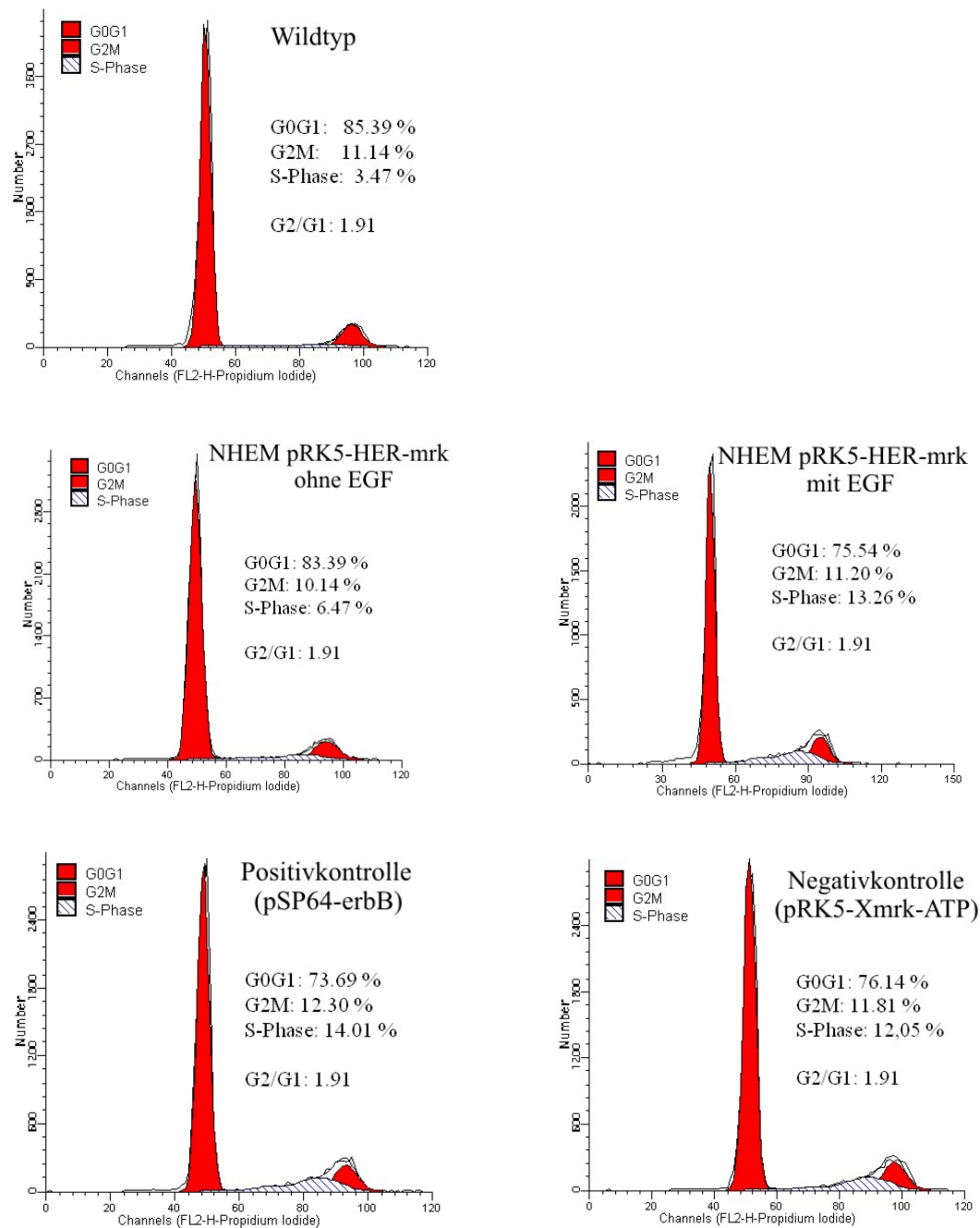


Abb.45: Histogramme der in ModFit 6.0 ausgewerteten Zellzyklusanalysen, 4 Tage nach Transfektion mit den entsprechenden Plasmiden (Transfektion 1).

Die Wildtyp Zellen zeigten einen sehr geringen Anteil von Zellen in der S-Phase. In der dargestellten Analyse wurde nach 4 Tagen bei den pRK5-HER-mrk transfizierten Zellen mit EGF-Behandlung eine doppelt so hohe S-Phase wie bei EGF-unbehandelten Zellen gefunden (Abbildung 45). Auch bei der Positivkontrolle wurde ein hoher S-Phasen Anteil (14.0 %) gefunden. Allerdings zeigte auch die Negativkontrolle in der S-Phase einen ähnlich hohen Wert. Die Unterschiede



bezüglich des Anteils der Zellen in der S-Phase der EGF-behandelten bzw. unbehandelten Zellen konnten in den folgenden Wiederholungsversuchen nicht bestätigt werden. Sowohl aus den Werten der S-Phasen nach 4 als auch nach 10 Tagen konnte nicht sicher auf eine Transformation der pRK5-HER-mrk transfizierten, stimulierten Zellen geschlossen werden. Auch die Bestimmung der Zellzahlen der jeweils transfizierten Zellen nach 4 und 10 Tagen deuteten nicht auf eine vermehrte Proliferation durch Transformation hin.

#### **5.5.6 Klonbildung von NHEM-pRK5-HER-mrk**

Bei den Klonierungsversuchen im Weichagar konnte keinerlei Wachstum der transfizierten bzw. nicht transfizierten Melanozyten im Weichagar beobachtet werden. Deshalb wurde mit einem Titrationsversuch getestet, wie viele Zellen pro Well in eine 6-Loch Platte eingesät werden müssen, um eine ausreichende Vereinzellung der Zellen und trotzdem noch Wachstum zu erzielen. Es wurden Zellzahlen von  $1 \times 10^2$  bis  $1 \times 10^3$  Zellen pro Well getestet. Da die Zellen bei so geringen Zellzahlen anfangs sehr schlecht adhärirten, wurden die Platten mit Beschichtungskollagen beschichtet. Mit dieser Beschichtung konnte eine gute Adhärenz der Zellen erreicht werden. Als geeignete Zellzahl einer 6-Loch Platte wurden  $2 \times 10^2$  Zellen pro Well ermittelt. Nach jeder Transfektion wurden jeweils  $2 \times 10^2$  Zellen von transfizierten NHEM mit bzw. ohne EGF- Stimulation, Wildtyp und Positiv- bzw. Negativkontrolle ausgesät. Nach 3-6 Tagen wurde eine Klonbildung der Melanozyten beobachtet. Jeden Tag wurden die Platten mikroskopiert und die Klone gezählt. Bei diesen Versuchen konnte keine vermehrte Klonbildung bei den pRK5-HER-mrk transfizierten, EGF-stimulierten Melanozyten bzw. bei der Positivkontrolle gegenüber Wildtyp-Zellen bzw. den nicht-stimulierten Zellen und der Negativkontrolle beobachtet werden

#### **5.5.7 Sortierung der transfizierten Zellen**

Für den Erhalt einer stabil transfizierten Zelllinie (NHEM-pRK5-HER-mrk), wurden transfizierte Melanozyten 24 Stunden nach Transfektion mittels des Nukleofectors am FACS-Vantage aussortiert. Verwendet wurden  $7,6 \times 10^6$  Zellen eines Spenders in der 1. Passage. Da viele Zellen durch die Transfektion geschädigt

wurden und nicht mehr adhärerten, konnten nach 24 Stunden nur  $3,2 \times 10^6$  Zellen zum sortieren eingesetzt werden.

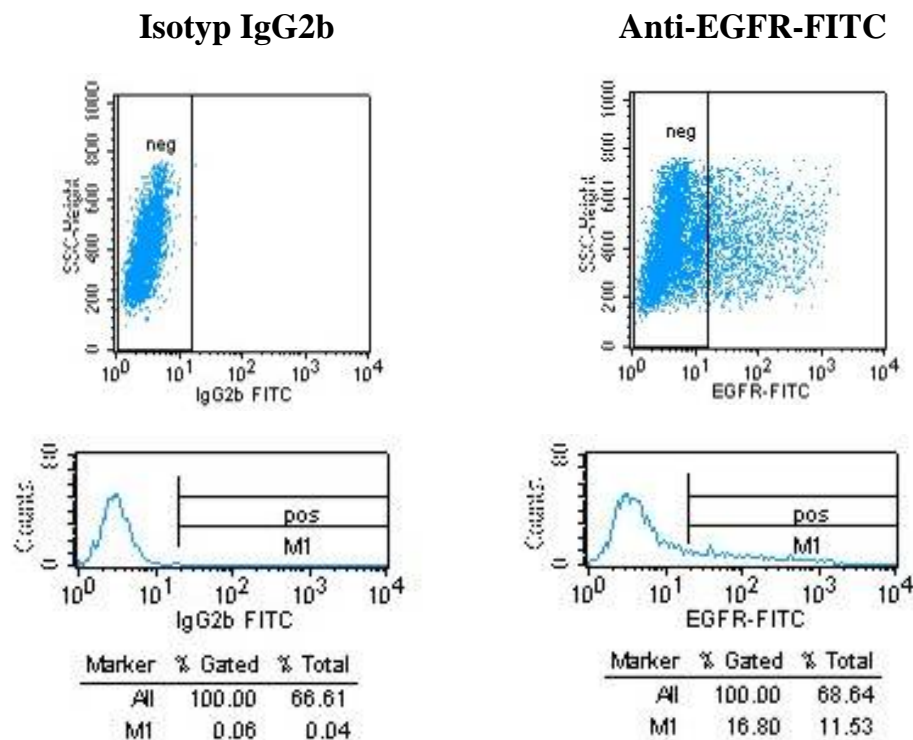


Abb.46: Durchflusszytometrische Einstellungen am FACS-Vantage für die Isotypkontrolle und Anti-EGFR-FITC für die anschließende Sortierung.

Bei den Voreinstellungen für die Sortierung wurden 16,8 % positive Zellen detektiert, die anschließend mittels des Enrich-Modus aussortiert wurden (Abbildung 46). Während der Sortierung zählten die Zähler am FACS-Vantage eine Gesamtzellzahl von 1,8 Mio. Zellen, davon 16,7 % in der Positivfraktion und 77,8 % in der Negativfraktion. Zur Überprüfung der Reinheit der Sortierung ist anschließend eine Reanalyse durchgeführt worden (Abbildung 47)

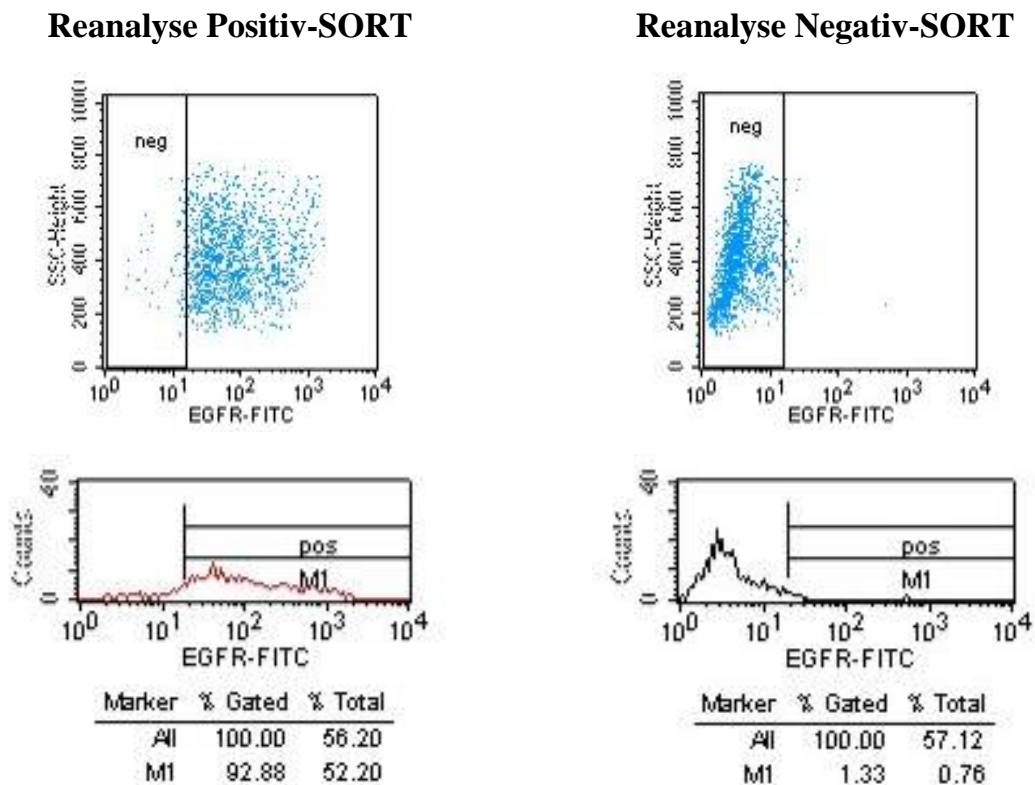


Abb.47: Reanalyse der Sortierung: Positiv- und Negativfraktion.

Die Reanalyse der Positivfraktion zeigte, dass mit einer Reinheit von 92,9 % positive Zellen sortiert worden waren (Abbildung 47). Die Negativfraktion enthielt in der Reanalyse nur 1,3 % positive Zellen (Abbildung 47). Die Zellen wurden nach Sortierung wieder in Kultur genommen. Die Negativfraktion ist in eine T75 Kulturflasche mit 10 ml MGM-Medium aufgenommen, die Zellen der Positivfraktion in eine T25 Kulturflasche mit 3 ml MGM+ 8 nM EGF. Nach 24 Stunden wurden die Kulturen mikroskopisch überprüft. Die Kultur war steril, aber sowohl in der Positiv- als auch in der Negativfraktion waren die Zellen über Nacht nicht adhärent. Auch während der Weiterkultivierung über mehrere Wochen zeigten die Zellen keine Adhärenz und wurden schließlich verworfen.

### 5.5.8 Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse

Als beste Transfektionsmethode mit einer Effizienz nach 24 h von 39 % erwies sich die Nukleofektion. Mit dieser Methode wurden die Melanozyten mit dem EGF-induzierbaren Proto-Onkogen pRK5-HER-mrk und geeigneten Kontrollen transfiziert, mit EGF stimuliert, um transformierbare Bedingungen zu schaffen. Die

Expression des EGF-Rezeptors wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch bestimmt. Während bei unbehandelten Zellen die Expression nach 10 Tagen von 8,2 auf 1,8 % sank, blieb sie bei den EGF-behandelten Zellen annähernd bei 1,5%.

Zur Bestimmung der Transformation von transfizierten Melanozyten wurde die Methode 3 mit dem Programm ModFit 6.0 zur Zellzyklusanalyse von primären Zellen etabliert. Die anschließenden Zellzyklusanalysen der pRK5-HER-mrk transfizierten Zellen zeigten bei EGF-behandelten Zellen einen doppelt so hohen Anteil von Zellen in der S-Phase wie bei EGF-unbehandelten Zellen.

Zusätzlich durchgeführte Klonierungsversuche der transfizierten Zellen im Weichagar zeigten kein Wachstum und auch Beobachtungen von einzeln ausgesäten, transfizierten Zellen in einer 6-Well Platte und die Bestimmung der Zellzahlen deuteten nicht auf eine vermehrte Proliferation durch Transformation hin. Nach der Aussortierung der transfizierten Zellen am FACS-Vantage zum Erhalt einer stabil transfizierten Zelllinie zeigten die Zellen in der Kulturflasche keine weitere Proliferation.

## 5.6 3-D humanes Hautmodell als Testsystem

In Europa ist der Einsatz von Tieren für Forschung, Impfstoffentwicklung und besonders für die Produkttestung ein stark diskutiertes Thema. In den Anfängen der Forschung standen die chemische Synthese und der Tierversuch im Vordergrund. In den letzten Jahren werden zunehmend Ersatz- bzw. Ergänzungsmethoden zum Tierversuchen entwickelt und auch bereits erfolgreich eingesetzt [63; 181]. Dabei handelt es sich um 3-D Gewebesysteme, die einfache oder komplexe physiologische und biochemische bzw. pathophysiologische Prozesse bzw. Reaktionen des Gesamtorganismus repräsentieren. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Etablierung eines Hautmodells zum Einsatz verschiedener Tests vorgestellt.

### 5.6.1 *in vitro* Wundheilungsmodell

Die Hauptfunktion bei der Reepithelialisierung und Bildung von Granulationsgewebe wird durch Fibroblasten und Keratinozyten erzielt. Zur Untersuchung wurde die Ausbildung eines hyperproliferativen Epithels am Wundrand mit histologischen und immunhistologischen Methoden analysiert. Die folgenden Abbilder veranschaulichen die Wundheilungskinetik über einen Zeitraum von 3 Tagen. Nach 12 h bildete sich ein epithelialer Ausläufer und die Keratinozyten beginnen vom Wundrand her in die Wunde einzuwandern. Dieses einwandern der Keratinozyten setzt sich die nächsten 2 Tage fort. Am Tag 3 ist die Wunde vollständig mit einer gut differenzierten Epidermis einschließlich einer abschließenden Hornschicht geschlossen (Abbildung 48 D).

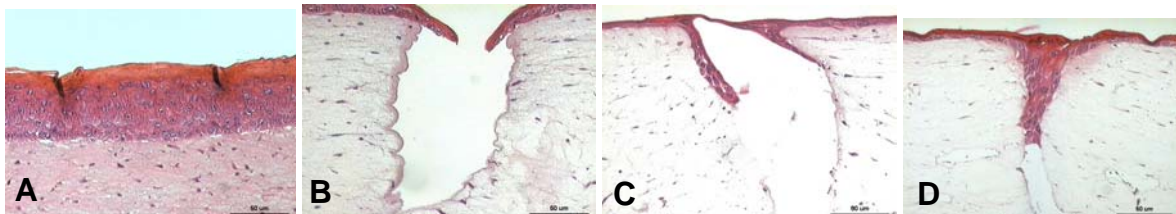


Abb.48: Wundheilungskinetik, Kontrolle (A), 24 h nach Verletzung (B), 48 h nach Verletzung (C), 72 h nach Verletzung (D).

#### Reepithelialisierung

Bei den Zellen am Wundrand wurde eine verstärkte mitotische Aktivität nach Applikation von Calgranulin C festgestellt. Nach 2 Tagen konnte eine verstärkte Wanderung und Mitoseaktivität am Wundrand festgestellt werden. Diese Aktivität wurde durch den Antikörper PCNA detektiert (Abbildung 49). Die Zellen werden am Wundrand produziert, gespeichert und sind bis zu mehrere Zellschichten dick (Abbildung 49 B). Ein Beleg dafür, dass die Migration von basalen Zellen eingeleitet wird. Nach 72 h wird die Mitoseaktivität eingestellt und erlaubt dann dem Wundepithelium zu einem normalen dicken Epithelium zu differenzieren (Abbildung 50).

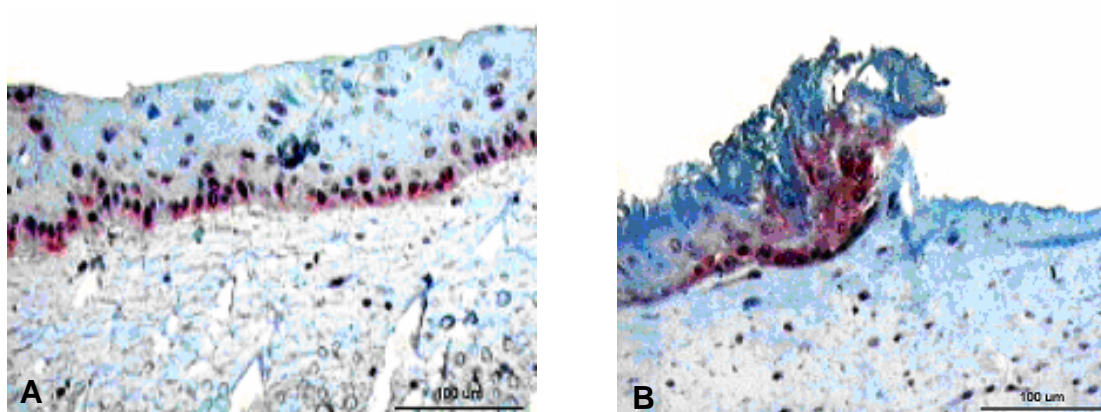


Abb.49: PCNA-Expression im (A) unverletzten Hautäquivalent und (B) 48 h nach Verletzung.

### Zytokeratin 10

Die immunhistochemischen Färbungen mit Anti-Zytokeratin 10 zeigen, dass nach 72 h die suprabasalen Zellen eine deutliche Expression dieses Protein zeigen und so die Differenzierung des Epithels einleiten (Abbildung 50).

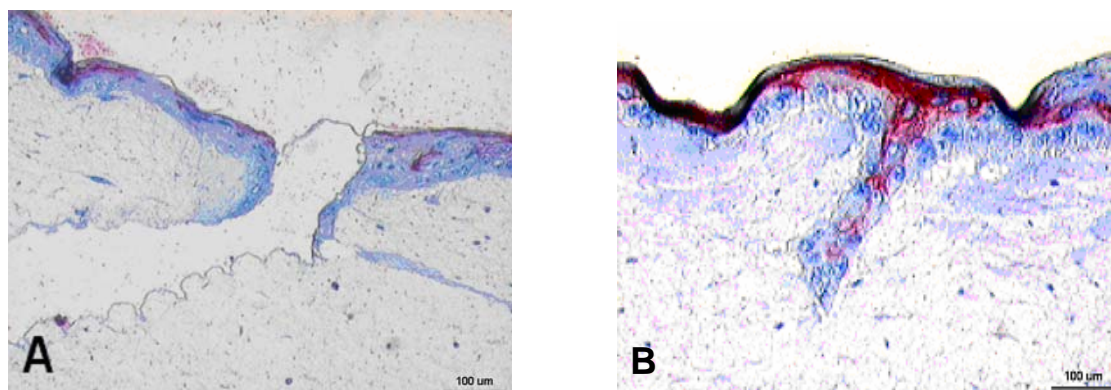


Abb.50: Expression von Zytokeratin 10 (A) 24 h und (B) 72 h nach Verletzung.

### Zytokeratin 16

Kurz nach der Verletzung ist keine Expression des Keratins erkennbar. Erst 24 h nach Verletzung wird das Protein von einer suprabasalen Zellschicht gebildet, die sich über die Wunde zieht. Wenn die Wunde vollständig mit epitheliale Gewebe "zugeheilt" ist wird das Zytokeratin bis in die epitheliale Wundspitze von den dort differenzierten suprabasalen Zellen exprimiert (Abbildung 51). Der epitheliale Wundverschluss ist nach 72 h noch nicht vollständig wiederhergestellt. Dies zeigt sich in epidermaler Hyperproliferation und aberranten Keratinisierung, nachweisbar an Anti-Zytokeratin 16 (Abbildung 51 A und B).



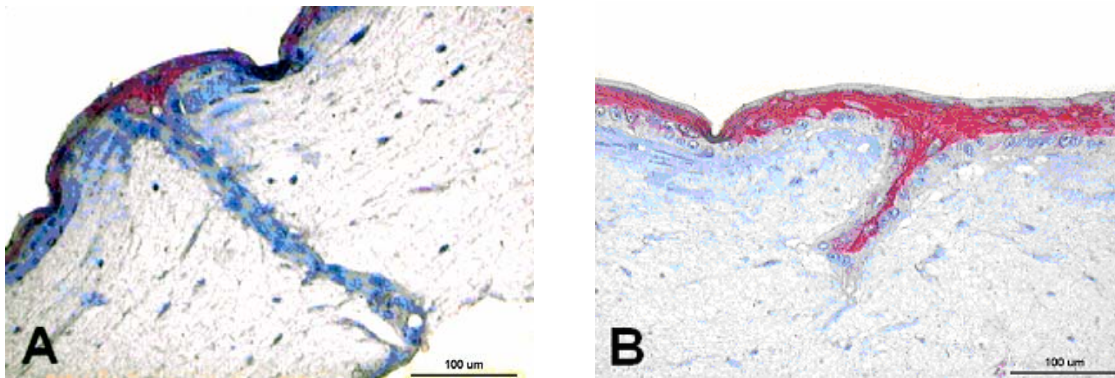


Abb.51: Expression von Zytokeratin 16: (A) 24 h und (B) 72 h nach Verletzung.

### Sekretion von IL-1 $\alpha$ nach Verletzung

Keratinocyten behalten in Kultur ihre genetisch festgelegte konstitutive Zytokinexpression bei, mit zunehmender Passage drosseln sie nur die Transkriptionsstärke. Die Ausschüttung von IL-1 $\alpha$  steigt im Hautmodell mit zunehmendem Wundalter kontinuierlich an und erreicht ein Maximum bei 48 h nach Verwundung von mehr als 250 pg/ml, wenn ein strukturiertes Epithel vorliegt. Danach nimmt die Konzentration an IL-1 $\alpha$  wieder bis zu einem Wert von 170 pg/ml ab (Abbildung 52). Die unverletzten Kontrollen zeigten keine, durch den verwendeten Test, nachweisbaren IL-1 $\alpha$ -Konzentrationen.

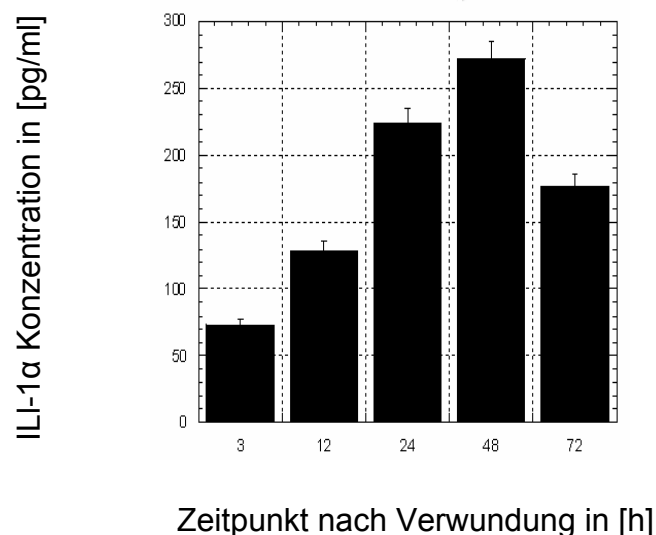


Abb.52: IL-1 $\alpha$  Gehalt in den Medienüberständen der Äquivalente zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

### Funktionalität des *in vitro* Wundheilungsäquivalent

Die Funktionalität des *in vitro* Wundheilungsmodells wurde an ausgewählten Markern mittels RT-PCR durchgeführt (Kap. 4.10.1.1). Es konnte für die Geneexpressionsanalyse des Enzymes Hydroxyprostaglandindehydrogenase eine Regulation beobachtet werden, die mit der Regulation in humanen Biopsien vergleichbar ist. Die Expression wurde relativ zum house keeping gene Cyclophilin gemessen. Cyclophilin ist unabhängig vom Zelltyp und vom Zustand der Zellen. Für die relative Expressionsstärke ist ein Wert von 1 festgelegt worden, alle anderen Werte sind zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt worden (Abbildung 53). Die Befunde konnten in 3 unterschiedlichen Chargen von Hautäquivalenten bestätigt werden.

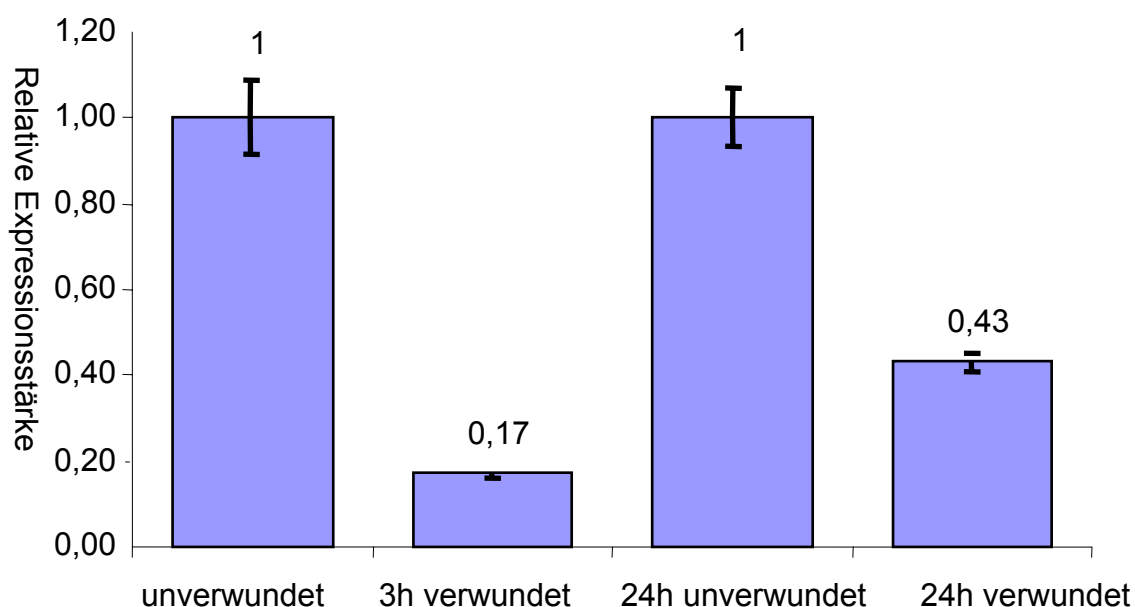


Abb.53: Genexpressionsanalyse: Hydroxyprostaglandindehydrogenase.

### 5.6.2 *in vitro* Tumormodell

Untersucht wurden das Wachstumsverhalten und die morphologischen Phänotypen von 3 humanen Melanomzelllinien mit unterschiedlichem Metastatischem Potential. Bei der Zelllinie Mel Juso handelt es sich um Melaninproduzierende Zellen, daher waren die Transplantate und ihre Entwicklung im Gel makroskopisch gut zu erkennen (Abbildung 54). Die nachstehende



Abbildung veranschaulicht Größe und Lokalisation der Aggregate während der Phase der Airlift-Kultivierung im Insert.

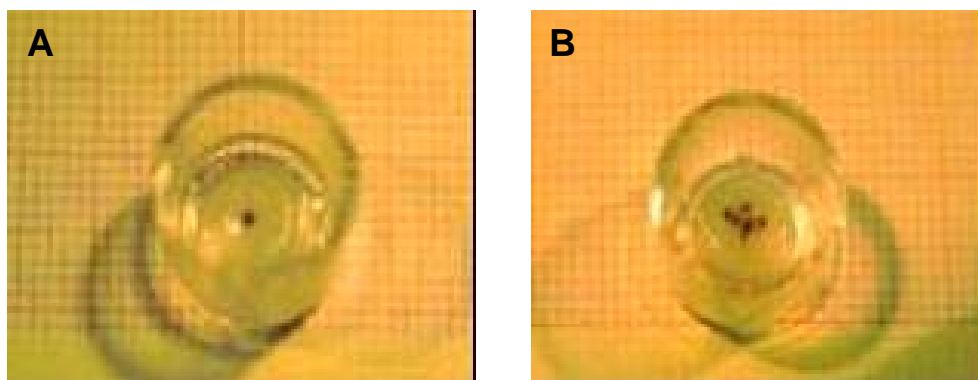


Abb.54: Aufsicht auf Melanomäquivalente nach 7 und 14 Tagen Airlift-Kultivierung (A): ein Aggregat, (B): 5 Aggregate.

Bei der vorgestellten Methode wurden die Melanomzellen in Form von mikronodulären Transplantaten auf den dermalen Anteil der Rekonstrukte übertragen. Anschließend erfolgte die Überschichtung mit Epidermiszellen. Die so hergestellten Äquivalente wurden über einen Zeitraum von 9 Tagen in Airlift-Kultur gehalten. Die Melanomzellen, eingebettet in eine Kollagen Biomatrix, waren vital, wachstumsfähig und bildeten bei Einsaat von BLM-Zelllinien diffuse Infiltration in des Kollagen, bei der Zelllinie M 13 bildeten sich kleine, kompakte, separate Nester mit engem Zellkontakt (Abbildung 55 A und B). Es konnte bei beiden eine vertikale, dermal-invasive Wachstumsrichtung festgestellt werden. Die nicht metastasierende Zelllinie Sk Mel 28 zeigte keine Invasion (Abbildung 55 C).

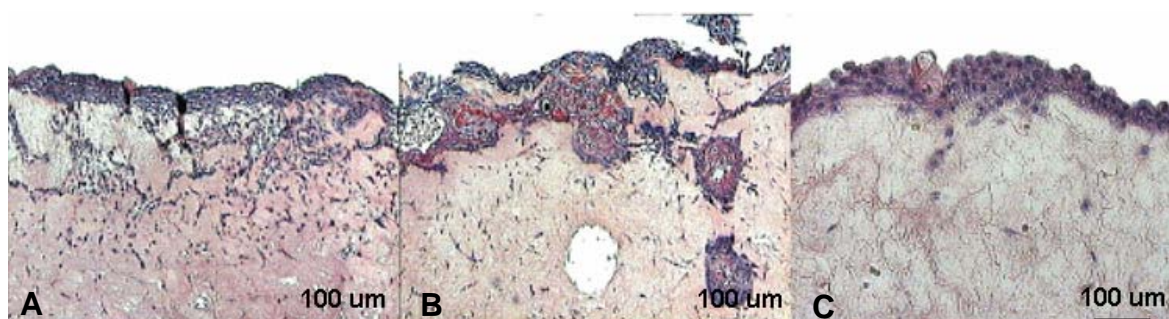


Abb.55: Bildung von diffusem Infiltrat der BLM-Zelllinie (A); Bildung von Tumornestern durch die M 13-Zelllinie (B); Sk Mel 28 zeigt kein invasives Eindringen der Zelllinie in die Matrix (C).

Zum Vergleich ist in Abbildung 56 die histologische Wiedergabe von Melanomen *in vivo* dargestellt: Teil A zeigt den Gewebeschnitt eines superfiziell spreitenden Melanoms (SSM), in Teil B ist der Gewebeschnitt eines nodulären Melanoms (NM) abgebildet. Abbildung 56 A zeigt deutlich die noch flächige, aus der Epidermis entspringende Proliferation der Melanomzellen, welche sich teilweise bereits zu lockeren Zellnestern formiert haben und in ein dermal-invasives Wachstum (VGP) übergegangen sind. Die, noch in sich geschlossene Oberhaut wurde jedoch vom Tumorzellherd basal angegriffen und geschädigt. Analogien mit den Abbildungen der *in vitro* Methode sind erkennbar. In Abbildung 56 B ist die Dermis mit zahlreichen, kompakten, vertikal proliferierenden Clustern aus Melanomzellen durchsetzt, welche ebenso die Epidermis partiell durchbrochen haben und deren kohäsive Strukturen zerstörten.

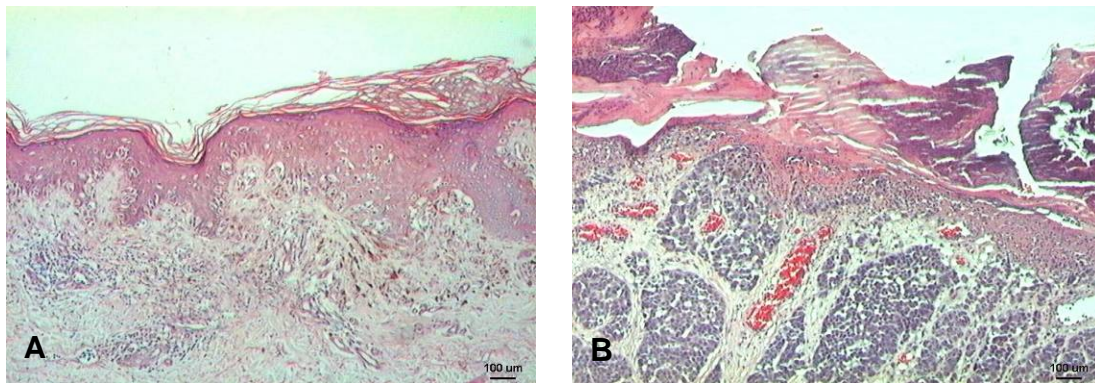


Abb.56: Melanome *in vivo* (A): Typ SSM, (B): Typ NM (HE-Färbung).

### 5.6.3 *in vitro* Angiogenesemodell

In den vorliegenden Untersuchungen soll ein *in vitro* Angiogenese Modell etabliert werden. Dazu gehört die Bildung kapillarähnlicher Strukturen in einem 3-D Gewebeverband. Endothelzellen verfügen *in vitro* über die Fähigkeit auf einen Stimulus komplexe gefäßartige Netzwerke zu bilden [67]. Diese Stimulation der implantierten Endothelzellen zur Proliferation und/oder Migration wird zunächst von definiert zugesetztem VEGF erreicht. Zur Annäherung an die *in vivo* Angiogenese wird das Modell durch Einsaat von stark invasiven Tumorzellen erweitert. Die Tumorzellen, vergleichbar zum Tumorwachstum *in vivo*, produzieren alle nötigen Faktoren die Zellen für die Bildung neuer Kapillaren benötigen. Im Folgenden werden die Untersuchungen dargestellt.

## Histologische Auswertung

Anhand der HE-Färbung treten durch das Hämatoxylin die blau gefärbten Zellkerne der Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und BLM in den Vordergrund (Abbildung 57 A, B, C, D). Die Strukturansichten zeigen die lückenhafte Ausbildung des *Stratum Corneum* (Abbildung 57 A u. B). Die Keratinozyten differenzierten in einem ungeordneten Zustand in die Kollagen-Typ-I Matrix (Abbildung 57 B). Zudem löste sich der Kollagenanteil von der Dermis, wodurch stellenweise eine Zerstörung der Dermis erkennbar wurde (Abbildung 57 B). Die Melanomzellen proliferierten in horizontaler Richtung entlang der oberen Dermissschicht (Abbildung 57 D). Des Weiteren löste sich der endotheliale Anteil von der Dermis ab (Abbildung 57 A).

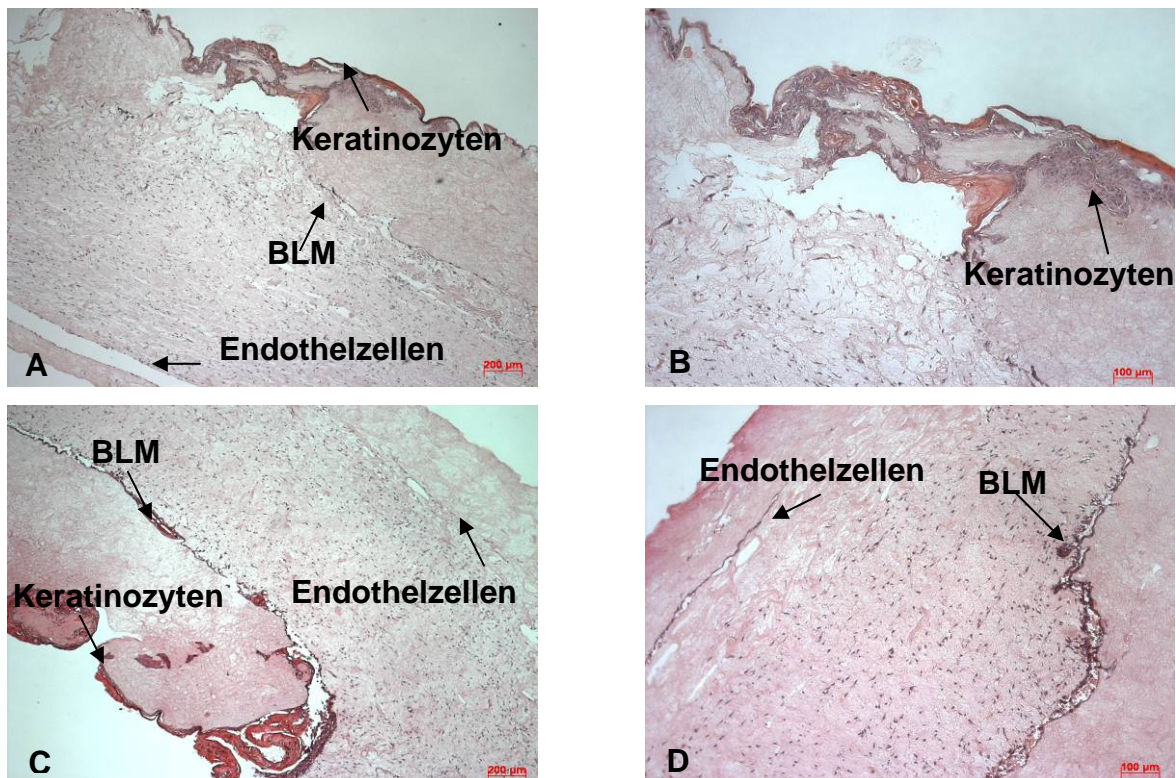


Abb.57: Histologischer Schnitt, HE-Färbung; (A,B,C,D) zusammengesetztes *in vitro* Angiogenesemodell 4 Tage in Kultur wobei der dermale und endotheliale Anteil 42 Tage in Kultur und der epidermale Anteil 17 Tage in Kultur gehalten wurden.



### Immunhistochemische Auswertung

Die Migration der Endothelzellen in die Kollagen-Typ-I Matrix bis in den dermalen Anteil ist nach Zugabe von VEGF besser ausgebildet als ohne VEGF - Zusatz (Abbildung 58 A und B). Zudem lässt sich eine verstärkte Gruppierung sowie eine ringförmige Aneinanderreihung der Endothelzellen (Abbildung 58) erkennen.

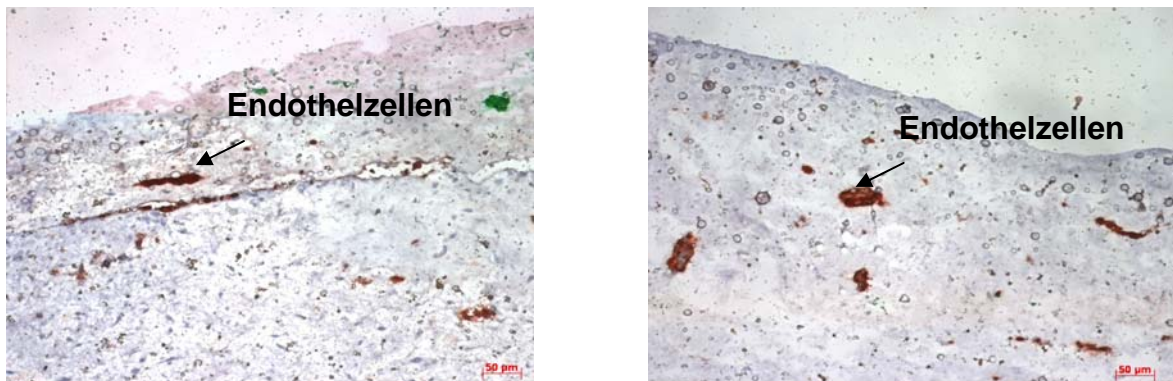


Abb.58: Paraffinschnitt, Immunhistologische Färbung mit Anti-vWF; Endothelzellen 41 Tage im Hautäquivalent in Kultur. (A) ohne VEGF – Zusatz; (B) mit VEGF – Zusatz.

#### 5.6.4 *in vitro* Infektionsmodell

Für die Adhäsion und Invasion von *C. albicans* sind 2 Transkriptionsfaktoren: Cph1p und Efg1p verantwortlich. In den folgenden Versuchen wurde die Fähigkeit von *C. albicans* Stämme untersucht, die eine Deletion in einen oder beiden dieser Transkriptionsfaktoren aufweisen, das Hautmodell zu infizieren.

Im Hautmodell wurde eine starke Invasion des Sc5314 und bei Can 16 48 h nach Infektion beobachtet (Abbildung 59 B und D). Die Invasion durch das *Startum corneum* des Hautmodells wurde bei beiden Stämmen bereits nach 24 h sichtbar. Im Gegenteil zu diesen beiden Stämmen konnte bei Can 33 ( $\Delta$ efg1) und Can 34 ( $\Delta$ cph1  $\Delta$ efg1) zu keinem Zeitpunkt eine Hyphenausbildung und damit die Fähigkeit zur Invasion beobachtet werden (Abbildung 59 C und E).

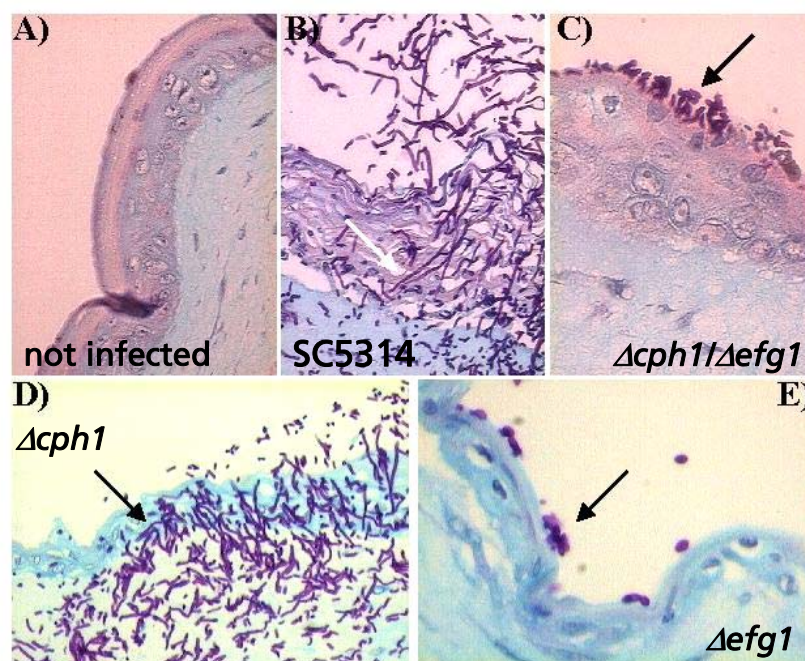


Abb. 59: Infektion von Sc5314 (B) und bei Can 16 nach 48 h (D) (Abb. 59 B und D. Bei Can 33 ( $\Delta efg1$ ) und Can 34 ( $\Delta cph1 \Delta efg1$ ) konnte keine Invasion festgestellt werden [47].

## 6 Diskussion

3-D *in vitro* Gewebekulturmodelle spiegeln miniaturisierte und vereinfachte Organsysteme, wie der Haut wieder. Die in ihrem Aufbau der Haut sehr ähnlichen Systeme können helfen, die Prinzipien und Abläufe bei der Homöostase von Krankheiten aufzuklären [172]. In diesen 3-D Kulturen werden Fibroblasten unter physiologischen Bedingungen, d.h. ihrer Situation in der Dermis weitgehend entsprechend, eingebettet in einer Kollagen Typ I Matrix kultiviert [8; 107]. Auf den Kollagengelen wachsen die Keratinozyten luftexponiert auf einer fibroblastenhaltigen Gelmatrix [8] und bilden ein Epithel bestehend aus *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* aus. Zwischen Epithel und Gelmatrix bildet sich eine Basalmembran aus [18] und auch im Epithel organotypischer Kulturen werden die charakteristischen epithelialen Marker der Haut vorgefunden [3; 11]. Zum Beispiel werden differenzierungsspezifische epidermale Marker wie Zytokeratine, Filaggrin und Involukrin im Epithel der Kulturen vergleichbar der normalen humanen Haut lokalisiert. Eine immunhistochemische Analyse gibt Aufschluss über die Qualität der Organotypischen Kulturen.

### 6.1 *In vitro* Testsysteme

Für bestimmte Fragestellungen ist die Schaffung von *in vitro* Modellen notwendig, in denen genau definierte experimentelle Konditionen herrschen und so die schrittweise Zerlegung komplexer Prozesse möglich macht. Auch im Hinblick auf den Ersatz bzw. die Ergänzung von Tierversuchen sind solche Modelle von großem Nutzen [172]. Gerade aus ethischen, ökonomischen aber auch aus Gründen der Übertragbarkeit der gewonnenen Daten auf den Menschen sollen Versuche am Tier mehr und mehr reduziert werden [108]. Durch die Verwendung von Humanzellen ist auch eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen gewährleistet. Derartige Testsysteme können z.B. in der Tumorforschung dazu dienen, dass Kandidaten in einer frühen Entwicklungsphase schnell und kostengünstig für Weiterentwicklungen selektiert werden können.

Der Einsatz von *in vitro* Testsystemen basierend auf humanen primären Zellen erlaubt die Entwicklung von Therapeutika im Bereich der Dermatologie.

Als Testsystem kommen u.a. 3-D Zellkulturen zum Einsatz, die in ihrer Zellzusammensetzung und der Struktur der menschlichen Haut ähneln [3]. Der Vorteil solcher Modelle gegenüber Zellkulturexperimenten mit isolierten Zellen liegt darin, dass die verschiedenen Zelltypen in Kontakt stehen und so auch indirekte Effekte analysiert werden können. Des Weiteren kann die Pathogenese von Hautkrankheiten (z.B. Wundheilungsstörungen) untersucht werden. Als Testsysteme wurden folgende Modelle etabliert:

- *in vitro* Modell für die Wundheilung
- *in vitro* Modell zur Untersuchung der Invasivität von Melanomen
- *in vitro* Modell zur Untersuchung der Angiogenese
- *in vitro* Modell für Infektionsstudien

### **6.1.1 *in vitro* Wundheilungsmodell**

Die Hauptfunktion bei der Reepithelialisierung und Bildung von Granulationsgewebe wird durch Fibroblasten und Keratinozyten erzielt. Um diese epithelialen-mesenchymalen Wechselwirkungen bei der Wundheilung zu untersuchen wurde ein 3-D humanes Modellsystem eingesetzt. Dieses Modell ist aufgebaut aus primären Fibroblasten, eingebettet in eine Biomatrix, und primären Keratinozyten, die eine mehrschichtige Epidermis mit Verhornung bilden. Ziel dieser Arbeit war es ein System zu etablieren dessen zellbiologische Antwort auf Verwundung der *in vivo* Situation möglichst weit entsprechen soll. Das entwickelte *in vitro* Modell wurde anfänglich mit einer 30G Nadel verwundet. Für eine bessere Reproduzierbarkeit in der Wundsetzung wurde ein Er:YAG Laser zur Wundsetzung eingesetzt. Die Pulsdauer eines Pulses beträgt ca. 300 ms. Die Pulsfrequenz beträgt 1 Hz. Der Laserstrahl wird mit Hilfe eines Strahlgelenkarms zur Probe geführt und mit einer Linse ( $f=100\text{mm}$ ) auf einen Fleckdurchmesser von 4 mm zusammengeführt. So konnte gezielt die Eindringtiefe und der Durchmesser der künstlichen Wunde bestimmt werden. Mittels ausgewählter Marker für RT-PCR konnte die Funktionalität des *in vitro* Wundheilungsmodells durch Analysen in der mRNA Expression nachgewiesen werden. Für das Gen  $\alpha 1$ -Hydroxyprostaglandindehydrogenase wurde eine Regulation beobachtet, die mit der Regulation in humanen Biopsien vergleichbar ist. In humanen Biopsien sowie in den Hautäquivalenten konnte eine Herunterregulierung der Expression um den

Faktor 6 (3 h nach Verwundung) bzw. Faktor 2,5 (24 h nach Verwundung) festgestellt werden. Alle anderen getesteten Genexpressionsanalysen wiesen eine unterschiedliche Regulation auf. Diese abweichenden Expressionsdaten der Gene können auf eine Induzierung bereits während der Kultivierung der Zellen zurückgeführt werden. Weiterhin kann die Expression von Faktoren abhängen, die durch Zellen induziert werden, die nicht im Hautäquivalent enthalten sind.

Die Ausbildung eines hyperproliferativen Epithels am Wundrand wurde mit histologischen und immunhistologischen (Zytokeratin- und PCNA-Expression) Analysen nachgewiesen. 3 Tage nach Verwundung konnte die Regeneration des Gewebes durch die Keratinozyten festgestellt werden. Das neu gebildete Epithel zeigt die charakteristischen differenzierungsspezifischen epidermalen Marker. Als Vorbereitung für die einsetzende Zellwanderung der Epithelzellen wird der Reepithelialisierungsprozess mit einer verstärkten Mitoseaktivität zur Produktion neuer Epithelzellen und anschließenden Speicherung dieser Zellen am Wundrand eingeleitet. Durch die topische Applikation der Substanz Calgranulin C konnte am Wundrand eine verstärkte mitotische Aktivität der epidermalen Zellen identifiziert werden. Die Reepithelialisierung eines Hautäquivalents wurde bereits von Garlick und Taichmann 1994 beobachtet. Hier wurde der Einfluss von TGF $\beta$ -1 auf die Reepithelialisierung in einem Organotypischen Modell untersucht. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Keratinozyten einen Wechsel von einem hohen proliferativen Status in einen migratorischen Status nach Verwundung wechseln. Der Effekt konnte in mehreren Versuchen nachgewiesen werden und wurde auch durch histologische und immunhistologische Daten bestätigt. Dieser Wechsel zwischen Migration und Proliferation von Keratinozyten nach Verwundung wurde auch in Studien von Fransson und Hammar [65] und von Sarret [164] bestätigt.

Weiterhin wurde eine stufenweise Antwort auf Verwundung durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wiedergegeben. Bestimmt wurde die Sekretion des Zytokins IL-1 $\alpha$  durch Sammeln des Mediumkulturüberstands parallel zur histologischen Kinetik. Die erste Phase der Wundheilung ist von vielen überlappenden Ereignissen gekennzeichnet, besonders die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Diese Zytokine werden innerhalb der ersten 24 h nach Verletzung exprimiert. Das Zytokin IL-1 $\alpha$  repräsentiert das erste Zytokin und somit die Produktion der nachfolgenden Zytokine, wie IL-6, IL-8 und TGF- $\alpha$



reguliert [2; 55]. Es zeigte sich, dass die IL- $\alpha$  Produktion der Keratinozyten nach 48 h eingestellt wird, wenn ein strukturiertes Epithel vorliegt. Keratinozyten besitzen beträchtliche Mengen intrazellulär gespeichertes IL-1 $\alpha$ . Diese Speicher werden nach einer biologischen oder mechanischen Verletzung der Haut freigesetzt.

Vergleiche mit normaler Wundheilung zeigen, dass sich dieses Hautmodell für Studien zur akuten Wundheilung eignet. Interessant ist hierbei zu bemerken, dass diese Modelle beim Einsatz als Transplantat auf schlecht heilenden Wunden (chronische Wunden) als „akute Wunden“ reagieren und dadurch fähig sind die normale Wundheilungsumgebung wieder herzustellen [112]. Andere Studien zeigten, dass genetisch markierte Zellen im Wundbett vom Wundrand her migrieren ohne sich vorher geteilt zu haben [73]. Unterstützt wird diese Theorie durch klinische Untersuchungen [56], bei denen Keratinozyten sheets die Wunde vom Rand her zuheilen („edge effect“).

Die Interaktion von epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten *in vivo* wird als entscheidend für die Wundheilung und die zelluläre Entwicklung angesehen. Die *in vitro* Fertigung von Konstrukten, in denen die benötigten Zelltypen in einer Matrix ein 3-D Gebilde formen, hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Ohkura und Terada [143] zeigten, dass die Kokultur von epidermalen Rattenzellen und Fibroblasten (3T3) die Biosynthese von Zytokeratin und das Wachstum der epidermalen Zellen beschleunigen.

### **6.1.2 *in vitro* Tumormodell**

Mit der Entdeckung des Tumorgens Xmrk fanden Scharl et al. (1992) ein Modellsystem zur Erforschung der Signaltransduktion in Tumorzellen und konnten eine Transformation von murinen Melanozyten nach Transfektion mit Xmrk feststellen. Im Rahmen der Arbeit sollten humane epidermale Melanozyten mittels des EGF-induzierbaren Proto-Onkogen pRK5-HER-mrk transfiziert werden, um konditional transformierbare Zellen für die spätere Einsaat in das 3-D Hautäquivalent zur Etablierung eines *in vitro* Melanommodells zu erhalten.

Die von der Arbeitsgruppe Scharl [167] überlassenen Konstrukte konnten erfolgreich amplifiziert werden. Die gewählten Methoden, Konditionen und Konzentrationen der DNA-Präparationen einschließlich der

Bakterientransformation und Restriktionsverdau erwiesen sich als geeignet und

lieferten die gewünschten Ergebnisse. Die Fragmentgrößen der Plasmide, die durch das Programm Clone Manager gefunden wurden, stimmten mit den Fragmentgrößen, die durch den Kontrollverdau im Agarose Gel erhalten wurden, überein.

Die Art der Kontrollen zum induzierbaren Hybridvektor war jedoch nur bedingt geeignet. Die Negativkontrolle enthielt die vollständige Sequenz des Xmrk Gens mit ATP Bindungsdefizit, eine bessere Vergleichbarkeit mit dem induzierbaren Plasmid wäre durch den Einsatz eines pRK5-HER-mrk Plasmids mit ATP-Bindungsdefizit zu erreichen gewesen. Als Positivkontrolle wurde zuerst ein Vektor mit dem vollständigen Xmrk-Protein ohne induzierbare EGF-Extrazellulärdomäne in Betracht gezogen. Da aber nach Angaben der Arbeitsgruppe Scharl [167] die Signale bei diesem Plasmid nicht sehr effizient weitergeleitet werden, wurde als Alternative für die Positivkontrolle der pSP64-erbB Plasmidvektor verwendet. Dieser war nur unter Beachtung der Tatsache, dass der Vektor die Transformation auf der Basis der Onkogene erbB vermittelt, als Kontrolle einsetzbar.

Im Rahmen der Arbeit konnte eine Isolierungs- und Subkultivierungsmethode für primäre humane Melanozyten aus Vorhaut etabliert werden. Die Primärkulturen sind jedoch sehr stark mit Bindegewebszellen kontaminiert. Erfolgreich bei der Beseitigung dieser Zellen war der Einsatz der MACS-Methode zur Entfernung von Fibroblasten. Bei ca. 60 % der durch MACS Aufgereinigten primären Melanozytenkulturen konnte eine reine Kultur erhalten werden. Die Verlustrate der Zellen lag jedoch im Durchschnitt bei  $56 \pm 37$  %. Die Zellen blieben durch Verklumpungen und unspezifische Bindungen in der Säule oder konnten nicht vollständig ausgewaschen werden. Gearbeitet wurde aufgrund vorhandenen Materials mit Midi-MACS-Säulen. Zu große Verluste wurden vermieden, indem die Anfangszellzahl bei Verwendung von Midi-MACS Säulen nach Herstellerangaben mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen betragen. Da aber aus einer Präputie nur begrenzt Melanozyten isoliert werden können, standen pro Präputie  $5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$  Zellen zur Verfügung. Je weniger Zellen zur Verfügung standen, desto größer wurden die Zellverluste durch MACS. Eine Möglichkeit, diesen hohen Verlust ( $56 \pm 37$  %) zu verringern, ist das Poolen von Zellen aus mehreren Spendern. Auch könnten Mini-MACS Säulen (Maßstabsverkleinerung) in Betracht gezogen werden, was aber einen erheblichen Zeitaufwand bedeutet, um die erforderliche Menge an Zellen zur Transfektion zu erhalten.

Die Abreicherung der Fibroblasten in einer Melanozytenkultur konnte bis zu 1,8 % mittels der FACS-Analyse nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen Melanozyten und Fibroblasten konnten im FSC/SSC festgestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit Fibroblasten auszusortieren, ist der Einsatz des Zellsorters. Die Sortierung von Melanozyten am FACS-Vantage bedeutet aber eine starke Beanspruchung der Zellen und würde dadurch evtl. ebenfalls große Zellverluste nach sich ziehen.

Als Transfektionsmethode für primäre Melanozyten wurde aufgrund der einfachen Handhabung zuerst die Lipofektion mittels pEGFP getestet. pEGFP-N1 erwies sich als geeignetes Reportergen, die Transgenexpressionen konnte mit wenig Aufwand fluorzenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Mit 2  $\mu$ g Plasmid-DNA wurde 24 h nach Transfektion mit Lipofectamine 2000  $1,9 \pm 1,7$  %, mit FuGene 2,0  $\pm 0,8$  % und mit Metafectene  $0,5 \pm 0,2$ % Transgenexpression erreicht. Beim Einsatz von 4  $\mu$ g Plasmid-DNA wurde 24 h nach Transfektion mit Lipofectamine 2000  $6,5 \pm 5,1$  %, mit FuGene 6  $1,7 \pm 0,9$  %, und mit Metafectene  $0,8 \pm 0,2$  % Transgenexpression erreicht. Diese Werte decken sich mit der Literatur [81] und erreichten bei der Lipofektion von primären Melanozyten mit pEGFP Transfektionseffizienzen zwischen 2,1 % und 4,2 %. Eine Steigerung der Transfektionseffizienzen bei liposomalen Methoden wäre mit einer Optimierung des DNA-Liposomen Verhältnisses und dem Austesten des optimalen Transfektionszeitpunktes (Konfluenz) möglich.

Weiterhin wurde die speziell für die Transfektion von primären Zellen entwickelte Methode der Nukleofektion getestet. Mit diesem Verfahren konnten bis zu 39 % Transgenexpression (pEGFP) 24 h nach Transfektion erzielt werden. Hamm et al. 2002 erhielten mittels Nukleofektion Transfektionseffizienzen bis zu 44,4 %. Auch hier ist eine Steigerung der Transgenexpression durch das Austesten mehrerer DNA-Konzentrationen zu erwarten. Auffällig waren die Fehlerbereiche bis zu 50% innerhalb der einzelnen Transfektionen. Ursache für diese hohen Fehlerbereiche könnte die Verwendung von Zellen verschiedener Spender in verschiedenen Passagen sein. Ebenso spielten das Alter des Spenders und die damit verbundene Proliferationsrate der Zellen eine Rolle.

Trotz der unterschiedlichen Plasmidgröße von pEGFP-N1 und pRK5-HER-mrk wurden mit den gleichen Methoden übertragbare Ergebnisse erreicht.

Die in der Literatur beschriebene gesteigerte Transfektionseffizienz durch die Verwendung endotoxinfreier DNA konnte nicht bestätigt werden [29; 187; 189]. Der Vergleich von endotoxinhaltiger und endotoxinfreier DNA bei sonst konstanten Bedingungen zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Transfektionseffizienz nach 24 Std. Gleich bleibend wurde der Verlauf der Transfektionseffizienz mit endotoxinfreier bzw. endotoxinhaltiger DNA betrachtet.

Ein weiterer Ansatz zum Einbringen der Plasmide in primäre Melanozyten wäre der Einsatz von viralen Vektoren. Diese Methode wird besonders zur Transfektion von primären Zellen häufig verwendet [82; 97; 168].

Der durchflusszytometrische Nachweis der Transgenexpression von pRK5-HER-mrk transfizierten Melanozyten mittels EGFR-AK als Primärantikörper und einem FITC-F<sub>ab</sub> als Sekundärantikörper erwies sich als geeignet. Die Autofluoreszenz bzw. die Isotypkontrolle zeigten bei jeder Analyse unauffällige Werte. Auch die Wildtypzellen zeigten keine Fluoreszenz nach Färbung mit dem FITC-gekoppelten EGFR-AK. Damit wurde eine unspezifische Bindung des Antikörpers an nicht-transfizierte Zellen ausgeschlossen. Die Transgenexpression der pRK5-HER-mrk transfizierten Zellen nach 24 h korrelierte mit dem zuvor durch eGFP erhaltenen Werten und lag bei 28 %.

Im weiteren Verlauf sank die Transgenexpression auf 8,2 % (ohne EGF) bzw. 9,8 % (mit EGF) nach 4 Tagen. 10 Tage nach Transfektion konnten deutliche Unterschiede bezüglich des prozentualen Anteils transfizierter Zellen beobachtet werden. Die Expression der unbehandelten Zellen sank auf 1,8 %, bei dem mit EGF-behandelten Zellen nur auf 8,2 %. Ursache dieser Schwankungen könnte in variierenden Spender und Passagenzahl der Zellen liegen. Bei ausreichender Zellzahl sollten für ein reproduzierbares Ergebnis gleiche Zellen des gleichen Spenders verwendet werden. Zur Bestimmung der Höhe der Proteinexpression können auch andere Nachweismethoden als die Durchflusszytometrie eingesetzt werden. Eignen würden sich hierbei molekularbiologische Methoden wie der Western Blot oder die Immunpräzipitation, die mit weniger apparativem Aufwand durchzuführen wären.

Zusätzlich könnten noch mehrere EGF-Konzentrationen zur Stimulation der transfizierten Zellen getestet werden, in der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen aus der Literatur übernommen [188].

Zur Bestimmung der Transformation von Melanozyten, wurde die Methode der Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodidfärbung ausgewählt. Es wurden 3 verschiedene Vorbehandlungsmethoden für primäre Zellen für die Zellzyklusanalyse getestet. Am besten geeignet erwies sich die an Fibroblasten getestete Methode im Zell-Lysepuffer. Die erhaltenen Histogramme konnten mittels des Programms ModFit ausgewertet werden. Bei der Auswertung in ModFit wurden die Peaks der einzelnen Zellzyklusphasen definiert, da die automatische Auswertefunktion des Programms kein auswertbarer Peak ergab.

Die ermittelten Werte der S-Phase bei Transfektion 1 nach 4 Tagen zeigten bei den transfizierten, stimulierten Zellen gegenüber den nicht stimulierten Zellen (6,5 %) einen erhöhten Wert (13,3 %). Auch die Positivkontrolle wies einen hohen S-Phasen Wert auf (14,0 %). Die Negativkontrolle zeigte jedoch ebenso einen unerwartet hohen S-Phasen Wert (12,1 %). Ursache könnte ebenso die unterschiedlichen Spender und Passagenzahl sein.

Zum Nachweis der Transformation, kommen auch andere Methoden wie z.B. die Bestimmung des Zellzyklus mittels BrdU-Einbaus in Frage. BrdU kann als Thymidinanalogon verwendet werden, um die DNA-Syntheseraten zu bestimmen. Ein weiteres halogeniertes Basenanalogen, 5-Fluoro-2'Desoxyuridin (FdU) kann diese Competition von 5-BrdU mit Thymidin wieder stoppen. Durch eine kombinierte Messung der Gesamt DNA mit Ethidiumbromid kann diese Zweiparametertechnik durchflusszytometrische Studien in Subkompartimenten der S-Phase nach kurzer Inkubationszeit mit BrdU erlauben [114]. Dieser Nachweis der Zellproliferation über BrdU kann auch colorimetrisch (ELISA), über Immunfluoreszenz oder histochemisch erfolgen. Für diese Tests stehen Kits zur Verfügung. Der Abgleich der Daten der Transgenexpressionen 4 bzw. 10 Tage nach Transfektion der Melanozyten mit pRK5-HER-mrk mit den Daten der Zellzyklusanalyse (Anteil der Zellen in der S-Phase) lieferte kein aussagekräftiges Ergebnis. Dies kann auf Zellen verschiedener Spender oder/und verschiedener Passagen zurückzuführen sein.

Zur Spezifizierung der Ergebnisse, wurde eine Klonierung im Weichagar vorgenommen. Die Zellen zeigten jedoch kein Wachstum im Weichagar. Hier könnten die Versuchsbedingungen wie z.B. Verhältnis Agar-Medium, Temperatur des Agars optimiert werden. Weiterhin wurde versucht, eine Klonbildung einzeln ausgesäter Melanozyten in einer 6-Well Platte zu beobachten.

Es wurde Klonbildung beobachtet, bei der Zählung der Klone konnte jedoch kein Unterschied zwischen transfizierten, stimulierten Zellen und transfizierten, nicht-stimulierten Zellen bzw. Positiv- und Negativkontrolle erkannt werden. Die Beobachtungen einer Klonbildung der transfizierten bzw. transformierten Zellen waren somit wenig erfolgreich.

Für den Erhalt einer stabil transfizierte Zelllinie, wurden  $3,2 \times 10^6$  pRK5-HER-mrk transfizierte Melanozyten am FACS Vantage aussortiert. Die Sortierung wurde innerhalb der ersten 48 h nach Transfektion vorgenommen, da in den vorherigen Versuchen ermittelt wurde, dass in diesem Zeitfenster die Transgenexpression am höchsten war. Bei der Sortierung wurden 16,8 % positive Zellen gemessen, die mittels des „Enrich-Modus“ am FACS aussortiert wurden. Die Sortierung verlief steril, jedoch adhärten die Zellen nach der Sortierung nicht mehr. Auch eine Kultivierung über mehrere Wochen unter EGF-Stimulation zeigte keinen Erfolg. Ursache könnte ein zu hoher Druck sein, mit dem durch die Nukleofektion schon vorher geschädigten Melanozyten sortiert wurden.

Eine weitere Möglichkeit zum Erhalten einer stabil transfizierten Zelllinie wäre die Aussortierung am FACS-Vantage mit Einzelzellablage [114]. Hierbei wird vom Sorter eine Zelle pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte abgelegt; die Zellen werden nachher durch konditioniertes Medium in ihrem Wachstum unterstützt. Sollte die Sortierung die Zellen zu sehr schädigen, kann auch auf das Einbringen eines Aminoglykosid-Phosphotransferasegens (APH) in die Vektoren zurückgegriffen werden. Damit könnten untransfizierte Zellen durch Selektivmedium (Medium mit Zusatz von Geneticin 418, das die Proteinbiosynthese blockiert) aussortiert werden.

Mittels verschiedener Kultivierungsmethoden bzw. EGF- Stimulationen könnte mit anschließenden immunhistochemischen Versuchen die Invasivität der stabil transfizierten Zelllinie bestimmt werden. Der Erhalt einer solchen stabil transformierten Zelllinie bietet die Möglichkeit standardisierte und validierbare organoide *in vitro* Testsysteme aufzubauen. Gerade in der Krebsforschung zur schnellen Medikamentenentwicklung sind gut reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich der Wirkweise von Therapeutika von großem Nutzen [123].

### 6.1.3 *in vitro* Angiogenesemodell

In der vorliegenden Studie wurden mikrovaskuläre Endothelzellen aus humanen Präputien isoliert und *in vitro* kultiviert. Es gelang bisher mehreren Gruppen Endothelzellen großer Gefäße zu isolieren und zu kultivieren [75]. Die Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen hingegen, also von Endothelzellen aus Kapillaren, Arteriolen und Venulen, gelang erst sehr viel später. Die Kulturen dieser Zellen wurde vor allem aus dem Gehirn [24] der Haut [42], dem Fettgewebe [185], der Retina [65] dem Omentum [15] und dem Präputium [60] verschiedener Spezies, insbesondere aber von Mensch und Maus durchgeführt.

Bei der Züchtung von Endothelzellen ist mit Verunreinigungen durch Bindegewebszellen zu rechnen. Durch die Kombination verschiedener Methoden ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, reine Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen zu etablieren. Besondere Berücksichtigung wurde dabei auf:

- die Beschichtung der Kulturgefäße
- die Verwendung eines speziellen Nährmediums
- die Vermehrung unterschiedlich schnell adhärierender Zellen
- die morphologische Untersuchung der Zellen
- die Untersuchung von spezifischen Endothelmarkern am Mikroskop
- die Separation der Zellen mittels verschiedener Separierungsmethoden (MACS; unterschiedliche Adhärenzeigenschaften) und anschließende Kontrolle der Separation mittels Durchflusszytometrischer Analysen

gelegt.

In der Arbeit wurden die Zellkulturgefäße mit Kollagen Typ I beschichtet. Kollagen ist der Hauptbestandteil der Dermis und bietet damit den Endothelzellen ihrer natürlichen Umgebung ähnliche Wachstumsbedingungen. In anderen Studien werden verschiedene weitere Substrate, darunter Gelatine oder Fibronectin eingesetzt [150; 181]. Im Laufe der Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass für die Anzucht und Kultivierung der Endothelzellen unter Einsatz eines spezifischen Nährmediums keine Kollagenbeschichtung der Zellkulturflaschen notwendig war. Nach 2 und 30 Tagen Kultivierung ließen sich in die Länge gezogene Zellstrukturen beobachten. Diese Strukturen waren auch ohne Kollagenbeschichtung jedoch mit Zusatz von VEGF zu beobachten. VEGF gilt als der wichtigste proangiogene Wachstumsfaktor, der die Proliferation, Migration und

die Bildung kapillarähnlicher Strukturen von Endothelzellen bewirkt. VEGF wurde zum ECG-Medium in einer Konzentration von 10 ng/ml zugesetzt [94]. Weiterhin wurde das Wachstum von Endothelzellen durch die im Medium enthaltenen endothelialen Wachstumsfaktoren wie Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) und Heparin [101] begünstigt.

### **Reinkulturgewinnung von Endothelzellen**

Wichtig beim Aufbau von organoiden Testsystemen ist es Reinkulturen der verwendeten Zellen einzusetzen. Entscheidend für den Aufbau der 3-D Modelle ist der Einsatz von den jeweiligen spezifischen Zelltypen. Nur so können die Systeme gewährleisten, dass sie einen der *in vivo* ähnlichen Aufbau zeigen und auch auf externe Stimuli in einer der natürlichen Situation vergleichbarer Antwort reagieren können.

Vor diesem Hintergrund ist die Beseitigung von nicht-endothelialen Zellen aus Endothelzell-Kulturen wichtig. Im Gegensatz zu anderen Zelltypen adhären Endothelzellen sehr schnell an Kulturgefäße [31; 48]. Dennoch reichen geringe nicht endotheliale Zellmengen, die während der Isolation mitgeschleppt werden aus, um die langsam wachsenden Endothelzellen zu überwachsen [77; 99; 174]. Dabei handelt es sich meistens um fibroblastäre Zellen. Zur Beseitigung dieser kontaminierenden Zellen wurden folgende Methoden ausgetestet:

- Separation mit PBS<sup>-</sup>/EDTA
- MACS
- unterschiedliche Adhärenzeigenschaften

In mehreren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Bindegewebszellen empfindlicher auf PBS/EDTA reagieren als Endothelzellen. Diese einfache Methode in Kombination mit der schnelleren Adhärenz von Endothelzellen an Gefäßkulturflaschen wurde als effizienteste Methode zur Gewinnung von Reinkulturen eingesetzt. Mit PBS<sup>-</sup>/EDTA wurde eine Anreicherung von 77,14 % CD 105 FITC positiven Zellen auf 97,09 % CD 105 FITC positiven Zellen erreicht. Eine andere Möglichkeit der Reinkulturgewinnung ist die Aufreinigung mit der MACS Methode. Für diese Separation sind allerdings Zellzahlen von 13 Mio. Zellen/ml erforderlich. Zudem bleiben durch Verklumpungen und unspezifische Bindungen Zellen an der Säule gebunden oder konnten nicht vollständig ausgewaschen werden. Nach der MACS Separation ist eine anschließende



Weiterkultivierung der Zellen notwendig, was eine Erhöhung der Passagenzahl zu Folge hat. Da sich jedoch die Zellen der 2. Passage als stark proliferativ erwiesen haben, wurde diese Passage als optimal für die zelluläre Erweiterung in das Hautäquivalent angesehen. Als eine weitere Möglichkeit der Elimination von Fibroblasten stellt die Sortierung am Zellsorter dar. Dies bedeutet allerdings eine starke Beanspruchung der Zellen und führt dadurch zu sehr großen Zellverlusten.

### **Charakterisierung von Endothelzellen**

Endothelzellen stellen eine sehr heterogene Population dar. Unterschiede bestehen zwischen Endothelzellen verschiedener Spezies, verschiedenen Alters und Geschlechts, verschiedener Gewebe sowie großer und kleiner Gefäße [124]. Allein die morphologische Betrachtung einer Zellkultur, insbesondere von primär isolierten Endothelzellen reicht nicht aus um die Reinheit dieser Kultur zu bestätigen. Der Phänotyp der Endothelzellen ist nicht stabil und verändert sich, wenn sie aus dem umgebenden Milieu entfernt werden [19; 195]. Es ist daher unumgänglich die Zellen aufgrund ihrer Expressionsmarker zu identifizieren. Da es aber keinen einzigen Marker gibt der ausschließlich für Endothelzellen positiv reagiert und da andererseits Endothelzellen den einen oder anderen Marker nicht exprimieren, muss auf die Kombination mehrerer Endothelzellmarker zurückgegriffen werden [150].

Die Endothelzellen wurden nach Aufreinigung zunächst morphologisch anhand von Subkulturen bis zur 5. Passage charakterisiert. In der Subkultur der 2. Passage zeigten eine deutliche morphologische Veränderungen. Zu beobachten war die Ausbildung von lang gestreckten Zellformen und vereinzelt Zellfortsätzen sowie die Aneinanderreihung einzelner Endothelzellen. Laut Literatur [179] ist diese Beobachtung ein Kriterium für die Migration und Proliferation der Endothelzellen. Solche Kontakte zu anderen Zellen und die Ausbildung von Zellfortsätzen konnten nicht zwischen allen Zellen und in jeder Passage beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass sich die Endothelzellen in anderen Entwicklungsstadien innerhalb einer Kultur befinden [157].

Als Endothelzellmarker werden die Fähigkeit der Zellen den von Willebrand Faktor (vWF), das Oberflächenprotein CD 31 und den Proliferationsmarker CD 105 zu exprimieren, eingesetzt. Der vWF wird in Endothelzellen, jedoch auch in Makakaryozyten und Blutplättchen exprimiert [69]. Er wird einerseits als

hochspezifischer Marker für Endothelzellen *in vivo* und *in vitro* angesehen [95], andererseits wird der vWF auch als schlechter Marker bezeichnet [124]. Außerdem exprimieren nicht alle Endothelzellen den vWF [43].

Aufgrund dieser Literaturdaten und der Isolation von Endothelzellen aus Präputien, die zu den vWF positiven Zellen gehören [95], wird in der vorliegenden Arbeit der vWF als geeigneter Marker angesehen. Die Expression des vWF zeigte jedoch quantitative Unterschiede. Nach mehreren Passagen konnte eine Abnahme der Expression beobachtet werden. Eine deutliche Verringerung konnte ab der 5. Passage festgestellt werden, was auf eine Alterung der Zellen durch die Passagierung zurückführbar sein könnte. Die Auswertungen der morphologischen als auch immunhistologischen Untersuchungen dienen als Qualitätsurteil für den Einsatz und die Integration der Endothelzellen in das Hautäquivalent.

### **Integration der Endothelzellen in das 3-D Hautmodell**

Für die Integration der Endothelzellen in das Hautäquivalent wurden die Zellen in den Medien, die für den Aufbau des Hautäquivalents und der verschiedenen Zelltypen verwendet wurden, getestet. Dabei stellte sich ein sehr geringes Wachstum der Endothelzellen im Airlift-Medium und im KGM-Medium heraus. Dies Verhalten kann an den fehlenden Wachstumsfaktoren für Endothelzellen im Medium liegen.

Mit der Integration von Melanomzellen und Endothelzellen in das Hautäquivalent soll ein *in vitro* Angiogenesemodell entwickelt werden. Das Melanom der Haut, ein hochmaligner Tumor mit steigender Inzidenz, ist bekannt für seine Metastasierungsfähigkeit [87]. Solche solide Tumoren bestehen aus einer Mischung neoplastischer und non-neoplastischer Zellen. Ein solider Tumor kann somit als ein komplexes Gewebe betrachtet werden, das zwar irregulär strukturiert ist, dessen Funktion jedoch durch dynamische Interaktionen zwischen neoplastisch veränderten und normalen Zellen aufrecht erhalten werden [83]. Lokale Tumorprogression und Metastasierung sind nur möglich durch die engen Interaktionen beider Komponenten. Das den Tumor umgebende Stroma besteht hauptsächlich aus mikrovaskulären Endothelzellen und Bindegewebe. Von diesem umgebenden Gewebe werden dem Tumor Wachstumsfördernde stromale Faktoren vermittelt. Nur im Zusammenspiel dieser Zelltypen ist es dem Tumor möglich zu metastasieren. Hierfür bieten sich 3-D Modelle an, einerseits um die

Zell-Zell Interaktionen und andererseits die Tumorinduzierte Angiogenese zu untersuchen. Weiterhin sind solche Modelle geeignet, um Untersuchungen zur Hemmung der Invasion und des Tumorwachstums als neue Therapeutika in der Krebstherapie durchzuführen. In der Literatur werden aktivierte Endothelzellen in ein 3-D Substrat, das aus extrazellulären Matrixkomponenten, wie Kollagen oder Fibrin [28] besteht, eingesetzt. Die Endothelzellen können dabei von einem Gel überschichtet werden [146; 169], auf einem Gel [135; 136] oder zwischen zwei Gelschichten („Sandwich“) kultiviert werden [32; 134].

In dieser Arbeit wurde die „Sandwich“ Kultivierung angewandt. Dafür sind die Keratinozyten getrennt auf einer Kollagenmatrix kultiviert und vor Abschluss zur Vervollständigung des Hautmodells als Deckgel auf den mit Endothelzellen und Melanomzellen erweiterten dermalen Anteil aufgesetzt worden. Die Ausbildung des mehrschichtigen epidermalen Anteils war jedoch lückenhaft. Bestätigt wird dieses Ergebnis mit der Literatur, die den Wachstumsfaktoren und Interleukinen einen erheblichen Anteil an der korrekten Ausbildung des epidermalen Aufbaus zuweisen [63].

Eine Kultivierungsdauer von 40 Tagen im Kollagengel erwies sich als essentiell für die Ausbildung von tubulären und spindelförmigen Strukturen der Endothelzellen. Dies konnte durch die separate Kultivierung des mit Endothelzellen erweiterten dermalen Anteils erreicht werden. Der epidermale Anteil wäre für die Dauer der Kultivierung von 40 Tagen nicht geeignet, da die Keratinozyten ausdifferenzieren. Der Zusatz von VEGF bewirkte eine verstärkte Migration, Proliferation und lumenähnliche Strukturausbildung der Endothelzellen. Durch die immunhistologische Detektion des PCNA für proliferierende Melanomzellen zeigte sich eine eindeutige Anordnung dieser Zellen im endothelialen Bereich. Dieser Befund wird durch die Literatur unterstützt, demzufolge sich Tumorgefäße aus den umliegenden bereits bestehenden Gefäßen entwickeln [61]. Alle bislang beschriebenen 3-D Modelle basieren auf der Fähigkeit, dass aktivierte Endothelzellen in eine 3-D Matrix einwandern. Als Matrix dienen hier vor allem Kollagen- oder Fibringele oder das Matrigel® [32; 134; 135; 146; 169]. Untersuchungen der Angiogenese an *in vitro* Testsystemen lieferten signifikante Einblicke in die zellulären und molekularen Kontrollmechanismen der Angiogenese [96]. Der klinische Einsatz der pro- und antiangiogenetischen Faktoren ist derzeit noch limitiert. Es ist noch nicht bekannt, in welcher Phase der

angiogenen Kaskade sie die Angiogenese beeinflussen. Ebenso sind auch Kenntnisse über die Konzentration der Substanzen, die zur Beeinflussung der Angiogenese notwendig sind, essentiell für den klinischen Einsatz [96]. Dieses *in vitro* Angiogenesemodell kann hier Abhilfe schaffen.

#### **6.1.4 *in vitro* Modell für Infektion und Adhäsion**

Die grundlegenden Komponenten der humanen Haut sind im vorliegenden System vorhanden. Das Epithel stellt als geschlossener Verband die eigentliche Infektionsbarriere dar. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass im Modellsystem die Virulenz von *Candida albicans* ähnlich wie im Tiermodell beschrieben werden kann. Zwei virulente Faktoren, einmal die Adhäsion und zum zweiten die Invasion, wurden als die zentrale Ereignisse für die Pathogenese von Bakterien und Pilzen identifiziert. Sie stützen die These von Lo et al. (1997) dass die Virulenz in erster Linie mit der Bildung von Hyphen assoziiert ist. Ein Vergleich der Infektionsabläufe der Stämme Can 16 und dem Wildtyp bestätigt diese Aussage. Hyphal wachsende Zellen durchdringen das Epithel innerhalb von 18 h – 24 h und durchwachsen die Gelmatrix in vertikaler Ausrichtung. Die Stämme Can 34 und Can 16 hatten nur geringe Auswirkungen bzgl. Invasion. Es konnte jedoch eine oberflächliche Kolonisierung des Modells durch Can 34 und Can 33 beobachtet werden. Der Stamm Can 33 bildete keine Hyphen innerhalb 24 h aus und war somit nicht fähig das *Stratum corneum* zu durchdringen. Das Modell verhält sich analog zum Tiermodell und kann somit dieses substituieren. Mit Hilfe des Modells können Untersuchungen zur Virulenz von Candidamutanten im Vergleich zum Wildtyp unternommen werden. Die Wirkweise von Medikamenten auf dem Invasionsvorgang einzelner Stämme kann direkt untersucht werden. Auf molekularer Ebene können Expressionsprofile von Pathogenen und Zellkomponenten des Modellsystems erfasst und ausgewertet werden.

Die Anheftung an Oberflächen ist eine bedeutende Eigenschaft, die es *Candida albicans* ermöglicht menschliches Gewebe und Implantate zu besiedeln. Mit der Analyse des Adhäsionsvorgangs in einer definierten *in vitro* Umgebung können Daten zum besseren Verständnis von Adhäsionsvorgängen gewonnen werden. Hierzu existieren unterschiedliche Methoden. Das beschriebene Infektionsmodell ermöglicht grundlegende Experimente zur Adhäsion. Vereinfachte Modelle, die in Vorarbeit zum Infektionsmodell entstanden sind, erfüllen diese Aufgabe ebenfalls.

Die Anheftung von *Candida albicans* an Oberflächen ist neben der Infektion der zweite wichtige Virulenzfaktor. Pilzzellen, die eine verminderte Fähigkeit zur Anheftung besitzen zeigen geringe Virulenz [71; 138; 183].

In der Virulenten Form von *Candida albicans* sind die zwei Transkriptionsfaktoren Efg1p und Cph1p als wichtig für die Pathogenese charakterisiert worden [115]. Für detaillierte Einblicke in die genauen Vorgänge der Invasion oder Adhäsion von *Candida albicans* wurde ein 3-D Hautäquivalent entwickelt.

Die Barrierefunktion der Haut übernimmt das *Stratum corneum*, gleichzeitig dient diese Barriere auch als ein Schutz gegen die Invasion von Fremdstoffen wie z.B. Pilzen [105]. Das in dieser Studie verwendete klinische Isolat Sc5314, konnte jedoch die Hornschicht durchdringen und führte zu einer Infektion [166]. In ähnlichen Untersuchungen von Korting [105] und Schaller [166] wurden Hautäquivalente als Testsysteme auf Invasion durch *Candida albicans* herangezogen. Diesen Systemen fehlte jedoch die dermale Komponente mit Fibroblasten. Für eine gut ausgebildete epidermale Zellschicht mit allen differenzierten Zelllagen sind die dermalen Komponenten erforderlich [121; 176]. Die Kollagenmatrix bietet zum einen die Möglichkeit den Invasionsprozess mit bildgebenden Verfahren zu visualisieren und die Gewebe histologisch zu untersuchen.

Mit dem *in vitro* Testsystem konnte die unterschiedliche Invasivität der *Candida* Stämme nachgewiesen werden. Deletionen in beiden Transkriptionsfaktoren von CPH1 und EFG1, wie sie in Can 34 auftraten, hatten additive Effekte [47]. Can 34 zeigte keine Adhäsion an das Gewebe und war nicht invasiv. Diese Beobachtungen stimmten überein mit Untersuchungen, die von Andrutis et al. (2000) und Phan et al. (2000) hierzu erhoben wurden.

## 7 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1: Schematische Darstellung der Methode des Tissue Engineering.....   | 7  |
| Abb. 2: Schematische Darstellung der in Tissue Engineering involvierten Disziplinen. ....  | 8  |
| Abb. 3: Schematischer Querschnitt durch die humane Epidermis. Im Stratum basale stehen die Zellen säulenförmig auf der Basalmembran und sind über Hemidesmosomen mit dieser verbunden. Über Desmosomen stehen die Zellen untereinander in Kontakt. Nach dem Beginn der Differenzierung wandern die Keratinozyten in das Stratum spinosum und das Stratum granulosum. Es kommt zur Synthese von Keratohyalin und zur Bildung von Keratinosomen. Das Stratum corneum besteht aus multilamellaren interzellulären Lipidschichten, in die die ausdifferenzierten Keratinozyten (Korneozyten) eingebettet sind. Modifiziert nach Fritsch, 1990 [67]. .... | 12 |
| Abb. 4: Isolierung verschiedener Zelltypen aus der Haut (Quelle: Boelsma [17]). ....   | 16 |
| Abb. 5: Modelle zur Untersuchung von Gewebefunktion .....  | 20 |
| Abb. 6: Die Basalzellschicht ist zerstört und wird durch Abflachen und Migration der wundnahen Keratinozyten wieder hergestellt (Quelle: Martin [122]). ....   | 23 |
| Abb.7: Plasmidkarte des Vektors pEGFP-N1 und dessen Multiple Cloning Site (MCS). ....  | 39 |
| Abb.8: Plasmidkarten der Vektoren pRK5-HER-mrk und pRK5-Xmrk-ATP. ....   | 40 |
| Abb.9: MACS-System [132]. ....   | 43 |
| Abb.10: Isolierung von humanen epidermalen und dermalen Zellen aus Vorhäuten. ....   | 50 |
| Abb.11: Schematischer Aufbau des Basishautmodells. ....  | 67 |
| Abb.12: Schematische Darstellung des Aufbaus. ....   | 70 |
| Abb.13: Schema zum Aufbau des in vitro Angiogenesemodells. ....  | 71 |
| Abb.14: Phasenkontrastaufnahme primärer Keratinozyten (A) und Fibroblasten (B). Die Keratinozyten zeigen ein klonales Wachstum, die Fibroblasten zeigen die typische Fibroblastenmorphologie und einen konfluenten Zellrasen. ....   | 75 |
| Abb.15: Phasenkontrastaufnahmen von primären humanen Melanozyten nach verschiedenen Zeitpunkten, Tag 2 und Tag 7 zeigt die Primärkultur, Tag 11 und Tag 15 die 1. Passage. ....  | 76 |
| Abb.16: Phasenkontrastaufnahme primärer humaner Melanozyten der 1. Passage, isoliert aus Präputien eines negriden (A) und eines kaukasischen Spenders (B). ....  | 77 |
| Abb.17: Lichtmikroskopische Aufnahme auf Chamber Slides fixierter humaner Melanozyten, gefärbt mit MART-1. Ungefärbte Zellen sind Fibroblasten. ....   | 77 |
| Abb.18: Phasenkontrastaufnahme einer Primärkultur von Endothelzellen: (A) Nach 3 Tagen Kultivierung (B) nach 7 Tagen Kultivierung. ....  | 78 |
| Abb.19: Phasenkontrastaufnahme von Endothelzellen: 2. Passage (A) und 3. Passage (B). ....   | 79 |
| Abb.20: Endothelzellen in der 2. Passage nach 2 Tagen Kultivierungen. (A) Endothelzellen auf Kollagen beschichteten Zellkulturflaschen + ECG-Medium, (B) Endothelzellen + ECG-VEGF-Medium, (C) Endothelzellen + ECG-VEGF-Medium nach 60 Tagen, Abb F entspricht Abb. C in 100-facher Vergrößerung. Abb. D entspricht Abb. A in 100-facher Vergrößerung, Abb. E entspricht Abb. B in 100-facher Vergrößerung. ....  | 80 |
| Abb.21: Immunzytologische Färbung mit vWF (A) Endothelzellen, 2. Passage; (B) Endothelzellen, 5. Passage. ....   | 81 |

|   |     |
|---|-----|
| Abb.22: Immunhistologische Färbung; (A) Endothelzellen, 2. Passage CD 31; (B) Endothelzellen, 2. Passage CD105.....   | 81  |
| Abb. 23: Wachstumskurve von mikrovaskulären Endothelzellen in verschiedenen Medien. ....  | 82  |
| Abb.24: Phasenkontrastaufnahme Separation mit PBS/EDTA-Lösung: (A) Endothelzellen mit Fibroblasten, (B) Inkubation mit PBS/EDTA der Endothelzellen -Fibroblasten Kultur; (C) Immunhistologische Färbung, vWF; (D) Reine Endothelzellen -Kultur.....                       | 84  |
| Abb.25: Density Plot (FSC/SSC) der Isotypkontrolle (IgG1-FITC), GATE ist die ausgewählte Hauptpopulation. ....  | 85  |
| Abb.26: Durchflusszytometrische Analyse einer Endothelzellen – Fibroblasten - Mischkultur, gefärbt mit CD 105 (FITC gekoppelt). ....  | 86  |
| Abb. 27: Wachstumskurve primärer humaner Melanozyten; ab dem 12. Tag wurde ein Fibroblastenwachstum (----) mikroskopisch festgestellt, was schließlich zum Überwachsen der Melanozyten führte. ....   | 88  |
| Abb.28: Phasenkontrastaufnahme einer Melanozytenkultur vor (A) und nach (B) MACS-Anwendung. ....  | 89  |
| Abb.29: Density Plot (FSC/SSC) der Isotypkontrolle (IgG1-FITC), HP ist die gatede Hauptpopulation. ....   | 89  |
| Abb.30: Durchflusszytometrische Analyse einer Melanozyten-Fibroblasten-Mischkultur, gefärbt mit einem Anti-Fibroblasten-AK (FITC-gekoppelt). ....   | 90  |
| Abb.31: Kontrollverdau der Plasmide pRK5-HER-mrk (1), pSP64-erbB (2) und RK5-Xmrk-ATP (3+4.).....   | 92  |
| Abb. 32: Links: Kontrollverdau des Plasmid pEGFP-N1 (3-fach Ansatz, links die Linearisierungen mit StuI. Rechts der Verdau mit SnaI und PvuII). Rechts: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HEK 293 Zellen, mittels Lipofectamine 2000 mit pEGFP-N1 transfiziert. .... | 92  |
| Abb.33: Durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis 24 h nach Transfektion primärer humaner Melanozyten (5. Passage) mit 2 µg pEGFP-N1 und 3 verschiedenen Transfektionsreagenzien auf Liposomenbasis. ....  | 94  |
| Abb.34: Transfektionseffizienzen der mit pEGFP-N1 transfizierten Melanozyten nach 24 h mit Ansätzen 2 verschiedener DNA-Konzentrationen und 3 verschiedene Reagenzien auf Liposomenbasis.....   | 95  |
| Abb.35: Durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der pEGFP-N1 Transgenexpression primärer humaner Melanozyten nach verschiedenen Zeitpunkten. Verwendet wurden 4 µg Plasmid-DNA und Lipofectamine 2000.....                                       | 96  |
| Abb.36: Durchflusszytometrische Analyse mit PI-Färbung zur Bestimmung des Anteils an toten Zellen der pEGFP-N1 transfizierten Melanozyten 4d nach Transfektion. ....  | 97  |
| Abb.37: Durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Nukleofektion (Programm U-20) primärer humaner Melanozyten mittels 2 bzw. 4 µg Plasmid-DNA (p-EGFP-N1). ....   | 98  |
| Abb.38: Durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Nukleofektion primärer humaner Melanozyten mit Programm U-16 bzw. U-20 und 4 µg Plasmid-DNA (p-EGFP-N1).....   | 99  |
| Abb.39: Durchflusszytometrischer Nachweis der pRK5-HER-mrk Transgenexpression primärer humaner Melanozyten nach 24 h. Verwendet wurden 4 µg Plasmid-DNA und Lipofectamine 2000 bzw. Nukleofektion mit Programm U-20 und 4 µg Plasmid-DNA. ....                            | 101 |
| Abb.40: Durchflusszytometrischer Nachweis der Transfektion pRK5-HER-mrk 3 nach 10 Tagen mit bzw. ohne Stimulation von EGF. ....   | 103 |
| Abb.41: Verlauf der Kinetik von pRK5-HER-mrk transfizierten Melanozyten in % der Transfektionsmethode 3. ....   | 103 |

---

|  |     |
|--|-----|
| Abb.42: Zellzyklusanalyse nach 3 verschiedenen Methoden. (A) zeigt die Density-Plots, B zeigt die Auftragung FL-A über FL-W (Zellen aussortiert auf die HP) und (C) die zugehörigen Histogramme. ....  | 105 |
| Abb.43: Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus der Wildtyp-Zellen.....   | 106 |
| Abb.44: FL2-Area/ FL-Width Density Plot in ModFit. Darstellung der Wildtyp-Zellen.....   | 107 |
| Abb.45: Histogramme der in ModFit 6.0 ausgewerteten Zellzyklusanalysen, 4 Tage nach Transfektion mit den entsprechenden Plasmiden (Transfektion 1). ....   | 108 |
| Abb.46: Durchflusszytometrische Einstellungen am FACS-Vantage für die Isotypkontrolle und Anti- EGFR-FITC für die anschließende Sortierung. ....   | 110 |
| Abb.47: Reanalyse der Sortierung: Positiv- und Negativfraktion. ....   | 111 |
| Abb.48: Wundheilungskinetik, Kontrolle (A), 24 h nach Verletzung (B), 48 h nach Verletzung (C), 72 h nach Verletzung (D).....  | 113 |
| Abb.49: PCNA-Expression im (A) unverletzten Hautäquivalent und (B) 48 h nach Verletzung. ....  | 114 |
| Abb.50: Expression von Zytokeratin 10 (A) 24 h und( B) 72 h nach Verletzung. ....  | 114 |
| Abb.51: Expression von Zytokeratin 16: (A) 24 h und (B) 72 h nach Verletzung. ....   | 115 |
| Abb.52: IL-1 $\alpha$ Gehalt in den Medienüberständen der Äquivalente zu unterschiedlichen Zeitpunkten. ....   | 115 |
| Abb.53: Genexpressionsanalyse: Hydroxyprostaglandindehydrogenase. ....   | 116 |
| Abb.54: Aufsicht auf Melanomäquivalente nach 7 und 14 Tagen Airlift-Kultivierung (A): ein Aggregat, (B): 5 Aggregate. ....   | 117 |
| Abb.55: Bildung von diffusem Infiltrat der BLM-Zelllinie (A); Bildung von Tumornestern durch die M 13-Zelllinie (B); Sk Mel 28 zeigt kein invasives Eindringen der Zelllinie in die Matrix (C). ....   | 117 |
| Abb.56: Melanome in vivo (A): Typ SSM,( B): Typ NM (HE-Färbung). ....  | 118 |
| Abb.57: Histologischer Schnitt, HE-Färbung; (A,B,C,D) zusammengesetztes in vitro Angiogenesemodell 4 Tage in Kultur wobei der dermale und endotheliale Anteil 42 Tage in Kultur und der epidermaler Anteil 17 Tage in Kultur gehalten wurden. .... | 119 |
| Abb.58: Paraffinschnitt, Immunhistologische Färbung mit Anti-vWF; Endothelzellen 41 Tage im Hautäquivalent in Kultur. (A) ohne VEGF – Zusatz; (B) mit VEGF – Zusatz.....   | 120 |
| Abb. 59: Infektion von Sc5314 (B) und bei Can 16 nach 48 h (D) (Abb. 59 B und D. Bei Can 33 ( $\Delta$ efg1) und Can 34 ( $\Delta$ cph1 $\Delta$ efg1) konnte keine Invasion festgestellt werden [47].....   | 121 |



## 8 Glossar

|               |  |
|---------------|--|
| pRK5-HER-mrk  | mit EGF-induzierbares Proto-Onkogen  |
| Adhäsion      | Anhaftung  |
| Angiogenese   | Gefäßneubildung  |
| Apoptose      | Programmierter Zelltod   |
| Aqua dest.    | Wasser, das keine Ionen mehr enthält   |
| Artifizuell   | künstlich  |
| autokrin      | In den Extrazellularraum Botenstoffe absondernd, die auf die absondernden Zellen selbst einwirken  |
| Basalmembran  | Extrazelluläre Schicht unterhalb der basalen Plasmamembran von Epithelzellen   |
|               | chicken chorioallantoic membrane assays  |
|               | Hühner Chorionallantois Membran, bei der an Tag 10 bis 13 nach Bebrütung des Hühnereis jeweils Pellets aus Methylzellulose mit den jeweiligen Testsubstanzen auf die vaskularisierte Chorionallantois Membran gesetzt werden |
| Blue caps     | Plastik Schraubdeckelgefäße  |
| CPH1          | Transkriptionsfaktor in <i>Candida albicans</i> , verantwortlich für Hyphenbildung   |
| Dermis        | Haut   |
| Desmosomen    | Zellstrukturen in Zellmembranen, die eine enge Verbindung zwischen zwei Zellen in einem tierischem Gewebe herstellen.  |
| Dispase       | Metalloprotease bakteriellen Ursprungs   |
| EFG1          | Transkriptionsfaktor in <i>Candida albicans</i> , verantwortlich für Hyphenbildung   |
| Endotoxin     | Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien   |
| Enzym         | Ist ein biochemischer Katalysator, der hilft, ein Substrat (Edukt) zu spalten oder anderweitig zu verändern  |
| Epidermis     | Oberhaut, äußerste Schicht der Haut  |
| Omentum       | Bauchnetz  |
| Epithelzellen | Zellen, die äußere und innere Oberflächen des tierischen Organismus bekleiden  |

---

|                     |  |
|---------------------|--|
| Fibrinolyse         | Blutgerinnselauflösung   |
| Filaggrin           | Antikörper gegen das verhornte Epithel   |
| Hemidesmosomen      | Zell-Matrixkontakte  |
| House keeping gene  | proteincodierende Gene, welche in jedem Zelltyp und in jedem Zellstadium exprimiert werden, im Gegensatz zu sogenannten regulierten Genen. Es sind typischerweise Gene, die mit dem Grundstoffwechsel, beispielsweise dem Glukose-Stoffwechsel, von Zellen zusammenhängt |
| Hyphen              | fädigen Zellaggregaten   |
| Immortalisierung    | Etablierung permanenter Zelllinien   |
| Implantate          | Materialien zur Unterstützung von Regenerationsvorgängen   |
| <i>in vitro</i>     | im Labor gezüchtet   |
| Inkubation          | Anzüchtung von Zellen  |
| Integrine           | Rezeptorproteine, die von Zellen genutzt werden, um an die extrazelluläre Matrix anzudocken und auf Signale von außen zu reagieren   |
| Interleukine        | Zellhormone  |
| Interzellulär       | zwischen den Zellen  |
| Intrazellulär       | in den Zellen  |
| Kokultur            | Kultivierung von mehreren unterschiedlichen Zelltypen  |
| Kollagen            | Prolinreiches Protein, Hauptbestandteil mesenchymaler extrazellulärer Matrix   |
| Kollagenase         | Kollagen-Spaltendes Enzym  |
| Mediatoren          | von Zellen freigesetzte Substanzen   |
| Melanom             | schwarzer Hautkrebs  |
| Melanozyten         | Spezieller Zelltyp der Haut. Enthält Melanin   |
| Metabolisierung     | Verstoffwechslung im Organismus  |
| Metastasen          | Bildung von Krebs-Tochtergeschwülsten  |
| MHC II              | Oberflächenprotein (major histocompatibility complex)  |
| Migration           | Wanderung  |
| Mutation            | Veränderter Chromosomensatz  |
| Neubauer Zählkammer | Spezieller Objektträger, mit exakt eingraviertem Gittersystem zur Bestimmung der Zellzahl  |

---

|                    |  |
|--------------------|--|
| Organ              | Funktionelle Einheit, z.B. Haut, Leber   |
| parakrin           | In den Extrazellularraum Botenstoffe absondernd, die nur auf benachbarte Zellen des gleichen Organs einwirken. Der Blutweg wird nicht eingeschaltet. |
| Phagozytose        | Aufnahme von größeren Nahrungspartikeln bis hin zu kleineren Zellen in eine einzelne eukaryontische Zelle.   |
| Primärkultur       | Kultur von aus einem Organismus unverändert gewonnenem Zell-oder Gewebematerial  |
| Proliferation      | Vermehrung durch Zellteilung   |
| Präputie           | Vorhaut  |
| Psoriasis          | Schuppenflechte  |
| Stratifizierung    | Hornschicht  |
| Stratum corneum    | Oberste Schicht der Haut   |
| Stratum granulosum | Zellschicht der Haut, in der Keratohyalin granula zu erkennen sind   |
| Subkultivierung    | Umsetzen von Zellen von einer Kulturflasche in eine neue Kulturflasche   |
| Systemisch         | den ganzen Organismus betreffend   |
| Tissue Engineering | Herstellung künstlicher Gewebe/Organe  |
| Transformation     | Änderung genetischer Eigenschaften durch Einbau fremder DNA-Stränge in das Genom der Wirtszelle  |
| Ubiquitär          | überall vorkommend   |
| Vaskularisierung   | Gefäßversorgung, Gefäßneubildung   |
| Vitiligo           | Weißfleckkrankheit   |
| Zelllinie          | Zellen, die aufgrund ihrer permanenten Zellteilungsfähigkeit kultiviert werden können  |
| Zytokeratin        | intrazelluläre Strukturproteine  |
| Zytokine           | Von Zellen gebildete Peptide mit Signalfunktion  |
| Zytotoxisch        | Giftig, schädigend für die Zelle   |

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] Andrutis K.A., Riggle P.J., Kumamoto C.A., Tzipori S. (2000)  
Intestinal lesions associated with disseminated candidiasis in an experimental animal model. *J Clin Microbiol.* 2000:2317-23.
- [2] Ansel J., Perry P., Brown J., Damm D., Phan T., Hart C., Luger T., Hefeneider S. (1990)  
Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol.* 1990:101-107
- [3] Asselineau D., Bernard B.A., Bailly C., Darmon M., Prunieras M. (1986)  
Human epidermis reconstructed by culture: is it "normal"? *J Invest Dermatol.* 1986:181-6
- [4] Augustin C., Frei V., Perrier E., Huc A., Damour O. (1997)  
A skin equivalent model for cosmetological trials: an in vitro efficacy study of a new biopeptide. *Skin Pharmacol.* 1997; 63-70
- [5] Baatout S. (1997)  
Endothelial differentiation using Matrigel (review). *Anticancer Res.* 1997: 451-5
- [6] Bach T.L., Barsigian C., Yaen C.H., Martinez J. (1998)  
Endothelial cell VE-cadherin functions as a receptor for the beta15-42 sequence of fibrin. *J Biol Chem.* 1998:30719-28
- [7] Bayless K.J., Salazar R., Davis G.E. (2000)  
RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. *Am J Pathol.* 2000:1673-83.
- [8] Bell E., Sher S., Hull B., Merrill C., Rosen S., Chamson A., Asselineau D., Dubertret L., Coulomb B., Lapiere C., Nusgens B., Neveux Y. (1983)  
The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol.* 1983:2-10.

[9] Berking C., Herlyn M. (2001)

Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology. *Histol. Histopathol.* 16(2):669-74 (2001)

[10] Berthod F., Auger FA.

In vitro application of skin substitutes for dermatological purposes. In Roubhia, M (Ed.): *Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications.* Landes Bioscience, Austin 211-237

[11] Bilbo P.R., Nolte CJ, Oleson MA, Mason V.S., Parenteau NL. (1993)

Skin in culture : the transition from culture phenotype to organotypic phenotype ; *J. Toxicol. – Cut. & Ocular. Toxicol.* 12(2): 183-196 (1993)

[12] Bjerke J.R., Tigalnova M. u. Matre R. (1994)

IgG-Fc receptors in stratum granulosum: an immunological defence in human skin ? *Acta. Derm. Venerol.* 74, 429-432

[13] Black A.F., Berthod F., L'Heureux N., Germain L. and Auger FA. (1998)

In vitro reconstruction of human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASB J* 12:1331-1340 (1998)

[14] Blume A., Jansen M., Ghyczy M. and Gareiss, J. (1993)

Interaction of phospholipid liposomes with lipid model mixtures for stratum corneum lipids. *Int.J.Pharm.* 99:219-228, 1993.

[15] Bochsler P.N., Slauson D.O., Chandler S.K., Suyemoto M.M. (1989)

Isolation and characterization of equine microvascular endothelial cells in vitro. *Am J Vet Res.* 1989: 1800-5

[16 ] Bodenham D.C. (1968)

A study of 650 observed malignant melanomas in the south-west region. *Ann R Coll Surg Engl* 43:218-239

[17 ] Boelsma E., Ponec M. in Dermatopharmacology of Topical Preparations (2000)  
Seiten 38-57Ed. Gabard, B., Springer Verlag

[18] Bohnert A., Hornung J., MacKenzie J., Fusenig N.E. (1989)  
Epithelial-mesenchymal interactions control basement membrane production and  
differentiation in cultured and transplanted mouse keratinocytes; Cell Tissue Res.  
244:413-429 (1989)

[19] Borsum T., Hagen I., Henriksen T., Carlander B. (1982)  
Alterations in the protein composition and surface structure of human endothelial  
cells during growth in primary culture. Atherosclerosis. 1982:367-78

[20] Bos J. D. (Hrsg.) (1990)  
Skin Immune System (SIS). 1.Aufl. CRC Press Incorporated, Boca Raton

[21] Bouwstra J.A. (1997)  
The skin barrier, a well-organized membrane. Colloids and Surfaces 123:403-413,  
1997.

[22] Bouwstra J.A., de Vries M.A., Gooris G.S., Bras W., Brussee J. and Ponec M.  
(1991)  
Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier. J.Contr.Rel. 15:209-220,  
1991.

[23] Bowers W., Blaha M., Alkhyat A., Sankovich J., Kohl J., Wong G., Patterson D.  
(1999)  
Artificial human skin: cytokine, prostaglandin, Hsp70 and histological responses to  
heat exposure. J Dermatol Sci. 1999; 172-82.

[24] Bowman P.D., Betz A.L., Ar. D., Wolinsky J.S., Penney J.B., Shivers R.R.,  
Goldstein G.W. (1981)  
Primary culture of capillary endothelium from rat brain. In Vitro. 1981:353-62

[25] Braun B.R., Johnson A.D. (2000)

TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*. 2000:57-67.

[26] Brown C.K., Kirkwood J.M. (2001)

Targeted therapy for malignant melanoma. *Curr. Oncol Rep* 3(4):344-352

[27] Brown K.J., Maynes S.F., Bezos A., Maguire D.J., Ford M.D., Parish C.R. (1996)

A novel in vitro assay for human angiogenesis. *Lab Invest*. 1996:539-55.

[28] Bruno Vailhé., Vittet D., and Feige J-J. (2001)

In Vitro Models of Vasulogenesis and Angiogenesis; *Lab Invest*. 2001:439-52

[29] Budryk M., Cichon T., Szala S. (2001)

Direct in vivo transfer of Plasmid DNA into murine tumors: effects of endotoxin presence and transgene localization, *Acta Biochim Pol*. 48(3):795-800 (2001)

[30] Calderon M., Lawrence WT., Banes A.J. (1986)

Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro. *J Surg Res*. 1996; 343-7

[34] Carson M.P., Haudenschild C.C. (1986)

Microvascular endothelium and pericytes: high yield, low passage cultures. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1986:344-54

[32] Chalupowicz D.G., Chowdhury Z.A., Bach T.L., Barsigian C., Martinez J. (1995)

Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation. *J Cell Biol*. 1995:207-15

[33] Chang, F., Swartzendruber, D.C., Wertz, P.W. and Squier, C.A. (1993)

Covalently bound lipids in keratinizing epithelia. *Biochim.Biophys.Acta* 1150:98-102, 1993.

[34] Clapp C., Martial J.A., Guzman R.C., Rentier-Delure F., Weiner R.I. (1993)

The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*. 1993:1292-9.

[35] Clark W.H Jr, Elder D.E., Guerry D. 4th, Epstein M.N., Greene M.H., Van Horn M. (1984)

A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 1984:1147-65

[36] Cole G.T., Halawa A.A., Anaissie E.J. (1996)

The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin Infect Dis.* 1996 :S73-88.

[37] Cooper M.L., Hansbrough J.F., Spielvogel R.L., Cohen R., Bartel R.L., Naughton G. (1991)

In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. *Biomaterials.* 1991; 243-8.

[38] Cormack B.P., Ghori N., Falkow S. (1999)

An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science.* 1999:578-82.

[39] Coulomb B., Lebreton C., Dubret L. (1989)

Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization; *J. Invest. Dermatol.* 92: 122-125 (1989)

[40] Coulomb B., Dubertet L., Merrill C., Touraine R., Bell E. (1984)

The collagen lattice: a model for studying the physiology, biosynthetic function and pharmacology of the skin. *Br J Dermatol.* 1984 Jul;111 Suppl 27:83-7

[41] Cowan F.M., Broomfield C.A. u. Smith W.J. (1998)

Sulfur mustard exposure enhances Fc reseptor expression on human epidermal keratinocytes in cell culture: implications for toxicity and medical countermeasures. *Cell Biol. Toxicol.* 14, 261-266

[42] Davison P.M., Bensch K., Karasek M.A. (1983)

Isolation and long-term serial cultivation of endothelial cells from the microvessels of the adult human dermis. *In Vitro.* 1983:937-45



- [43] DeBault L.E., Esmon N.L., Smith G.P., Esmon C.T. (1986)  
Localization of thrombomodulin antigen in rabbit endothelial cells in culture. An immunofluorescence and immunoelectron microscope study. *Lab Invest.* 1986:179-87
- [44] Dekker S.K., van Doorn R., Kempenaar J., Gruis N.A., Vermeer B.J., Ponc M. (2000)  
Skin equivalent: an attractive model to evaluate early melanoma metastasis. *Melanoma Res.* 2000:127-40
- [45] Didierjean L., Salomon D., Merot Y., Siegenthaler G., Shaw A., Dayer J.M., Saurat J.H. (1989)  
Localization and characterization of the interleukin 1 immunoreactive pool (IL-1 alpha and beta forms) in normal human epidermis. *J Invest Dermatol.* 1989:809-16
- [46] Diepgen T. L. and Mahler V. (2002).  
"The epidemiology of skin cancer." *Br. J. Dermatol.*, 146 Suppl 61, 1-6
- [47] Dieterich C., Schandar M., Noll M., Johannes F.J., Brunner H., Graeve T., Rupp S. (2002)  
In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion. *Microbiology.* 2002:497-506
- [48] Diglio C.A., Grammas P., Giacomelli F., Wiener J. (1988)  
Rat heart-derived endothelial and smooth muscle cell cultures: isolation, cloning and characterization. *Tissue Cell.* 1988;20(4):477-92
- [49] Donovan D., Brown N.J., Bishop E.T., Lewis C.E. (2001)  
Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis.* 2001;4(2):113-21.
- [50] Dummer R., Hess Schmid M., Burg B., Hafner J. (2002)  
Melanozytäre Nävi und kutanes Melanom, *Schweizer Medizin Forum* Nr. 10 (2002)

[51] Egelrud T. and Lundstrom A. (1991)

A chymotrypsin-like proteinase that may be involved in desquamation in plantar stratum corneum. Arch.Dermatol.Res. 283:108-112, 1991

[52] Eitel F. u. Sklarek J. (1988)

Wundheilung und Wundversorgung. Tierärztl. Prax. 16, 1-12

[53] Elias P.M., Cullander C., Mauro T., et al. (1998)

The secretory granular cell: the outermost granular cell as a specialized secretory cell. J.Invest.Dermatol. 3:87-100, 1998.

[54] Elias P.M., Nau P., Hanley K., et al. (1998)

Formation of the epidermal calcium gradient coincides with key milestones of barrier ontogenesis in the rodent. J.Invest.Dermatol. 110:399-404, 1998

[55] Falanga V., Isaacs C., Paquette D., Downing G., Kouttab N., Butmarc J., Badiavas E., Hardin-Young J. (2002)

Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. J Invest Dermatol. 2002:653-60

[56] Falanga V.J. (2000)

Tissue engineering in wound repair. Adv Skin Wound Care. 2000:15-9

[57] Falkenberg F.W., Weichert H., Krane M., Bartels I., Nagels H.O., Behn I., Fiebig H.

In-vitro-Produktion von monoklonalen Antikörpern in hohen Konzentrationen in neuen und einfach bedienbaren Modular-Minifermenter in Forschung ohne Tierversuche-1995, Edit.: Schöffl, H., Spielmann, H., Tritthahn, H.A., Cußler, K., Fuhrmann, U., Goetschl, A.F., Gruber, A.F., Heusser, C., Möller, H., Ronneberger, A., Vedani, A. Wien-New York Springer Verlag

[58] Folkman J and Brem H. (1992)

Angiogenesis and inflammation. In Gallin J.L., Goldstein I.M. and Snyderman R.S., editors. Inflammation: Basic principles and clinical correlates. New York: Raven Press, 809-839 (1992)

[59] Folkman J. and Klagsbrun M. (1987)

Angiogenic factors. Science 235: 442-447 (1987)

[60] Folkman J., Haudenschild C.C., Zetter B.R. (1979)

Long-term culture of capillary endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979:5217-21

[61] Folkman J. (1985)

Tumor angiogenesis: therapeutic implications; New England J Med, 285: 1182-1186 (1985)

[62] Fonzi W.A., Irwin M.Y. (1993)

Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. Genetics. 1993:717-28.

[63] Form D.M., Pratt B.M., Madri J.A. (1986)

Endothelial cell proliferation during angiogenesis. In vitro modulation by basement membrane components; Laboratory Investig., Vol. No. 5, p. 521, 1986

[64] Frank R.N., Kinsey V.E., Frank K.W., Mikus K.P., Randolph A. (1979)

In vitro proliferation of endothelial cells from kitten retinal capillaries. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1979:1195-200

[65] Fransson J., Hammar H. (1992)

Epidermal growth in the skin equivalent. Arch Dermatol Res. 1992;284(6):343-8

[66] Freshney R. I. (2000)

Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Techniques, 4th Ed. New York, NY, Wiley & Liss, Inc

[67] Fritsch, P. Dermatologie, Berlin, Heidelberg, New York:Springer-Verlag, 1990

[68] Fuchs E. (1990)

Epidermal differentiation: the bare essentials; J. Cell Biol. 111:2807-2814 (1990)

[69] Gabrane-Younes J., Drouet L., Caen J.P., Orcel L. (1988)

Weibel-Plade bodies in pig megakaryocytes. Biol Struct Morphogen 1:58-62

[70] Gailit J., Clark R.A. (1994)

Wound repair in the context of extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol. 1994:717-25

[71] Gale C.A., Bendel C.M., McClellan M., Hauser M., Becker J.M., Berman J., Hostetter M.K. (1998)

Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. Science. 1998 Feb 27;279(5355):1355-8.

[72] Gallico G.G 3rd, O'Connor N.E., Compton C.C., Kehinde O., Green H. (1984)

Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. N Engl J Med. 1984; 448-51

[73] Garlick J.A., Taichman L.B. (1994)

Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. Lab Invest. 1994:916-24

[74] Gay R., Swiderek M., Nelson D., Ernesti A. (1992)

The skin equivalent a model in vitro for ranking the toxic potential of derma irritans. Toxic in Vitro, 6: 303-315

[75] Gerlach E., Nees S., Becker B.F. (1985)

The vascular endothelium: a survey of some newly evolving biochemical and physiological features. Basic Res Cardiol. 1985:459-74

- [76] Gibbs S., Boelsma E., Kempenaar J. and Ponec M. (1998)  
Temperature-sensitive regulation of epidermal morphogenesis and the expression of cornified envelope precursors by EGF and TGF alpha. *Cell Tissue Res.* 292:107-114, 1998
- [77] Gimbrone M.A Jr., Cotran R.S., Folkman J. (1974)  
Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol.* 1974:673-84.
- [78] Gomez A., Wellbrock C., Gutbrod H., Dimitrijevic N., Scharf M. (2001)  
Ligand-independent dimerization and activation of the Oncogenic Xmrk Receptor by two Mutations in the Extracellular Domain, *J. Biol. Chem.* 276(5):3333-40 (2001)]
- [79] Grando S.A., Crosby A.M., Zelickson B.D., Dahl M.V. (1993)  
Agarose gel keratinocyte outgrowth system as a model of skin re-epithelization: requirement of endogenous acetylcholine for outgrowth initiation. *J Invest Dermatol.* 1993; 804-10
- [80] Green H., Rheinwald J.G. u. Sun T.-T. (1977)  
Properties of an epithelial cell type in culture: the epidermal keratinocyte and its dependence on products of the fibroblast. *Cell Shape Surf. Arch.* 493-500
- [81] Hamm A., Krott N., Breibach I., Blindt R., Bosserhoff AK. (2002)  
Efficient transfection method for primary cells, *Tissue Eng* 8(2):235-45
- [82] Hamoen K.E., Borel I.H., Rinkes, Morgan J.R. (2001)  
Hepatocyte growth factor and melanoma: gene transfer studies in human melanocytes, *Melanoma Res.* 11(2):89-97 (2001)
- [83] Hanahan D., Bergers G., Bergsland E. (2000)  
Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2000:1045-7

[84] Hans G. Schlegel 7. überarbeitete Auflage, 1992, Thieme Verlag

[85] Hazen K.C., Brawner D.L., Riesselman M.H., Jutila M.A., Cutler J.E. (1999)  
Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. *Infect Immun.* 1999:907-12

[86] Hazen K.C. (1989)

Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infect Immun.* 1989:1894-900

[87] Herlyn M., Thurin J., Balaban G., Bannicelli J.L., Herlyn D., Elder D.E., Bondi E., Guerry D., Nowell P., Clark W.H., et al. (1985)

Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. *Cancer Res.* 1985 Nov;45(11 Pt 2):5670-6.

[88] Hobson B., Denekamp J. (1984)

Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer.* 1984:405-13

[89] Hoffman R.M. (1993)

In vitro assays for chemotherapy sensitivity. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1993 99-111

[90] Hoffmann-Wellenhof R., Seidl H., Fink-Puches R., Helige Ch., Smolle J., Kerl H., Tritthart H.A. (2003)

Dreidimensionale in vitro-Invasionsmodelle: neue Evaluierungsmethoden (2003)

[91] Holbrook K.A. (1994)

Ultrastructure of the epidermis; In: *The Keratinocytes Handbook* von I. Leigh, B. Lane, F. Watt; Cambr. Univ. Press, 71-94 (1994).

[92] Hunt K.H. u. Mitarb. (1984)

Studies of inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery* 96, 48-54

[93] Jäckle R. und Seifert B. (1990)

Salutas Lexikon Dermatologie; Urban & Schwarzenberg, München (1990)

[94] Jacques E. Nör, Joan Christensen, David J. Mooney, and Peter J. Polverini

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression; American Journal of Pathology, Vol. 154, No. 2

[95] Jaffe E.A. (1988)

Synthesis of von Willebrand factor by endothelial cells. In: Endothelial cells. Vol I (Ryan US, ed) CRC Press, Boca Raton, FL, 119-128

[96] Jain R.K., Schlenger K., Höckel M., Ynan F. (1997)

Quantitative angiogenesis assays: Progress and problems. Nature Med. 3: 1203 – 1208

[97] Jensen U.B., Petersen M.S., Lund T.B., Jensen T.G., Bolund L. (2000)

Transgene Expression in human epidermal keratinocytes: cell cycle arrest of productively transfected cells, Exp. Dermatol. 9(4): 298-310).

[98] Jones P.H. (1996)

Isolation and characterization of human epidermal stem cells. Clinical Science 91:141-146.

[99] Karasek M.A. (1989)

Microvascular endothelial cell culture. J Invest Dermatol. 1989:33-38

[100] Kirkwood J.M., Ibrahim J.G., Sondak V.K., Ernstoff M.S., Ross M. (2002)

Interferon alfa-2a for melanoma metastases. Lancet 359(9310):978-979

[101] Klagsbrun M, D'Amore PA. (1991)

Regulators of angiogenesis. Annu Rev Physiol.; 53:217-39.

[102] Knopf B. u. U. Wollina (1990)

The keratinocyte – a biologically active cell Dermatol. Monatsschr. 176, 453-459

[103] Koblizek T.I., Weiss C., Yancopoulos G.D., Deutsch U., Risau W. (1998)  
Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol.*:529-32.

[104] Konstantinova N.V., Duong D.M., Remenyik E., Hazarika P., Chuang A., Duvic M. (1996)  
Interleukin-8 is induced in skin equivalents and is highest in those derived from psoriatic fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1996 Oct;107(4):615-21

[105] Korting H-C., Patzak U., Schaller M., Maibach H.I. (1998)  
A model of human cutaneous candidosis based on reconstructed human epidermis for the light and electron microscopic study of pathogenesis and treatment. *J Infect.*:259-67

[106] Kroon M.E., Koolwijk P., van Goor H., Weidle U.H., Collen A., van der Pluijm G., van Hinsbergh V.W. (1999)  
Role and localization of urokinase receptor in the formation of new microvascular structures in fibrin matrices. *Am J Pathol.*:1731-42

[107] Kumar S., West D.C., Ager A. (1987)  
Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation.*; 36(1):57-70

[108] Küpper W. (1989)  
Sind Tierversuche ethisch vertretbar? *Krankenhauspharmazie* 10, 1-4

[109] Lampe M.A., Williams M.L. and Elias P.M. (1983)  
Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *J.Lipid Res.* 24:131-140,

[110] Landmann L. (1988)  
The epidermal permeability barrier. *Anat.Embryol.* 178:1-13, 1988



[111] Langer R. and Folkman J. (1976)

Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 263: 797-800

[112] Laplante A.F., Germain L., Auger F.A., Moulin V. (2001)

Mechanisms of wound reepithelialization : hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *FASEB J.* 15, 2377-2389

[113] Laska D.A., Poulsen R.G., Horn J.W., Meador V.P., Hoover D.M. (1992)

An evaluation of TESTSKIN™: An alternative dermal irritation model. *In Vitro Toxicol*, 5: 177-189

[114] Lindl T, Zell- und Gewebekultur, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (1999)

[115] Lo H.J., Kohler J.R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., Fink G.R. (1997)

Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.*:939-49.

[116] Luger T.A., Schwarz T. (1990)

Evidence for an epidermal cytokine network. *J Invest Dermatol.* 1990:100-104

[117] Lundstrom A. and Egelrud T. (1990)

Cell shedding from human plantar skin in vitro: evidence that two different types of protein structures are degraded by a chymotrypsin-like enzyme. *Arch.Dermatol.Res.* 282:234-237

[118] Maas-Szabowski N., Stark H.-J. u. Fusenig N.E. (2000)

Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 114, 1075-1084

[119] Maas-Szabowski N. (1997)

Cytokine als Mediatoren der dermal-epidermalen Wachstumsregulation. Untersuchungen an fibroblasten-Keratinocyten-cokulturen. Dissertation Universität des Saarlandes

[120] Mackenzie I.C. und Fusenig N.E. (1983)

Regeneration of organized epithelial structure; J. Invest. Dermatol. 81 (1): 189-194

[121] Maruguchi T., Maruguchi Y., Suzuki S., Matsuda K., Toda K., Isshiki N. (1994)

A new skin equivalent: keratinocytes proliferated and differentiated on collagen sponge containing fibroblasts. *Plast Reconstr Surg.* 1994 Mar;93(3):537-44; discussion 545-6.

[122 ] Martin P. (1997)

Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 75-81 *Science.* 1997:75-81

[123] Maurer H.R. (1994)

In vitro screening for potential anti-cancer drugs: New approaches including induction of differentiation. In: Crommelin, C., Couvreur, P., Duchene, D., editors: *In vitro and Ex Vivo Test Systems to Rationalize Drug Design and Delivery*, Editions de Santé, Paris (1994), pp. 99 - 107

[124] McCarthy S.A., Kuzu I., Gatter K.C., Bicknell R. (1991)

Heterogeneity of the endothelial cell and its role in organ preference of tumour metastasis. *Trends Pharmacol Sci.* 1991:462-7.

[125] McClain S.A., Simon M., Jones E., Nandi A., Gailit J.O., Tonnesen M.G., Newman D., Clark R.A. (1996)

Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of granulation tissue induction. *Am J Pathol.* 1996:1257-70. Related Articles, Links

[126] McKenzie und Sauder (1990)

The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *J. Invest. Dermatol.* 95, 105-107

[127] Melnik B.C. (1990)

Biochemie und Pathobiochemie des epidermalen Lipidstoffwechsels, Stuttgart:Georg Thieme Verlag, 1990. pp. 1-298.

[128] Menon G.K. and Elias P.M. (1997)

Morphologic basis for a pore-pathway in mammalian stratum corneum. *Skin Pharmacol.* 10:235-246, 1997.

[129] Menon G.K. and Ghadially R. (1997)

Morphology of lipid alterations in the epidermis: a review. *Microscopy Research and Technique* 37:180-192, 1997

[130] Menon G.K., Elias P.M., and Feingold K.R. (1994)

Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. *Br.J.Dermatol.* 130:139-147, 1994

[131] Miltenburger H.G., Baschong W., Hörner V. u. Marx G. (1994)

Cooperative effects in vitro on fibroblast and keratinocyte functions related to wound healing by transforming growth factor- $\beta$  and a low molecular weight fraction from hemolyzed blood. *Drug Res.* 44, 872-876

[132] Miltenyi S., Muller W., Weichel W., Radbruch A. (1990)

High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* 1990;11(2):231-8

[133] Moll I.; Houdek P.; Schmidt H.; Moll R. (1998)

Characterization of epidermal wound healing in a human skin organ culture model: acceleration by transplanted keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998; 251-8.

[134] Montesano R., Orci L., Vassalli P. (1983)

In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol.* 1983:1648-52

[135] Montesano R., Orci L. (1985)

Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. *Cell.* 1985:469-77

[136] Montesano R., Vassalli J.D., Baird A., Guillemin R., Orci L. (1986)

Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986:7297-301

[137] Moulin V., Castilloux G., Jean A., Garrel D.R., Auger F.A., Germain L. (1996)

In vitro models to study wound healing fibroblasts. *Burns.* 1996; 359-62. Review

[138] Muller F.M., Kasai M., Francesconi A., Brillante B., Roden M., Peter J., Chanock S.J, Walsh T.J. (1999)

Transmission of an azole-resistant isogenic strain of *Candida albicans* among human immunodeficiency virus-infected family members with oropharyngeal candidiasis. *J Clin Microbiol.* 1999:3405-8.

[139] Nestle F.O., Burg G., Dummer R. (1999)

New perspectives on immunobiology and immuno-therapy of melanoma. *Immunol Today* 20:5-7

[140] Nicosia R.F., Tchao R., Leighton J. (1982)

Histotypic angiogenesis in vitro: light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies *In Vitro.* 1982: 538-49

[141] Nicosia R.F., Zhu W.H., Fogel E., Howson K.M., Aplin A.C. (2005)

A new ex vivo model to study venous angiogenesis and arterio-venous anastomosis formation. *J Vasc Res.* 2005:111-9. Epub 2005 Jan 20.

[142] Odds F.C. (1994)

Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol.* 1994:2-5

[143] Ohkura K. u. Terasa H. (1992)

Coculture of newborn rat skin epidermal cells with Swiss 3T3 cells: effect of the phases of 3T3 cells on attachment, growth and keratin synthesis of epidermal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1133, 153-159

[144] Ongpipattankul B., Francoeur M.L. and Potts R.O. (1994)

Polymorphism in stratum corneum lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1190:115-122, 1994.

[145] Pentland A.P., George J., Moran C. u. Needleman P. (1987)

Cellular confluence determines injury-induced prostaglandin E2 synthesis by human keratinocyte cultures. *Biochim. Biophys. Acta* 919, 71-78

[146] Peters K., Troyer D., Kummer S., Kirkpatrick C.J., Rauterberg J. (2002)

Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro. *Microvasc Res.* 2002:334-8.

[147] Phan Q.T., Belanger P.H., Filler S.G. (2000)

Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect Immun.* 2000:3485-90.

[148] Perkins M.A., Osborne R., Rana F.R., Ghassemi A., Robinson M.K. (1999)

Comparison of in vitro and in vivo human skin responses to consumer products and ingredients with a range of irritancy potential *Toxicol Sci.* 1999; 218-29

[149] Planas M.E., Gonzalez P., Rodriguez L., Sanchez S. and Cevc G. (1992)

Noninvasive percutaneous induction of topical analgesia by a new type of drug carrier, and prolongation of local pain insensitivity by anesthetic liposomes. *Anesth. Analg.* 75:615-621, 1992.

[150] Plendl J., Sinowatz F., Auerbach R. (1992)

The heterogeneity of the vascular endothelium *Anat Histol Embryol.* 1992:256-62

[151] Ponec M. (1991)

Reconstruction of human epidermis on de-epidermized dermis: expression of differentiation-specific protein markers and lipid composition. *Toxic.in Vitro* 5:597-606, 1991.

[152] Ponec M., El Ghalbzouri A., Dijkman R., Kempenaar J., van der Pluijm G., Koolwijk P. (2004)

Endothelial network formed with human dermal microvascular endothelial cells in autologous multicellular skin substitutes. *Angiogenesis*. 2004;7(4):295-305. Epub

[153] Ponec M., Gibbs S., Weerheim A., Kempenaar J., Mulder A. and Mommaas, A.M. (1997)

Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation. *Arch.Dermatol.Res.* 289:317-326, 1997

[154] Ponec M., Weerheim A., Kempenaar J., et al.

The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamine C. *J.Invest.Dermatol.* 109:348-355, 1997

[155] Randall H., Kramer and Garth L., Nicolson (1979)

Interactions of tumor cells with vascular endothelial cell monolayers: A model for metastatic invasion; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 76, No. 11, pp. 5704-5708, November 1979, Cell Biology

[156] Risau W., Dingler A., Albrecht U., Dehouck M.P., Cecchelli R. (1992)

Blood-brain barrier pericytes are the main source of gamma-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. *J Neurochem.* 1992:667-72.

[157] Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J.* 1995:926-33

[158] Rodrigues A.G., Mardh P.A., Pina-Vaz C., Martinez-de-Oliveira J., Fonseca A.F. (1999)

Germ tube formation changes surface hydrophobicity of *Candida* cells. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999;7(5):222-6

- [159] Romero L.I., Ikejima T., Pincus S.H. (1989)  
In situ localization of interleukin-1 in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 1989:518-22
- [160] Rosdy M., Pisani A. and Ortonne J. (1993)  
Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *Br.J.Dermatol.*129:227-234, 1993
- [161] Rotrosen D., Calderone R.A., Edwards J.E Jr. (1986)  
Adherence of *Candida* species to host tissues and plastic surfaces. *Rev Infect Dis.* 1986:73-85
- [162] Saig P., Coulomb B., Lebreton C., Bell E., Duberet L. (1985)  
Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro. *Science.* 1985; 669-72
- [163] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989)  
*Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY
- [164] Sarret Y., Stamm C., Jullien D., Schmitt D. (1992)  
Keratinocyte migration is partially supported by the cell-binding domain of fibronectin and is RGDS-dependent. *J Invest Dermatol.* 1992:656-9
- [165] Schade R., Pfister C., Halatsch R., Henklein P. (1991)  
Polyclonal igY antibodies from chicken egg yolk-an alternative to the production of mammalian igG type antibodies in Rabbits, *ATLA* 19, 403-419
- [166] Schaller M., Schackert C., Korting H.C., Januschke E., Hube B. (2000)  
Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol.* 2000:712-7.

[167] Scharl M., Adam D. (1992)

Molecular cloning, Structural Characterization, and Analysis of Transcription of the Melanoma Oncogene of Xiphophorus, Pigment Cell Research Suppl. 2:172-180 (1992)

[168] Schiaffino M.V, E. Dell'ambra, Cortese K.C. Baschiroto S., Bondanza M., Clementi P., Nucci A., Ballabio C., Tacchetti M., De Luca (2002)

Effective retrovirus-mediated gene transfer in normal and mutant human melanocytes, Human Gene Ther. 13(8):947-57 (2002)

[169] Schor A.M., Schor S.L., Allen T.D. (1983)

Effects of culture conditions on the proliferation, morphology and migration of bovine aortic endothelial cells. J Cell Sci. 1983: 267-85.

[170] Schreier H. and Bouwstra, J.A. (1994)

Liposomes and niosomes as topical carriers: dermal and transdermal drug delivery. J.Contr.Rel. 30:1-15, 1994.

[171] Schuster S. (2002)

Immunohistochemical, light and electron microscopic study on in vitro angiogenesis in cultured endothelial cells from the bovine ovary, Diss., FU Berlin, 2002

[172] Spielmann, H. (1994)

In-Vitro-Methoden in Lehrbuch der Toxicologie, Edit. Marquardt, H., Schäfer, S., 1.Auflage, BI-Wissenschaftlicher Verlag, Leipzig, 814-820

[173] Stephens P., Wood E.J., Raxworthy M.J. (1996)

Development of a multilayered in vitro model for studying events associated with wound healing. Wound Rep Reg, 4: 393-401

[174] Stolz D.B., Jacobson B.S. (1991)

Macro- and microvascular endothelial cells in vitro: maintenance of biochemical heterogeneity despite loss of ultrastructural characteristics. In Vitro Cell Dev Biol. 1991:169-82



[175] Streilein, J.W. (1983)

Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J. Invest. Dermatol.* 80 Suppl., 12-16

[176] Sugihara K., Kitamura S., Yamada T., Ohta S., Yamashita K., Yasuda M., Fujii-Kuriyama Y.

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001:1093-9.

[177] Sullivan T.P., Eaglstein WH., Davis S.C., Mertz P.

The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen.* 2001:66-76

[178] Sundstrom P.

Adhesins in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 1999:353-7.

[179] Supp D.M., Wilson-Landy K., Boyce S.T. (2002)

Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice; *FASEB J.* 2002 Jun;16(8):797-8043

[180] Suzuki Y., Nomura J., Koyama J. and Horii, I. (1994)

The role of proteases in stratum corneum: involvement in stratum corneum desquamation. *Arch.Dermatol.Res.* 286:249-253, 1994.

[181] Tontsch U., Bauer H.C. (1989)

Isolation, characterization, and long-term cultivation of porcine and murine cerebral capillary endothelial cells. *Microvasc Res.* 1989:148-61

[182] Trochon V., Li H, Vasse M., Frankenne F., Thomaidis A., Soria J., Lu H., Gardner C., Soria C. (1998)

Endothelial metalloprotease-disintegrin protein (ADAM) is implicated in angiogenesis in vitro. *Angiogenesis.* 1998:277-85.

[183] Tsuchimori N, Sharkey L.L, Fonzi WA, French S.W, Edwards J.E Jr, Filler S.G.)  
Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infect Immun.* 2000:1997-2002

[184] van Hinsbergh V.W, Koolwijk P, Hanemaaijer R. (1997)  
Role of fibrin and plasminogen activators in repair-associated angiogenesis: in vitro studies with human endothelial cells. *EXS.* 1997;79:391-411

[184] Volff J.N., Scharl M. (1999)  
Hautkrebs bei Fischen: ein Tumorgen und die Folgen, [www.uni-wuerzburg.de/blick/](http://www.uni-wuerzburg.de/blick/)

[185] Wagner und Matthews 1975 Wagner RC, Matthews MA.  
The isolation and culture of capillary endothelium from epididymal fat. *Microvasc Res.* 1975:286-97

[186] Watt, F.M.  
Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 353:831-837, 1998.

[187] Weber M., Moller K., Welzeck M., Schorr J. (1995)  
Short technical reports. Effects of lipopolysaccharide on transfection efficiency in eukaryotic cells, *Biotechniques*:930-40

[188] Wellbrock C., Weisser C., Geissinger E., Troppmair J., Scharl M. (2002)  
Activation of p59Fyn Leads to Melanocyte Dedifferentiation by Influencing MKP-1-regulated Mitogen activated Protein Kinase Signaling, *J. of Biological Chemistry*, 6443-6454

[189] Wiesenhofer B., Kaufmann W.A., Humpel C.(1999)  
Improved lipid-mediated gene transfer in C6 glioma cells and primary glial cells using FuGene, *Journal Neuroscience Methods*, 145-52

- [190] Wittbrodt J., Lammers R., Malitschek B., Ullrich A., Scharl M. (1992)  
The Xmrk receptor tyrosine kinase is activated in Xiphophorus malignant melanoma,  
EMBO J. 11(11):4239-46
- [191] Woodley, D.T., J.R. Stanley, M.J. Reese u. E.J. O’Keeve (1988)  
Huan dermal fibroblasts synthesise laminin. J. Invest. Dermatol. 90, 679-683, König  
und Bruckner-Tuderman 1991
- [192] Yeh AT, Kao B, Jung WG, Chen Z, Nelson JS, Tromberg BJ. (2004)  
Imaging wound healing using optical coherence tomography and multiphoton  
microscopy in an in vitro skin-equivalent tissue model. J Biomed Opt. 2004:248-53
- [193] Yuan, Z.N., O. Schreures P. Gjermo, K. Helgeland u. K. Schenck (1999)  
Topical distribution of Fc gammaRI, Fc gammaRII and Fc gammaRIII in inflamed  
human giginva. J. Clin. Peridodonta. 26, 441-447
- [194] Zambruno G, Marchisio PC, Marconi A, Vaschieri C, Melchiori A, Giannetti A,  
De Luca M. (1995)  
Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors  
and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal  
human keratinocytes: implications for wound healing. J Cell Biol. 1995:853-65
- [195] Zhu DZ, Cheng CF, Pauli BU. (1991)  
Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell  
adhesion molecule. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991:9568-72