

Expression von Wundheilungs-
assoziierten Proteinen durch Progenitorfibroblasten und
terminal differenzierte Funktionsfibrozyten

**der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

von

Sonja Veronika Nolte

aus Stuttgart

vorgelegte

D i s s e r t a t i o n

2007

Die vorliegende Doktorarbeit wurde von April 2004 – April 2007 in der Sektion Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung der Universitätsklinik für Radioonkologie in Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. H. Peter Rodemann angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2007

Dekan: Prof. Dr. F. Schöffl

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Peter Rodemann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Blin

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau der menschlichen Haut (Cutis).....	2
1.1.1	Die Epidermis	3
1.1.2	Die Basalmembran	3
1.1.3	Die Dermis	4
1.2	Differenzierung von Fibroblasten	4
1.3	Die Wundheilung der Cutis.....	8
1.3.1	Der normale Wundheilungsverlauf	8
1.3.2	Chronische Wunden.....	8
1.4	Keratinozyten-Wachstumsfaktor KGF (FGF-7)	9
1.5	Matrix-Metalloproteinasen MMPs.....	12
1.5.1	Matrix-Metalloproteinasen während der Heilung akuter und chronischer Wunden	13
1.5.2	Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen	16
1.6	Zielsetzung.....	18
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Abkürzungsverzeichnis	20
2.2	Chemikalien, Labormaterial.....	22
2.3	Antikörper	23
2.4	Zellkultur.....	23
2.4.1	Isolation humaner dermaler Fibroblasten aus Biopsiematerial	23
2.4.2	Passagieren von Zellen.....	24
2.4.3	Bestimmung der Zellzahl.....	24
2.4.4	Berechnung der Populationsverdopplung (PD) und der kumulativen Populationsverdopplung (CPD).....	25
2.4.5	Zellkulturmedien	25
2.4.5.1	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).....	25
2.4.5.2	Keratinocyte Serum Free Medium (SFM)	25
2.4.6	Gewinnung von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien	26
2.4.6.1	Gewinnung von Progenitorfibroblasten der Typen MF I und MF II	26
2.4.6.2	Herstellung von Progenitorfibroblasten des Typs MF III	26
2.4.6.3	Herstellung von terminal differenzierten Fibrozyten (PMF).....	26
2.4.7	HaCaT-Zellen	27
2.4.8	Einfrieren von Zellen	27
2.4.8.1	Fibroblasten	27
2.4.8.2	HaCaT-Zellen	28
2.4.9	Auftauen von Fibroblasten und HaCaT-Zellen.....	28
2.4.10	Färbemethoden in der Zellkultur	28

2.4.10.1	Coomassie-Färbung – Proteinfärbung.....	28
2.4.10.2	Giemsa-Färbung – Kernfärbung	29
2.4.10.3	Dapi-Färbung – Kernfärbung und Mykoplasmentest	29
2.4.10.4	β -Galactosidase-Färbung	29
2.4.10.5	Immunfluoreszenzfärbungen (Kollagen IV, Laminin).....	30
2.5	ELISA für den Nachweis humanen KGFs	31
2.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE	32
2.6.1	Probengewinnung aus Zellkulturüberständen und Proteinbestimmung	32
2.6.2	Gießen des Gels.....	33
2.6.3	Elektrophorese.....	33
2.6.4	Lösungen	33
2.7	Western Blotting.....	34
2.8	Zymographie modifiziert nach (Heussen and Dowdle, 1980).....	35
2.8.1	Probengewinnung.....	35
2.8.2	Zymographie.....	36
2.8.3	Detektion.....	36
2.9	Realtime RT-PCR (Roche Lightcycler®).....	37
2.9.1	RNA-Isolation.....	37
2.9.2	Reverse Transkription	37
2.9.3	Realtime PCR.....	38
2.9.4	Primer.....	38
2.9.5	Agarosegelelektrophorese	39
2.9.5.1	RNAse-freies DEPC-Wasser	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Expression des Keratinozyten-Wachstumsfaktors KGF durch Progenitor-Fibroblasten und postmitotische Fibrozyten.....	41
3.1.1	Analyse der KGF-Expression mittels ELISA.....	41
3.1.1.1	Analyse von Fibroblasten/ Fibrozyten in Monokultur in verschiedenen Kulturmedien	41
3.1.1.2	Analyse von Fibroblasten/ Fibrozyten mit und ohne Kokultur von HaCaT-Zellen.....	43
3.1.1.3	KGF-Expression von Fibroblasten nach Bestrahlung mit 8 Gy.....	44
3.1.2	KGF-mRNA-Analyse mittels realtime RT-PCR.....	47
3.2	Untersuchung des FGF-BP-mRNA-Levels von HaCaT-Zellen.....	49
3.3	Untersuchungen zu Matrix-Metalloproteinasen MMPs.....	50
3.3.1	Expression von MMPs durch Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien.....	50
3.3.1.1	Unspezifische Analyse von MMPs mittels Zymographie.....	50
3.3.1.2	Analyse von MMP-2, MMP-3 und MMP-10 mittels Western Blot.....	52
3.3.1.3	MMP-2-mRNA-Analyse mittels realtime RT-PCR.....	53
3.3.2	Untersuchung der MMP-Expression von HaCaT-Zellen	55

3.3.2.1	Unspezifische Analyse von MMPs mittels Zymographie.....	55
3.3.2.2	Analyse der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 von HaCaT-Zellen mittels Western Blot und RT-PCR.....	58
3.4	Expression von Proteinen der Extrazellulären Matrix.....	61
3.4.1	Kollagen IV-Expression von Fibroblasten/ Fibrozyten.....	61
3.4.2	Laminin-Expression von Fibroblasten/ Fibrozyten.....	63
3.4.3	Expression von ECM-Proteinen durch HaCaT-Zellen	66
4	Diskussion	68
4.1	Zellsystem	68
4.2	KGF.....	70
4.3	FGF-BP	72
4.4	MMPs.....	72
4.5	Wundheilung	77
4.6	Ausblick.....	80
5	Zusammenfassung	82
6	Literaturverzeichnis	85
7	Curriculum vitae	94

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Bioprofile-Projekts BIO-0101-0313047, unterstützt durch das BMBF, angefertigt. Die zentrale Fragestellung dieses Projekts befasste sich mit der Herstellung von besiedelten dreidimensionalen Trägermaterialien für das Tissue Engineering. Auf einem Trägermaterial sollten autologe Fibroblasten verschiedener Differenzierungsstadien angesiedelt werden, welche die Wundheilung bei chronischen Wunden unterstützen sollten. In diesem Kontext beschäftigte sich die hier vorliegende Dissertation mit den molekularen Wechselwirkungen zwischen den Fibroblastensubtypen und Keratinozyten.

Für Verbrennungswunden stehen heute eine Reihe von zellfreien oder zellbesiedelten Produkten zur Verfügung, welche entweder als permanenter oder als zeitweiliger Hautersatz fungieren und unter anderem auch von der Haut absorbiert werden können. Für die Behandlung von chronischen Wunden dienen derartige Trägermaterialien bisher nur als zeitweilige Abdeckung zur Verhinderung von Infektionen und Flüssigkeitsverlust. Sie lösen sich nach gewisser Zeit wieder vom Wundgrund, ohne der Schließung der Wunde förderlich gewesen zu sein. Da sich der Wundgrund chronischer Wunden von dem akuter Wunden unterscheidet, kann auch durch auf dem Trägermaterial befindliche Fibroblasten oder Keratinozyten keine Besserung erzielt werden (Falanga, 2005; Moustafa et al., 2004; Ng et al., 2004; Przybilski et al., 2004; Smola et al., 2001).

Es wird angenommen, dass das Defizit bei chronischen Wunden nicht auf der Seite der Keratinozyten liegt, die in diesem Falle die Wunde nicht mehr schließen könnten. Vermutlich haben die Fibroblasten des Wundgrundes ihre Funktion verändert, so dass es den Keratinozyten am Wundrand nicht mehr möglich ist, auf den Fibroblasten zu migrieren und mit diesen zusammen eine intakte Basallamina zu synthetisieren. Es kann beobachtet werden wie die Keratinozyten sich an den Wundrändern chronischer Wunden regelrecht aufstauen, da sie nicht über deren Wundgrund migrieren können (Cook et al., 2000; Frykberg, 2002; Smola et al., 2001).

Das Neuartige an diesem Projekt ist, dass das Trägermaterial nicht nur mit den allgemein verwendeten proliferationsfreudigen Fibroblasten niedriger Differenzierungsstufen besiedelt werden soll, sondern dass auch höher differenzierte Progenitorfibroblasten und postmitotische Fibrozyten verwendet werden sollen. Möglicher

Weise erleichtern ebenjene Fibrozyten aus späten Differenzierungsstadien die Migration der Keratinozyten über das besiedelte Trägermaterial und somit die Schließung der Wunde. Chronische Wunden, vor allem solche mit geringer Wundfläche, müssen nicht zwingender Weise innerhalb kurzer Zeit behandelt werden, wie es z.B. bei großflächigen Verbrennungswunden der Fall ist. Aus diesem Grund hat man in der Praxis Zeit, autologe Zellen des Patienten von nicht-chronischen Spenderstellen zu entnehmen, diese in vitro zu expandieren und in die verschiedenen Differenzierungsstadien zu überführen, bevor sie in das Trägermaterial eingesät werden. Dies bietet den weiteren Vorteil, dass durch die Verwendung autologer Zellen sowohl Immunreaktionen, welche zur Abstoßung des Transplantats führen können, ausbleiben, als auch das Infektionsrisiko vermindert wird.

Wäre dieser Therapieansatz auch noch nach der relativ langen Vorbereitungszeit für die besiedelten Träger erfolgreich, so könnten durch die nicht mehr nötige Wundversorgung der Patienten, diesen Lebensqualität zurückgegeben und dem Gesundheitssystem immense Kosten gespart werden.

Vor diesem Hintergrund sollten nun auf molekularer Ebene die Interaktionen zwischen den verschiedenen Differenzierungstypen der Fibroblasten bzw. Fibrozyten und den epidermalen Keratinozyten beleuchtet werden.

1.1 Aufbau der menschlichen Haut (Cutis)

Die menschliche Haut ist mit einer Oberfläche von bis zu 2 m² und einem Gewicht von bis zu 10 kg das größte und schwerste Organ des Körpers. Ihre Funktion besteht

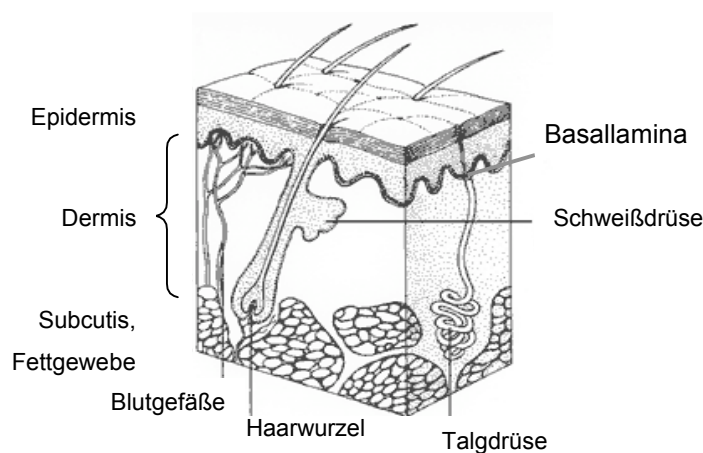


Abbildung 1.1.1: Aufbau der menschlichen Haut [1]

darin, Schutz vor Verletzungen, Strahlung, Wärme und Kälte zu gewährleisten, sowie Körpertemperatur und Wasserhaushalt im Gleichgewicht zu halten. Zahlreiche Drüsen, Haare und Sinneszellen stehen im Dienste sozioökologischer Funktionen.

1.1.1 Die Epidermis

Die Oberfläche der menschlichen Haut wird von der Epidermis gebildet. Diese ist als nach außen hin verhornendes Plattenepithel aus Keratinozyten aufgebaut. Da die Keratinozyten miteinander sehr fest über Desmosomen und Hemidesmosomen verbunden sind, entsteht eine wasserundurchlässige und gegen mechanische Reize sehr resistente Hautschicht. Die Epidermis selbst wird ebenfalls in eine Vielzahl von Schichten unterteilt, welche durch Differenzierungsstadien der Keratinozyten gebildet werden, man spricht auch von der Stratifizierung der Keratinozyten (Alberts et al., 2004).

Die Stratifizierung geht von Keratinozytenstammzellen aus, die sich sowohl als unterste Schicht auf der Basalmembran als auch in den in der Dermis liegenden Haarfollikeln befinden. Diese unterste Schicht der Epidermis wird *Stratum basale* genannt. Hier liegen neben den Keratinozytenstammzellen die Melanozyten, der Zelltyp, welcher für die Pigmentierung der Haut verantwortlich ist, sowie die Merkel-Zellen, die für Berührungsreize empfänglich sind. In der darauffolgenden Schicht, dem *Stratum spinosum*, beginnt bereits die Keratinisierung der Epidermiszellen. Zudem finden sich hier die Langerhans-Zellen, welche zum lymphatischen System gehören. Nach außen hin folgen *Stratum granulosum* und *Stratum lucidum*, in welchen die Keratinozyten sich zunehmend abflachen und Keratingranula einlagern. Durch interzellulär eingelagerte Fette und die zunehmende Keratinisierung bildet die Epidermis eine nach außen immer wirksamere Barriere gegen das Eindringen von Fremdorganismen sowie zur Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes. Gleichzeitig wird die Versorgung der Keratinozyten mit Nährstoffen immer schlechter, was in der Umwandlung der Keratinozyten zu abgestorbenen Corneozyten gipfelt. Letztere enthalten keine Zellorganellen mehr und werden im Laufe der Zeit vom *Stratum disjunctum* abgeschilfert (Alberts et al., 2004; von Meyersbach, 1976).

1.1.2 Die Basalmembran

Die Epidermis wird von der darunter liegenden Dermis durch die Basalmembran oder Basallamina getrennt, welche zapfenförmig in die Dermis hineinreicht, was die Ober-

fläche immens vergrößert und somit die Nährstoffversorgung der Epidermis begünstigt.

Die Basalmembran besteht aus Netzwerken verschiedener Extrazellulärer Matrixproteine. Zu den Bestandteilen der Basalmembran gehören Laminine, Kollagen IV, Nidogen, Perlecan, Agrin, Kollagen XV, Kollagen XVIII und Fibulin (Sasaki et al., 2004). Bei den Lamininen sind besonders Laminin 1 und Laminin 5 zu erwähnen, welche an der Synthese der Basalmembran (Laminin 1) und an der Migration der epidermalen Keratinozyten sowie an der Regeneration der Haut (Laminin 5) entscheidend beteiligt sind. Die Basallamina ist ein wichtiger Bestandteil gesunder Haut und wird bei der Wundheilung von epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten gemeinsam synthetisiert (Alberts et al., 2004; Schneider et al., 2006).

Die Basallamina ist essentiell für die Migration der Keratinozyten, welche sich an deren spezifischen Proteinen entlang fortbewegen können. Überdies stellt die Basalmembran einen Schutz gegen Invasion von Keratinozyten in die darunter liegende Dermis dar, wie es z. B. bei der Ausbildung maligner Hauttumoren zu beobachten ist. Bei chronischen Wunden scheinen die Zellen die Fähigkeit verloren zu haben, eine Basalmembran auszubilden, weshalb es nicht mehr zur Schließung der Wunde kommt (Falanga, 2005; Stetler-Stevenson et al., 1993).

1.1.3 Die Dermis

Die Dermis wird hauptsächlich von Fibroblasten gebildet und gliedert sich histologisch in *Stratum papillare* und *Stratum reticulare*. Im *Stratum papillare* eingebettet liegen Drüsen, Haarfollikel, Sinneskörperchen sowie Nervenbahnen, Blut- und Lymphgefäße. Da die Zellzwischenräume hier mit Interstitium gefüllt sind, können sich neben den Fibroblasten auch inflammatorische Zellen frei durch die Dermis bewegen. Das *Stratum reticulare* ist durch ein erhöhtes Vorkommen von Extrazellulärer Matrix gekennzeichnet, welches durch Wassereinlagerung der Haut Straffheit verleiht. Die Dermis wiederum liegt der Subcutis auf, welche das Fettgewebe darstellt. Besonderheiten der Fibroblasten sollen im nächsten Kapitel behandelt werden (Alberts et al., 2004; von Meyersbach, 1976).

1.2 Differenzierung von Fibroblasten

Fibroblasten sind mesenchymalen Ursprungs und stellen den am häufigsten auftretenden Zelltyp im Organismus dar. Sie sind der zelluläre Bestandteil der Dermis,

formen also das Bindegewebe, bilden aber auch das Stützgewebe für Organe wie z.B. Lunge oder Niere. Die Aufgabe der Fibroblasten besteht zum einen in der Produktion von Extrazellulärer Matrix, welche die Organe im Verband hält, andererseits sind Fibroblasten in der Lage, Zytokine und Wachstumsfaktoren zu sezernieren, welche für das umliegende Gewebe eine wichtige Rolle bei Proliferation sowie Differenzierung spielen.

Fibroblastenstämme werden oft als homogene Populationen von Zellen betrachtet, die eine begrenzte Teilungsfähigkeit aufweisen und nach Auslaufen ihrer Teilungsaktivität als sogenannte seneszente Zellen absterben. Wie erstmals von Bayreuther et al. (1988) und Rodemann et al. (1989) beschrieben, bestehen Fibroblastenpopulationen sowohl in vitro als auch in vivo aus unterschiedlich teilungsaktiven Progenitorfibroblasten (MF) und irreversibel teilungsinaktiven postmitotischen Fibrozyten (PMF). Dementsprechend durchlaufen Fibroblasten mehrere Stadien einer terminalen Differenzierung (Bayreuther, 1992; Bayreuther et al., 1988; Rodemann et al., 1989).

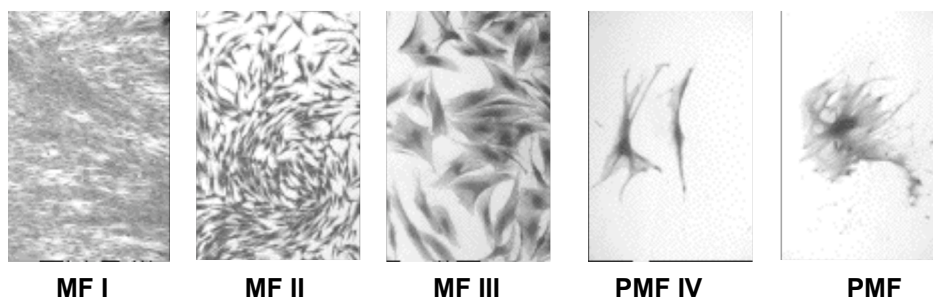
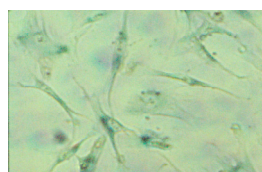


Abbildung 1.2.1: : Differenzierungsstadien humaner dermaler Fibroblasten

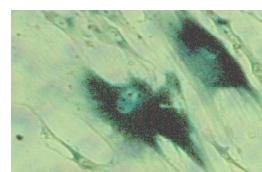
Unterschieden wird zwischen 3 Stadien der mitotischen Phase sowie 4 Stadien der postmitotischen Phase. Potentiell mitotische Fibroblasten des frühesten Differenzierungsstadiums werden MF I genannt. Sie besitzen ein spindelförmiges Aussehen, wobei das Zytoplasma den relativ kleinen Zellkern eng umschließt (siehe Abbildung 1.2.1). Nach der Differenzierung zu MF II-Fibroblasten weisen die Zellen immer noch ein spindelförmiges bis dreieckiges Zytoplasma auf, wobei der hier nun etwas größere Zellkern nicht mehr so eng umschlossen wird. Im letzten mitotischen Fibroblastenstadium, MF III, sind Zellkern und Zytoplasma erneut merklich größer geworden und die Zellen besitzen keine Spindelform mehr. Es folgt die terminale Differenzierung zu sich nicht mehr teilenden, irreversibel postmitotischen Zellen. Die

Zellen des Stadiums PMF IV haben ein langgestrecktes Zytoplasma, differenzieren in vivo jedoch innerhalb kurzer Zeit zu PMF V und PMF VI. Die Fibrozyten des Typs PMF VI werden in dieser Arbeit als PMF-Zellen bezeichnet, da diese Zellen die terminal differenzierten Funktionsfibrozyten darstellen. Dieser Zelltyp konnte nahezu ein ganzes Jahr in Kultur gehalten werden, bevor die Zellen durch apoptotische Prozesse abstarben (Bayreuther et al., 1995; Bayreuther et al., 1988). Morphologisch sind PMF-Zellen von MF-Zellen klar zu differenzieren (siehe Abbildung 1.2.1). Das Zytoplasma der PMF-Zellen ist weit ausgebreitet und weist viele Fortsätze auf. Die Zelle ist ca. 30 mal so groß wie MF I-Fibroblasten und der Zellkern hat ebenfalls an Größe gewonnen. Letzteres ist darauf zurückzuführen, dass diese Zellen tetraploid werden können (Brenneisen et al., 1994).

Aus ex vivo/in vitro-Analysen des Differenzierungsmusters von Hautbiopsiematerial von Spendern im Alter zwischen 20 und 80 Jahren konnte geschlossen werden, dass über die untersuchte Zeitspanne ein konstantes in vivo-Verhältnis von 2 Progenitorfibroblasten zu 1 Fibrozyten besteht. Dieses Verhältnis wird durch stetige Differenzierung von MF-Zellen zu PMF-Zellen aufrechterhalten. So können selbst aus Biopsien von Embryonen PMF-Zellen und aus solchen sehr alter Menschen MF II-Zellen isoliert werden; die Anteile von MF I- bzw. MF II-Progenitorfibroblasten nehmen dementsprechend mit fortschreitendem Spenderalter zugunsten der MF III-Progenitorfibroblasten konstant ab. Das Verhältnis von MF : PMF bleibt dadurch jedoch unverändert (Bayreuther, 1992; Rodemann et al., 1996).



Progenitorfibroblasten



**terminal differenzierte
Funktionsfibrozyten**

Abbildung 1.2.2 β -Galactosidasefärbung von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien. Die grüne Färbung wird nur bei terminal differenzierten Fibrozyten sichtbar.

Progenitorfibroblasten und terminal differenzierte Fibrozyten unterscheiden sich jedoch nicht nur morphologisch. MF-Progenitorfibroblasten zeichnen sich durch eine hohe Proliferations- und Migrationsfähigkeit aus, wohingegen PMF-Fibrozyten nicht

stark migrieren, stattdessen aber eine erhöhte Funktionalität in Bezug auf die Proteinbiosynthese von Wachstumsfaktoren wie TGF- β und ECM-Proteinen wie Kollagen I, III und V aufweisen (Hakenjos, 2002; Hakenjos et al., 2000; Rodemann and Müller, 1991). Auch die Degradation intrazellulärer Proteine mit kurzer Halbwertszeit wird während der Differenzierung der Fibroblasten von MF- zu PMF-Zellen erhöht. Diese Proteine sind definiert als Proteine mit einer Halbwertszeit von < 12 h. Im Gegenteil zu den Proteinen mit langer Halbwertszeit (> 12 h), wie z.B. Strukturproteinen, stellen die kurzlebigen Proteine meist Signalproteine oder u.U. aberrante Polypeptide dar und machen in ihrer Gesamtheit kaum 5 % der intrazellulären Proteine aus (Rodemann, 1989, 1990, 1993).

Für verschiedene Krankheitsbilder konnte eine vorzeitige Differenzierung oder Degeneration der Fibroblasten im betroffenen Gewebe und somit teilweise ein zu hoher oder zu geringer Anteil an PMF-Zellen beschrieben werden. So ist der Proteinabbau in Fibroblasten aus Patienten mit Duchenne-Becker Muskeldystrophie stark beschleunigt, was zu vorzeitiger Zellalterung und Degeneration führt (Rodemann and Bayreuther, 1984, 1986). Nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung kommt es zur Ausdifferenzierung der betroffenen Fibroblasten und somit zu einer pathogenen Verschiebung des Verhältnisses MF:PMF zugunsten der PMF-Zellen. Das klinische Erscheinungsbild dieser Strahlenschädigung wird Fibrose genannt und wird gekennzeichnet durch eine erhöhte Produktion Extrazellulärer Matrixproteine (Herskind et al., 1998; Rodemann et al., 1996; Rodemann et al., 1991). Auch wurde in Patienten mit Diabetes-bedingtem Nierenleiden ein hoher Anteil vorzeitig gealterter Fibroblasten nachgewiesen, welcher für die unverhältnismäßig hohe Produktion Extrazellulärer Matrix und die daraus resultierenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen verantwortlich gemacht werden konnte (Morocutti et al., 1997; Morocutti et al., 1996). In chronischen Wunden wurde ebenfalls eine übermäßig hohe Anzahl ausdifferenzierter Fibrozyten beobachtet. Betrachtet man die Auswirkungen der Diabetes-Erkrankung auf die Differenzierung der Fibroblasten, so scheint es nicht verwunderlich, dass gerade bei diesen Patienten besonders oft chronische Wunden diagnostiziert werden (Harding et al., 2005).

1.3 Die Wundheilung der Cutis

1.3.1 Der normale Wundheilungsverlauf

Wunden der Haut entstehen durch Traumata, Verletzung oder Verbrennung und werden nach ihrer Tiefe unterschieden. Verbrennungswunden, offene und geschlossene Wunden unterscheiden sich im Wundheilungsverlauf voneinander. Im Folgenden sollen die allgemeinen Phasen der Wundheilung dargestellt werden.

Die erste Phase der pathologischen Wundheilung ist die Entzündungsphase. Hier wird zunächst die Blutgerinnung sowie der Verschluss der Wunde durch einen Fibrinpfeifen initiiert. Diese Funktion wird von den Thrombozyten übernommen. Eine Vielfalt von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (TGF- α , TGF- β , PDGF, IGF-1), werden sezerniert und führen zu Angiogenese, Proliferation und Differenzierung der Fibroblasten sowie zur Infiltration der Wunde durch inflammatorische Zellen. Neutrophile Granulozyten verhindern die Infektion der Wunde mit Bakterien, wohingegen Makrophagen die Wunde von Zelldebris, Fibrin und funktionsunfähig gewordenen Neutrophilen befreien, sowie weitere Zytokine, Wachstumsfaktoren und angiogene Faktoren sezernieren (Singer and Clark, 1999; Werner and Grose, 2003).

Die auf die Entzündungsphase folgende Granulationsphase ist geprägt von Umstrukturierung der Extrazellulären Matrix. Nekrotisches Gewebe wird degradiert, Granulationsgewebe sprosst in die Wunde ein, und es kommt zur Synthese neuer Extrazellulärer Matrix sowie zum epithelialen Wundverschluss. In der letzten Phase der Wundheilung wird Narbengewebe aufgebaut, welches reich an Matrixproteinen, jedoch arm an Zellen ist. Matrix-Metalloproteinasen spielen bei der Wundheilung eine wichtige Rolle, auf die in Kapitel 1.5 näher eingegangen werden soll (Martin, 1997).

1.3.2 Chronische Wunden

Chronische Wunden sind in ihrem Wundheilungsverlauf gestört, weswegen es nicht zum Wundverschluss kommt. Besonders häufig kommen chronische Wunden bei bettlägerigen Patienten (Dekubitus) oder bei Patienten mit Diabetes mellitus vor. Ursache für die Ulzeration ist eine schlechte Durchblutung und der damit einhergehende Mangel an Sauerstoff sowie wundheilungsfördernden Wachstumsfaktoren und Zytokinen. In der Wunde klingt die Entzündungsphase nicht ab, woraufhin kein Granulationsgewebe gebildet werden kann und es nicht zum Wundverschluss kommt. Häufig treten Infektionen der chronischen Wunden mit Bakterien auf, welche die Aufrechterhaltung der Entzündungsphase zusätzlich fördern (Frykberg, 2002; Singer

and Clark, 1999; Welt et al., 2005).

Unter anderem aufgrund der verlängerten inflammatorischen Phase kommt es zur vorzeitigen Differenzierung der Fibroblasten in chronischen Wunden. Da Fibrozyten im Vergleich zu Progenitorfibroblasten ein erhöhtes proteolytisches Potenzial aufweisen, ist in chronischen Wunden das Gleichgewicht zwischen den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihren Inhibitoren, den TIMPs, gestört. Die MMPs können, ungehindert durch TIMPs, die Extrazelluläre Matrix der Wunde abbauen, wodurch Fragmente entstehen, die von inflammatorischen Zellen phagozytiert werden müssen, was ebenfalls zur Aufrechterhaltung der akuten Wundphase beiträgt (Harding et al., 2005; Saarialho-Kere, 1998; Singer and Clark, 1999; Welt et al., 2005).

1.4 Keratinozyten-Wachstumsfaktor KGF (FGF-7)

Der Keratinozyten-Wachstumsfaktor KGF wurde erstmals 1984 von Gilchrest et al. charakterisiert. Dem KGF konnte eine zellprotektive, antiapoptotische, mitogene und migrationsfördernde Wirkung auf verschiedene Zelltypen zugeordnet werden. KGF gehört zu den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, den FGFs. Die FGFs bestehen aus einer großen Proteinfamilie von mehr als 22 Mitgliedern. FGFs und ihre Rezeptoren, die FGFRs, konnten in allen Protozoen nachgewiesen werden, jedoch nicht in Bakterien und Hefezellen (Finch and Rubin, 2004; Gilchrest et al., 1984; Ornitz and Itoh, 2001).

Während der Heilung epidermaler Wunden konnte ein Anstieg der KGF-Expression beobachtet werden. Dieser geht sowohl auf Fibroblasten als auch auf intraepidermale $\gamma\delta$ T-Zellen zurück (Boismenu and Havran, 1994; Jameson et al., 2002; Tang and Gilchrest, 1996). Wie EGF, der Epidermale Wachstumsfaktor, wird also auch KGF streng mit der Wundheilung assoziiert. Der wundheilungsfördernde Effekt des KGF wird dadurch erlangt, dass die Proliferation der Keratinozyten angeregt wird. Im Gegensatz zu der Stimulation von Keratinozyten mit HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) und EGF kommt es nach einem Signal durch KGF jedoch nicht zu einer verstärkten Invasion von Keratinozyten in die Dermis. KGF wirkt in dieser Hinsicht also gerichtet und ist einer malignen Tumorbildung nicht förderlich (Zeigler et al., 1999; Zeigler et al., 1996b). In jüngster Zeit wurde KGF unter dem Namen Palifermin synthetisch hergestellt und zur Verhinderung von Narbengewebe eingesetzt (Finch and Rubin, 2004).

KGF ist ein Wachstumsfaktor, welcher von Fibroblasten sezerniert wird und als Mitogen auf epitheliale Zellen, wie z.B. auf Keratinozyten, wirkt. Die Expression von KGF durch Fibroblasten konnte durch verschiedene Zytokine, wie z.B. IL-1 α , IL-1 β oder TNF α hochreguliert werden (Gibbs et al., 2000; Tang and Gilchrest, 1996). Die spezifische parakrine Wirkung des KGF auf seine Zielzellen rührt daher, dass der für die Signaltransduktion erforderliche Rezeptor ausschließlich auf diesen Zellen exponiert wird.

Für die Signaltransduktion stehen den FGFs die vier Rezeptortyrosinkinasen FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 mit ihren Isoformen zur Verfügung. Um ihre spezifischen Rezeptoren zu aktivieren, gehen die FGFs funktionelle Komplexe mit der Extrazellulären Matrix ein, vor allem mit den Heparansulfatproteoglycanen (HSPG) sowie Dermatansulfaten (Taylor et al., 2005). Die Signalkaskade der FGFRs wird ausgelöst, nachdem FGF und HSPG an FGFR gebunden haben und der Rezeptor dadurch dimerisiert wird. Im Folgenden kommt es zur Autophosphorylierung der FGFRs und zur Weiterleitung des Signals über bestimmte Adapterproteine an den Ras/MAPK-Signalweg. Dies wiederum aktiviert Transkriptionsfaktoren im Zellkern, was zur Transkription oder Hemmung spezifischer Gene führt (siehe Abbildung 1.4.1).

Die Signaltransduktion des KGF im Speziellen findet über den KGF-Rezeptor statt. Dieser stellt eine Spleißvariante der Isoform FGFR2 dar, welche eine Modifikation in der dritten IgG-ähnlichen Domäne aufweist und folglich auch FGFR2IIIb genannt wird. Diese Isoform des FGF-Rezeptors ist auf epitheliale Zelllinien beschränkt und bindet die Faktoren FGF-1, FGF-3, FGF-7 (KGF), FGF-10 sowie FGF-22. Der KGF-Rezeptor ist somit nicht spezifisch für KGF (Miki et al., 1992; Ornitz et al., 1996).

Interessanter Weise ist KGF bei Mäusen nicht essentiell für die Wundheilung. Die Tatsache, dass ohne den KGF-Rezeptor jedoch keine Wundheilung stattfindet, lässt darauf schließen, dass die Funktion des KGF bei der Wundheilung durch andere FGFs übernommen werden kann, die am selben Rezeptor binden. Am wahrscheinlichsten sind hierbei FGF-10 und FGF-22, wobei FGF-22 erstaunlicher Weise nicht von Fibroblasten, sondern von den Keratinozyten selbst exprimiert wird. Hier kann also ein parakrines Signal durch ein autokrines Signal ersetzt werden (Beyer et al., 2003; Guo et al., 1996; Jameson et al., 2002).

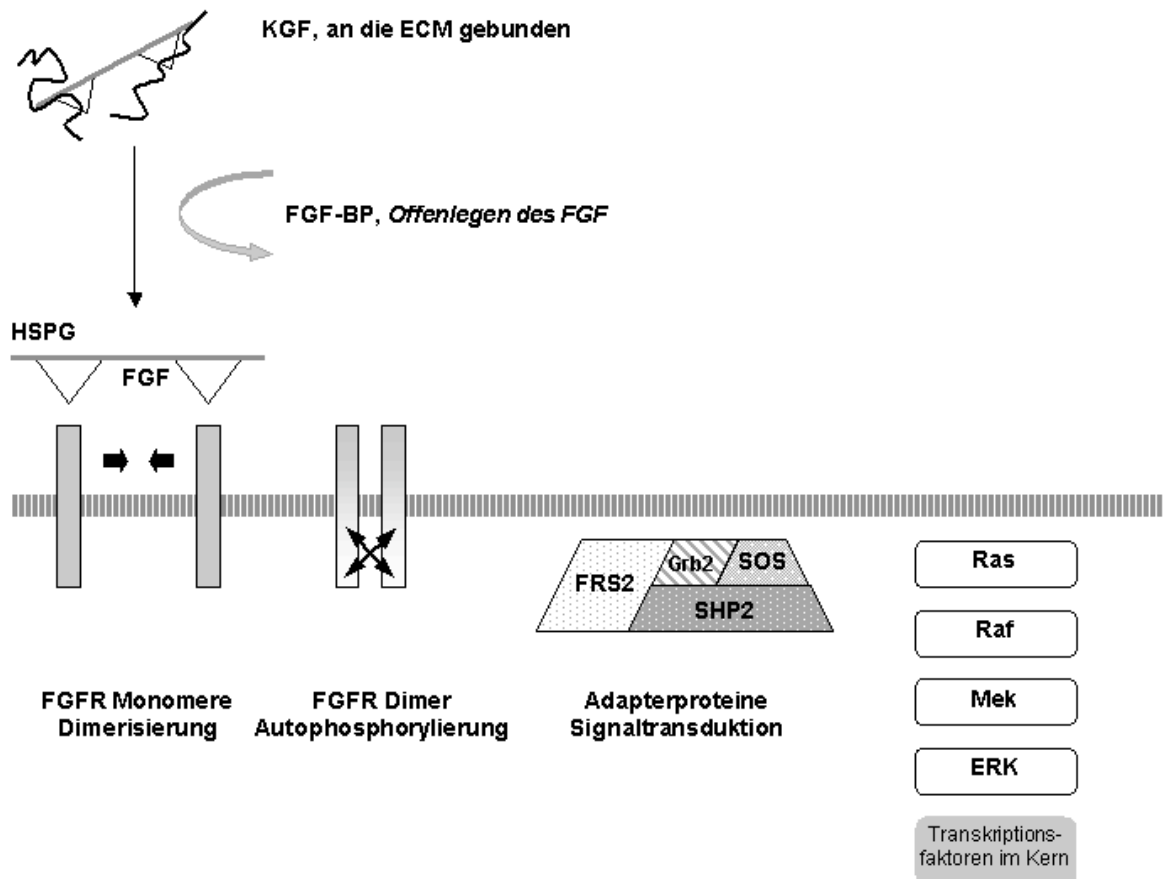


Abbildung 1.4.1: universeller Signaltransduktionsweg des FGF nach (Dailey et al., 2005)

Nach dem Binden von KGF an den KGFR kommt es zu einer kurzzeitig erhöhten Aktivierung von MEK/ERK, nicht jedoch zu einer langanhaltenden wie dies bei EGF und HGF zu beobachten ist. Die Tatsache, dass die Aktivierung von MEK/ERK schon 10 min nach der Stimulation mit KGF unter das Basallevel gefallen ist, könnte darauf hindeuten, dass durch KGF Phosphatasen aktiviert werden, die den Signalweg via MEK/ERK negativ beeinflussen. Diese Beobachtungen lassen auf eine negative Rückkopplung schließen und darauf, dass KGF evtl. ab einer bestimmten Konzentration keine verstärkte Wirkung mehr entfalten kann (Zeigler et al., 1999).

Während der dermalen Wundheilung ist eine erhöhte Konzentration an FGF-Bindprotein (FGF-BP) festgestellt worden, welches, vermutlich durch Mitogene induziert, von Keratinozyten an der Wundstelle verstärkt exprimiert wird. FGF-BP trägt zum Freisetzen des KGF aus der Extrazellulären Matrix bei. FGF-BP reagiert nicht nur mit KGF, sondern auch mit den für die Wundheilung wichtigen Faktoren FGF-10 sowie

FGF-22 und verstärkt die Wirkung dieser Wachstumsfaktoren, solange sie nur in geringer Konzentration vorliegen. Überdies gibt es Anzeichen dafür, dass dieser Wirkmechanismus wiederum die Expression der genannten Wachstumsfaktoren erhöht und somit auf zwei Wegen der Wundheilung förderlich ist (Beer et al., 2005).

1.5 Matrix-Metalloproteinasen MMPs

Matrix-Metalloproteinasen sind zinkabhängige Endopeptidasen, welche essentiell für die Regenerierung und Umwandlung von Geweben bzw. extrazellulärer Matrix sind. Im gesunden Organismus spielen sie eine wichtige Rolle bei Wachstum und Entwicklung, bei der Wundheilung, der Angiogenese und vielen weiteren Prozessen (Ravanti and Kahari, 2000).

MMPs lassen sich gemäß ihrer Funktion und Struktur in 5 Untergruppen einteilen (siehe Tabelle 1.1): die Kollagenasen, die Gelatinasen, die Stromelysine, die membranständigen MMPs, die Matrilysine und andere MMPs. Alle MMPs werden von verschiedenen Genen codiert.

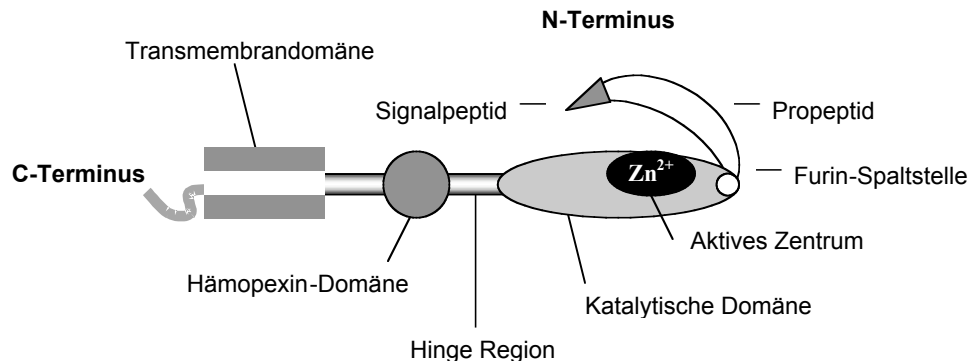


Abbildung 1.5.1: Allgemeine Struktur von Matrix-Metalloproteinasen (modifiziert nach [2])

Ein N-terminales Signalpeptid ist für den Transport der MMPs ins Endoplasmatische Retikulum verantwortlich, von wo aus sie in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Alle MMPs besitzen eine variable katalytische Domäne, in der sich das jeweils spezifische aktive Zentrum mit dem Zink²⁺-Ion befindet. Das aktive Zentrum wird in der latenten Form der MMPs von einem Cysteinrest auf dem Propeptid gebunden und kann so seine proteinabbauende Wirkung nicht entfalten. Bei der Aktivierung der MMPs wird das Propeptid an der Furin-Spaltstelle von der nun aktiven

Form der MMPs abgespalten. Eine Prolin-reiche Hinge-Region verbindet die katalytische mit der Hämapexin-Domäne. Letztere ist für die Erkennung der spezifischen Substrate sowie für die Bindung verschiedener Proteine verantwortlich. Bei den membranständigen MMPs ist eine C-terminale Transmembrandomäne vorhanden (Kerkela and Saarialho-Kere, 2003).

MMPs werden nicht konstitutiv exprimiert, vielmehr wird ihre Aktivität über mehrere Mechanismen reguliert: auf der Ebene der Genexpression werden MMPs durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und die Wechselwirkungen zwischen Zellen oder zwischen Zelle und ECM reguliert. Nach der Proteinexpression liegen MMPs in inaktiven Proformen vor, die zunächst, z.B. durch weitere MMPs, von ihrem Propeptid befreit und somit aktiviert werden müssen. Schließlich stehen eine Reihe von Inhibitoren, u.a. die TIMPs (Tissue Inhibitors of MMPs) zur Verfügung, welche bereits aktivierte MMPs wieder inhibieren können. Die vier verschiedenen Typen von TIMPs gehen physiologisch irreversible Komplexe mit MMPs ein, die deren Aktivität inhibieren.

1.5.1 Matrix-Metalloproteinasen während der Heilung akuter und chronischer Wunden

Während der Wundheilung sind MMPs an den verschiedensten Prozessen beteiligt, wie z.B. am Abbau des Wundgewebes und an der Umstrukturierung der Extrazellulären Matrix. MMPs spielen eine wichtige Rolle bei der Migration der Zellen zu ihren Bestimmungsorten; im Falle der Keratinozyten bedeutet dies die Migration über den Wundgrund und somit die Schließung der Wunde. In der späten Wundheilungsphase beteiligen sich die MMPs am Abbau von Granulations- und Narbengewebe und ermöglichen die Angiogenese. MMPs agieren nicht nur, indem sie die Extrazelluläre Matrix degradieren, ihre Aktivität ist im Gegenteil hierzu sehr gerichtet und führt zur Freilegung kryptischer Motive der ECM. Durch präzises Schneiden großer ECM-Moleküle werden bioaktive Fragmente, Wachstumsfaktoren und beispielsweise Tumor-Nekrosefaktor α (TNF- α) freigesetzt, sowie die Architektur der ECM umgewandelt. All dies beeinflusst das Verhalten der umliegenden Zellen (Gearing et al., 1995; Mott and Werb, 2004; Tran et al., 2004).

Tabelle 1.1 Übersicht über die bekannten Matrix-Metalloproteinasen (Kerkela and Saarialho-Kere, 2003)

Enzym	Synonym	MW (kDa)	Substrat	Funktion/ beteiligt an	aktiviert durch
Kollagenasen:					
MMP-1	Kollagenase 1, Interstitielle/ Fibroblasten-Kollagenase	55/ 45	K I, II, III, VII, VIII, X, G, Ag, VN, FG, TNF-Precursor	Wundheilung: von Keratinozyten an der Migrationsfront exprimiert, in chronischen Wunden hochreguliert, Hauttumoren, Lichtschädigung, aktiviert MMP-2	MMP-3/ -10, Plasmin, Kallikrein, Chymase
MMP-8	Kollagenase 2 Neutrophilen-Kollagenase	75/ 58	K I, II, III, Ag, FG, FN, LN		MMP-3/ -10, Plasmin
MMP-13	Kollagenase 3 Ratten-Kollagenase	66/ 48	G K I, II, III, IV, IX, XIV, LN, Ag, FN, FG, K I (Knochen)	Geweberemodellierung, aktiviert MMP-2 und MMP-9	MMP-2 /-3/ -10/ -14/ -15, Plasmin
Cathepsin K					
Gelatinasen					
MMP-2	Gelatinase A 72 kDa-Gelatinase	72/ 66	K I - V, VII, X, XI, EI, G, FN, LN-5, Prokollagenase-3, TNF-Precursor, pro-TGF- β	Aktiviert MMP-9, MMP-13, Hauttumoren	MMP-1/ -7/ -13/ -14/ -15/ -16/ -24/ -25, Tryptase, Thrombin, Plasmin
MMP-9	Gelatinase B, 92 kDa-Gelatinase	92/ 86	G, FN, EI, K IV, V, Ag, VN, TNF-Precursor, pro-TGF- β	Hauttumoren Kontakthypersensitivität, Lichtschädigung, bullöse Krankheiten	MMP-2/ -3/ -13, Plasmin
Stromelysine					
MMP-3	Stromelysin 1, Transin 1, Proteoglycanase	57/ 45	PG, G, LN, EI, K III, IV, V, IX, MMP-1, Ag, TNF-Precursor	Wundheilung: von Keratinozyten hinter der Migrationsfront exprimiert, in chronischen Wunden hochreguliert, Kontakthypersensitivität, Lichtschädigung	Plasmin, Kallikrein, Chymase, Tryptase, Elastase, Cathepsin G
MMP-10	Stromelysin 2, Transin 2	57/ 44	K III, IV, V, IX, FN, G, LN, PG	Von Keratinozyten an der Migrationsfront bei der Wundheilung exprimiert, Hauttumoren	Plasmin, Kallikrein, Chymase, Tryptase, Elastase, Cathepsin G
MMP-11	Stromelysin 3	62/ 47	FN, LN,	Krebs und Metastasenbildung Hauttumoren	Furin
MMP-12	Makrophagen-Metalloelastase	54/ 22	EI, G, Ag, FN, LN, VN, EI, K IV, Fibrinogen, TNF-Precursor	Serinproteasen-Inhibitor Lichtschädigung	Plasmin
Membranständige MMPs					
MMP-14	MT1-MMP		K I, II, III, FN, G, LN, PG, Ag, VN, Prokollagenase-3, Progelatinase A,	Aktiviert MMP-2/-13	Plasmin, Furin
MMP-15	MT2-MMP		AG, FN, LN, Progelatinase A	Aktiviert MMP-2/-13	
MMP-16	MT3-MMP		K III, FN, G	Aktiviert MMP-2	Furin
MMP-17	MT4-MMP		G, TNF-Precursor	Aktiviert MMP-2	
Sonstige					
MMP-7	Matrilysin, Pump-1	28/ 19	PG, G, EI, FN, K IV, LN, Entactin, Tenascin	Lichtschädigung	MMP-3, Plasmin
MMP-19	RASI		G, Ag		Trypsin
MMP-20	Enamelysin		Enamel-Protein, Amelogenin		
MMP-23	CA-MMP				
MMP-25	Leukolysin		Progelatinase A		
MMP-26	Endometase (Matrilysin 2)		Fibrinogen, FN		
MMP-27			VN		
MMP-28	Epilysin				

Abkürzungen: Ag: Aggrecan; EI: Elastin; FG: Fibrinogen; FN: Fibronectin; G: Gelatine; K: Kollagen; LN: Laminin; PG: Proteoglykane; VN: Vitronectin

Während der frühen Wundheilung konnte ein Anstieg der MMP-9-Expression beobachtet werden, welcher mit der Infiltration der Wunde durch die inflammatorischen Zellen einhergeht. Während der Reparaturphase der akuten Wunde kommt es hingegen zu einem Anstieg der MMP-2-Expression (Tarlton et al., 1997).

Laminin-5 entfaltet während der Wundheilung einen promigratorischen Effekt, da es durch das vermehrt sezernierte MMP-2 an der γ 2-Kette gespalten wird (Giannelli et al., 1997). Dieser proteolytische Prozess legt eine kryptische Sequenz offen, die dem EGF ähnelt und ebensolche wundheilungsfördernden Eigenschaften besitzt. MMPs legen während der Wundheilung durch Prozessierung der ECM noch weitere den Wachstumsfaktoren ähnliche Sequenzen offen, welche Matrikine genannt werden (Tran et al., 2004). Überdies konnte die Expression von Kollagen IV, welches ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran ist und ausschließlich in dieser vorkommt, mit einer erhöhten Expression von MMP-2 und MMP-9 assoziiert werden (Slade et al., 1995).

Es ist bekannt, dass in chronischen Wunden, bei der Tumordinvasion und bei Krankheiten wie Arthritis oder Arteriosklerose ein gestörtes Gleichgewicht zwischen MMPs und ihren Inhibitoren herrscht. Dies liegt zum einen an der Überexpression bestimmter MMPs. So konnten Philipp et al. bzw. Wall et al. in chronischen Wunden eine erhöhte Aktivität und Expression von MMP-2 und MMP-3, verglichen mit Proben normaler Haut, nachweisen (Philipp et al., 2004; Wall et al., 2003). Sowohl Kollagenase 1 (MMP-1) als auch Stromelysin-1 (MMP-3) wurden in Fibroblasten des chronischen Wundgrundes nachgewiesen. In akuten Wunden ist Stromelysin-1 für die Loslösung der proliferativen Keratinozyten von der Basallamina am Wundrand verantwortlich (Pilcher et al., 1999). Die Überexpression von MMP-3 in chronischen Wunden könnte ein Grund dafür sein, dass sich die Keratinozyten nicht am Wundgrund anheften und somit keine Basallamina bilden können (Wall et al., 2003).

Ein anderer Grund für das Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs in chronischen Ulzera ist das pathogene Expressionsmuster der TIMPs. TIMP-1 beispielsweise ist verantwortlich für die Inhibition vieler MMPs (außer MT-MMPs) und weist interessanter Weise KGF- und FGF-ähnliche Aktivitäten auf (Curran and Murray, 1999; Tran et al., 2004). Die Expression von TIMP-1 nahe der Basallamina konnte jedoch nur in akuten, nicht aber in chronischen Wunden nachgewiesen werden (Saarialho-Kere, 1998). Dies lässt neben der Überexpression einiger MMPs auf erhöhte Aktivität

von MMPs in chronischen Wunden schließen.

Durch die vermehrte Degradation der Extrazellulären Matrix durch MMPs kommt es in chronischen Wunden zu einer ständig verlängerten Entzündungsphase, da die Fragmente der ECM von inflammatorischen Zellen prozessiert werden müssen. Die Anwesenheit der inflammatorischen Zellen in der Wunde verhindert jedoch den Beginn der Reparaturphase und somit die Schließung der Wunde (Werner and Grose, 2003).

Wie Hornebeck und Tran berichten, wird TIMP-1 mit zunehmender Alterung von Fibroblasten *in vivo* und *in vitro* herunterreguliert (Hornebeck, 2003; Tran et al., 2004). Basierend auf der Annahme, dass in chronischen Wunden von Patienten mit Diabetes mellitus ein pathologisches Verhältnis zwischen MF- und PMF-Zellen besteht, könnte diese Tatsache erklären, wieso es hier häufig zu einem Ungleichgewicht von MMPs und ihren Inhibitoren kommt.

1.5.2 Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen

Während physiologischer Prozesse wie der Entwicklung oder aber während der Wundheilung ist ein Zusammenspiel aller beteiligter Zelltypen vonnöten. Die Zelltypen kommunizieren untereinander über Zytokine und Wachstumsfaktoren und antworten auf derlei Stimuli mit der Expression von Proteinen, wie z.B. weiteren Wachstumsfaktoren oder MMPs. Jedem Zelltyp kommen spezifische Aufgaben in einem komplizierten Gefüge zu und eine feine Abstimmung der verschiedenen Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie der Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren ist essentiell. Während der Wundheilung spielen Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) und FGFs (Fibroblasten-Wachstumsfaktoren) eine sehr wichtige Rolle. Aus *in vitro*-Studien sind eine Reihe von Daten bekannt, die den Einfluss solcher bioaktiver Moleküle auf die Expression und Aktivität von MMPs belegen.

Wird beispielsweise eine organotypische Kokultur von Fibroblasten und Keratinozyten mit EGF behandelt, so kommt es zur Proliferation der Epithelzellen. Die Basallamina bricht an einigen Stellen auf und Epithelzellen können in die Dermis einwandern. Bei dieser Einwanderung wurde ein Anstieg von MMP-1 und MMP-9 beobachtet; die Einwanderung konnte durch Zugabe von TIMP-2 verhindert werden (Charvat et al., 1998; Moon et al., 2002; Zeigler et al., 1996a). Allerdings ist die Migrationsfähigkeit von Keratinozyten nicht direkt von MMP-9 abhängig, da eine Inhibition dieser Proteasen nicht zur Beeinträchtigung der Migrationsfähigkeit dieser

Zellen geführt hat. MMP-2 hingegen spielt eine wichtigere Rolle bei der Migration (Mäkelä et al., 1999).

MMP-9 scheint auf Transkriptionsebene aktiviert zu werden, wenn eine langanhaltende Aktivierung von MEK/ERK gewährleistet ist, z.B. nach einem Signal mit HGF (Hepatozyten-Wachstumsfaktor) oder EGF. KGF und IGF-1 (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1) führen nicht zu einer solchen langanhaltenden Aktivierung von MEK/ERK und werden deshalb nicht mit der Invasion von Keratinozyten in die Dermis assoziiert. MMP-9 wird also als direkte Antwort auf EGF exprimiert und zwar hauptsächlich in der Epidermis. Die Expression von MMP-9 hängt von MAPK-Signalwegen ab, besonders vom ERK- und JNK-Signalweg. Beide Signalwege führen zur Bildung von aktivem c-Fos und c-Jun, die als Homodimere von c-Jun oder aber als Heterodimeren aus c-Jun und c-Fos den Transkriptionskomplex AP-1 bilden (Zeigler et al., 1999).

MMP-1 wird hauptsächlich von dermalen Fibroblasten exprimiert und seine verstärkte Expression ist eher auf Faktoren aus der Epidermis zurückzuführen, als auf die Zugabe exogener EGFs zu einer organotypischen Kultur. Wichtig scheinen hier vor allem Faktoren zu sein, die über den IL1-Rezeptor und den EGF-Rezeptor wirken (Moon et al., 2001). So reagieren Fibroblasten auf das von differenzierenden Keratinozyten sezernierte Stratifin mit erhöhter MMP-1-mRNA-Synthese. Interessanter Weise stimulieren die Fibroblasten ihrerseits die Sekretion des Stratifin durch die Keratinozyten (Ghahary et al., 2005).

Die Inkubation von Fibroblasten in Keratinozyten-konditioniertem Medium führt zu einer erhöhten Expression von MMP-1, sowie zu einer höheren Proliferationsrate der Fibroblasten. Ersteres konnte auf EGFR- und IL1-Rezeptor-Signalwege zurückgeführt werden, wohingegen die erhöhte Proliferation nur auf EGFR-Signalwege zurückgeführt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass in den auf diese Weise stimulierten Fibroblasten sowohl MAPK-Signalwege als auch ERK- und p38-Signalwege aktiviert worden waren. Durch Zugabe von rekombinantem EGF konnten ebenfalls MMP-1 und Proliferation der Fibroblasten hochreguliert werden, wohingegen rekombinantes IL-1 β nur die MMP-1-Expression verstärkte, nicht aber die Proliferation der Fibroblasten (Moon et al., 2002).

MMP-1 wird in stöchiometrischer Weise durch TIMP-1 inhibiert. Inflammatorische Zytokine, die bei der Wundheilung eine wichtige Rolle spielen, wirken in verschiedener Weise auf MMP-1 und TIMP-1 von humanen dermalen Fibroblasten. MMP-1-

und TIMP-1-mRNA werden durch IL-6 und TNF- α hochreguliert, bleiben aber durch IL-1 β unbeeinflusst. Auf Proteinebene wurde das Proprotein von TIMP-1 durch TNF- α nicht beeinflusst, durch IL-6 und IL-1 β jedoch stärker exprimiert. TNF- α führte zur verstärkten Expression von TIMP-1 auf Proteinebene (Dasu et al., 2003).

Auch der Keratinozyten-Wachstumsfaktor KGF scheint seine wundheilungsfördernde Wirkung unter anderem über die Stimulation der Expression von MMPs durch Keratinozyten zu entfalten. Madlener et al. konnten zeigen, dass 5 – 8 Stunden nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit KGF ein erhöhter Anteil an MMP-10 (Stromelysin-2) mRNA in den Zellen zu detektieren war. Ähnliche Effekte konnten auch durch Stimulation derselben Zellen mit EGF oder TNF- α erzielt werden, wohingegen der Effekt nach Stimulation mit TGF- β 1 noch deutlicher war (Madlener et al., 1996). In histiotypischen Zellkulturmodellen von porcinen periodontalen Ligamentepithelzellen, kultiviert auf porösem Polycarbonatmembranen, ist es gelungen, die Aktivität von MMP-9 durch die Stimulation der Zellen mit KGF zu erhöhen. Allerdings konnte dieser Effekt nicht in Kulturgefäßen aus Plastik beobachtet werden (Putnins et al., 1995).

Wie Nova et al. beschreiben, wird die aktive Form des MMP-9 von Keratinozyten nur im Zuge der Zelldifferenzierung sezerniert. Im Hautäquivalent, in welchem HaCaT-Zellen benutzt wurden, wurden sowohl MMP-2 als auch MMP-9 reichlich exprimiert und aktiviert, was auf eine direkte Interaktion zwischen Fibroblasten und HaCaT-Zellen hindeutet. Die MMP-2-Expression durch Fibroblasten wurde in der selben Studie durch die Kokultur mit HaCaT-Zellen hochreguliert (Nova et al., 2003).

Überdies wurde ein synergetischer Effekt zwischen Fibroblasten und Keratinozyten beschrieben, durch welchen MMP-2, MMP-9, sowie TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 während der Kokultur dieser beiden Zelltypen hochreguliert wurden (Sawicki et al., 2005).

Aufgrund dieser Beobachtungen liegt es nahe, den Einfluss, welchen die verschiedenen Differenzierungsstadien der Fibroblasten auf Keratinozyten ausüben sowie die Beeinflussbarkeit der Fibroblastensubtypen durch Keratinozyten zu untersuchen.

1.6 Zielsetzung

Hintergrund für die vorliegende Dissertation war die Frage, ob unterschiedliche Differenzierungsstadien humaner dermaler Fibroblasten, nämlich potentiell mitotische

Progenitorfibroblasten der Typen MF II und MF III, sowie postmitotische, terminal differenzierte Fibrozyten (PMF) Keratinozyten in unterschiedlicher Weise beeinflussen können. Zu diesem Zweck wurden zell- und molekularbiologische Aspekte der Keratinozyten betrachtet.

Überdies wurde in dieser Arbeit die Expression spezifischer Markerproteine durch die einzelnen Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien analysiert. Untersucht werden sollten Proteine, welche bei der Wundheilung sowie beim schlechten Heilungsverlauf chronischer Wunden eine Rolle spielen. Dies waren einerseits die wundheilungsförderlichen Faktoren KGF und FGF-BP, welche auf mRNA-Niveau mittels realtime-RT-PCR quantifiziert werden sollten. Im Falle des KGF sollten überdies ELISA-Experimente durchgeführt werden, um die Expression auch auf Protein-Niveau zu untersuchen.

Andererseits sollten verschiedene Matrix-Metalloproteinasen auf mRNA-Ebene sowie mittels Zymographie und Western-Blot auf Proteinebene analysiert werden. Eine Überexpression von MMPs in chronischen Wunden wird für deren schlechten Heilungsverlauf verantwortlich gemacht. Da MMPs sowohl von Fibroblasten als auch von Keratinozyten exprimiert werden, sollten die Versuche sowohl mit den Differenzierungsstadien der Fibroblasten sowie mit Keratinozyten durchgeführt werden, welche mit den Überständen der einzelnen Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien behandelt worden waren.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Ag	Aggrecan
APMA	4-Aminophenylmercursäure
APS	Ammoniumpersulfat
BM	Basalmembran
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BPE	boviner Hypophysenextrakt
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	copy DNA, DNA auf Grundlage ihrer RNA synthetisiert
CP	Crossing Point
CPD	kumulative Populationsverdopplung
Cy3	Carbocyanin 3
d	day / Tag
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EI	Elastin
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FCS	Fötale Kälberserum
FG	Fibrinogen

FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF-BP	FGF-Binding Protein
FGFR	FGF-Rezeptor
FN	Fibronectin
g	Gramm
G	Gelatine
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	hour / Stunde
H ₂ O _d	deionisiertes Wasser
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
HaCaT	Human Adult Low Calcium High Temperature Keratino- cytes
HCl	Hydrochlorsäure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRP	Meerrettichperoxidase
HSF	humane Hautfibroblasten
HSPG	Heparansulfat-Proteoglycan
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
JNK	Januskinase
K	Kollagen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGF / FGF-7	Keratinocyte Growth Factor
ln	Logarithmus naturalis
LN	Laminin
M	Molar
m	Meter
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MF	Mitotische Fibroblasten
min	Minuten
Mio.	Million(en)
ml	Milliliter

mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MT-MMP	Membrane-type MMP
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Saline
PD	Populationsverdopplung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pg	Picogramm
PG	Proteoglycan
pM	Picomolar
PMF	Postmitotische Fibrozyten
rEGF	rekombinantes EGF
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFM	Serumfreies Keratinozytenmedium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue-Inhibitor of MMP
TNF	Tumor Necrosis Factor
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	untraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VN	Vitronectin
w/v	Gewicht pro Volumen

2.2 Chemikalien, Labormaterial

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, in Analyse-Qualität von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D) oder Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D) bezogen.

Polypropylengefäße und Pipettenspitzen (Eppendorff, Hamburg, D) wurden vor Gebrauch autoklaviert. Filtermaterialien wurden von Millipore (Billerica, USA) und Zellkulturplatten und -schalen sowie -inserts von BD Falcon (Erembodegem, BE) bezogen.

2.3 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Lieferant
Cy TM 3-conjugated Goat Anti-Mouse IgG	1:400	Dianova GmbH, Hamburg, D
Cy TM 3-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG	1:400	Dianova GmbH, Hamburg, D
HRP-conjugated Donkey-Anti-Mouse IgG	1:2000	GE Healthcare, Uppsala, SE
HRP-conjugated Sheep-Anti-Rabbit IgG	1:2000	GE Healthcare, Uppsala, SE
Monoclonal Mouse Anti Human Collagen IV IgG	1:25	DakoCytomation, Glostrup, DK
Mouse Monoclonal Anti-MMP-3 IgG	1 µg/ml	Dianova GmbH, Hamburg, D
Mouse Monoclonal Anti-MMP-9 IgG	1 µg/ml	Dianova GmbH, Hamburg, D
Polyclonal Rabbit Anti Human Laminin IgG	1:1000	Novus Biologicals, Littleton, USA
Rabbit Polyclonal Anti-MMP-10 IgG	10 µg/ml	Dianova GmbH, Hamburg, D
Rabbit Polyclonal Anti-MMP-2 IgG	10 µg/ml	Dianova GmbH, Hamburg, D

2.4 Zellkultur

Die bei der Zellkultur verwendeten Materialien waren ausnahmslos steril. Glaswaren wurden heißluftsterilisiert, Plastikwaren waren Einmalartikel und/oder wurden autoklaviert. Alle Lösungen wurden ebenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert (Filter mit 0,22 µm Porendurchmesser). Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt, die durch UV-Licht sowie 70 % Ethanol sterilisiert worden war.

2.4.1 Isolation humaner dermaler Fibroblasten aus Biopsiematerial

Zur Gewinnung humaner dermaler Fibroblasten wurden die Zellen auf verschiedene Weise aus Biopsien von Oberschenkel oder Oberarm gewonnen. Besonders gut eigneten sich die Biopsien jüngerer Spender (bis 40/50 Jahre).

Von den Biopsien wurde ggf. das Fett entfernt und sie wurden 2 mal mit Penicillin/Streptomycin-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Biopsien in 1 mm x 1 mm große Stückchen geschnitten und in einer Petrischale im Abstand von ca. 2 cm angeordnet. Die Hautstückchen wurden einige Zeit durch Antrocknen an der Schale befestigt. Daraufhin wurde vom Rand der Schale vorsichtig DMEM + 20 % FCS in die Schale gegeben. Die Hautstücke wurden nicht vollständig bedeckt. Nach 5 Tagen wurde festgestellt, ob Fibroblasten aus den Biopsien ausgewandert waren. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz (ca. 3 – 4 Wochen) kultiviert und dann subkultiviert. In Passage 3 – 5 wurden die Zellen erstmals eingefroren.

2.4.2 Passagieren von Zellen

Nach dem Absaugen des Mediums vom Zellrasen wurde dieser mit Phosphatgepufferter Saline (PBS⁻, 37 °C) gewaschen und die Zellen anschließend bei 37 °C in Trypsin-Lösung inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Kulturgefäß gelöst hatten, wurde das Trypsin mit serumhaltigem Medium (37 °C) inaktiviert und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt.

PBS ⁻ :	NaCl	0,8 %
	KCl	0,002 %
	Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	0,144 %
	KH ₂ PO ₄	0,02 %
	in H ₂ O _{dd}	
	pH 7,2 – 7,4 stellt sich ein	
Trypsin-Lösung:	Trypsin	0,25 %
	EDTA	0,02 %
	in PBS ⁻ gelöst, mindestens 8 Stunden bei 4°C rühren, pH 7,8 – 8,7, sterilfiltrieren	

2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Fuchs-Rosenthal-Hämazytometers bestimmt. Hierzu wurde die gut durchmischte Zellsuspension mit einer Pasteurpipette in die Kammer gegeben und anschließend die Zellzahl in beiden Diagonalen (2 x 16 Kleinquadrate) der Kammer bestimmt. Mit folgender Formel wurde die Zellzahl in der Ausgangssuspension berechnet:

Zellzahl in 2 Diagonalen × 2500 = *Zellzahl in 1 ml Ausgangssuspension*

2.4.4 Berechnung der Populationsverdopplung (PD) und der kumulativen Populationsverdopplung (CPD)

Die Populationsverdopplung (PD) ist die Anzahl der Zellteilungen, die statistisch jede Zelle innerhalb einer Passage durchlaufen hat. Die kumulative Populationsverdopplung ist die Summe aller Populationsverdopplungen seit der Primärkultur und stellt somit ein Maß für den Differenzierungsstatus der Zellen dar.

$$PD = \frac{\ln_{\text{geerntete Zellzahl}} - \ln_{\text{ausgesäte Zellzahl}}}{\ln 2}$$

2.4.5 Zellkulturmedien

2.4.5.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Dieses Medium wurde für die Kultur von Fibroblasten und HaCaT-Zellen verwendet. Zur Herstellung eines Liters Medium wurden 12,042 g DMEM Pulvermedium (Invitrogen, Carlsbad, USA, No. 61965, Pulver) und 3,7 g NaHCO₃ mit 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (Invitrogen) und H₂O_{dd} auf 900 ml aufgefüllt (pH 7,2 – 7,4 mit HCl). Anschließend wurde das Medium sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurden 10 % FCS (HyClone/Perbio, Bonn, D) hinzugefügt.

2.4.5.2 Keratinocyte Serum Free Medium (SFM)

Für die Proliferation von humanen Keratinozyten ist ein geringerer Ca²⁺-Gehalt nötig, als in Standardmedien enthalten ist. Da fötales Kälberserum die Proliferation von Keratinozyten verhindert, wird SFM mit bovinem Hypophysenextrakt (BPE, 20 – 30 µg/ml) und rekombinantem EGF (rEGF; 0,1 – 0,2 ng/ml) komplettiert. Überdies wurden 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung pro 500 ml SFM zugegeben. Das Medium wurde inklusive rEGF und BPE von Invitrogen/Gibco bezogen. In dieser Arbeit wird das Keratinozytenmedium im Verhältnis 2:1 mit DMEM als potenzielles Kokulturmedium für Keratinozyten und Fibroblasten verwendet.

2.4.6 Gewinnung von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien

2.4.6.1 Gewinnung von Progenitorfibroblasten der Typen MF I und MF II

Fibroblasten einer frühen Passage wurden in DMEM + 20 % FCS 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät (250 – 500 Zellen pro Schale) und für 14 Tage (37 °C, 7 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurden die Klone mikroskopisch mittels morphologischer Kriterien beurteilt und Klone der Differenzierungsstadien MF I und MF II mit Hilfe von Klonringen, welche mit Silikonpaste P80 (Wacker, München, D) auf die Kulturschalen geklebt wurden, trypsiniert und gepoolt. Die CPD wurde bestimmt, um den Differenzierungsstatus der Zellen in späteren Passagen abschätzen zu können. Die Anzahl der Zellen pro Klon unterscheidet sich jedoch für die einzelnen Differenzierungsstadien aufgrund der nachlassenden Proliferationsfreudigkeit während der Differenzierung (Rodemann et al., 1989).

2.4.6.2 Herstellung von Progenitorfibroblasten des Typs MF III

Da Fibroblasten des Differenzierungsstadiums MF III gegenüber Fibroblasten der Typen MF I/II in ihrer Teilungsfähigkeit sehr eingeschränkt sind, ließen sich diese Zellen nicht mehr aus Klonkulturen gewinnen, sondern mussten in dünnen Massenkulturen hergestellt werden. Hierzu wurden durch mehrere Subklonierungen sehr weit differenzierte MF II-Zellen gewonnen. Üblicherweise wurden die MF II-Klone (je nach Zelllinie) 2 – 3 mal gepoolt und anschließend sofort zu einem neuen Koloniebildungstest ausgesät, in welchem ebenso verfahren wurde. Bei der dritten bis vierten Subklonierung hatten die Fibroblasten ihre Fähigkeit zur Klonbildung verloren, sodass auf die Klone des vorherigen Koloniebildungstests zurückgegriffen wurde. Diese wurden sehr dünn (0,2 Mio. Zellen/T75) in DMEM + 15 % FCS ausgesät, um die Zellteilung zu stimulieren. In dünnen Massenkulturen wurden Morphologie und Teilungsfähigkeit der Fibroblasten nun mikroskopisch beobachtet und letztere ggf. als MF III klassifiziert.

2.4.6.3 Herstellung von terminal differenzierten Fibrozyten (PMF)

Zur Herstellung postmitotischer Fibroblasten wurden die Zellen sehr dünn ausgesät (0,2 Mio/ T75), da Fibroblasten für die terminale Differenzierung Platz benötigen. Die Fibroblasten wurden am nächsten Tag mit 10 ml DMEM + 10 % FCS + 1×10^{-6} M Mitomycin C (MMC) behandelt (Stocklösung 2×10^{-4} M). Nach 2 Tagen Inkubation wurden die Zellen mit DMEM + 10 % FCS gewaschen und daraufhin DMEM + 5 %

FCS zugegeben. Nach weiteren 2 Tagen wurde die zweite Behandlung mit MMC durchgeführt. Wenn die Zellen nach der dritten Behandlung ihre Proliferation eingestellt hatten, wurde nach dem letzten Serumentzug in DMEM + 5 % FCS wieder DMEM + 10 % FCS zugegeben. Die Zellen mussten nun noch ca. 4 Wochen zur Ausdifferenzierung weiterkultiviert werden. Falls die Zellen ihre Proliferation wieder aufnahmen, wurden weitere MMC-Behandlungen durchgeführt. Ausdifferenzierte Fibrozyten konnten durch BrdU-Einbau und β -Galactosidase-Färbung sowie durch Beurteilung der Zellmorphologie unter dem Mikroskop beurteilt werden.

2.4.7 HaCaT-Zellen

Bei HaCaT-Zellen handelt es sich um eine spontan immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie, welche jedoch in Organotypischer Kokultur die Fähigkeit zur Keratinisierung besitzt (Boukamp et al., 1988). HaCaT-Zellen wurden in dieser Arbeit als Modell für epitheliale Keratinozyten verwendet. Die Kultur dieser Zellen erfolgt in DMEM + 10 % FCS. Die Zellen wurden freundlicher Weise von Prof. N. E. Fusenig aus Heidelberg zur Verfügung gestellt.

2.4.8 Einfrieren von Zellen

2.4.8.1 Fibroblasten

Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen pelettiert (1250 U/min, 5 min, 4 °C) und im vorgekühlten Einfriermedium (5 % DMSO, 20 % FCS in DMEM) resuspendiert (1 Mio. Zellen/ml). Die Zellsuspension wurde in gekühlte Kryoröhrchen pipettiert (jeweils 1 - 1,5 Mio. Zellen) und sofort auf der obersten Stufe des Einfriervorsatzes in den Stickstofftank gehängt. Nach 15 min wurde der Einsatz auf die mittlere Stufe heruntergedreht und nach weiteren 30 min wurden die Zellen 1 h auf der untersten Stufe belassen. Anschließend wurden die Tubes in flüssigem Stickstoff konserviert.

Je weiter die Fibroblasten differenziert waren, desto geringer war ihre Anwachsrate. Aus diesem Grunde wurden MF III-Zellen und PMF-Zellen nie eingefroren.

Beim Einfrieren wurden alle Zelltypen stets mittels Dapi-Färbung auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht (s.u.).

2.4.8.2 HaCaT-Zellen

Das Medium wurde am Vortag gewechselt und die HaCaT-Zellen sollten zu 90 % konfluent sein. Die Zellen wurden trypsiniert, gezählt und pelletiert (1250 U/min, 5 min, RT). Jeweils 2 Mio. Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (DMEM + 20 % FCS, 10 % Glycerin, reinst) resuspendiert und in Kryoröhrchen pipettiert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in einen Nunc-Einfrierbehälter gestellt und für mindestens 30 min bei 4 °C gekühlt. Hierauf wurde der Einfrierbehälter über Nacht bei –80 °C gelagert und die Kryoröhrchen anschließend in flüssigem Stickstoff überführt.

2.4.9 Auftauen von Fibroblasten und HaCaT-Zellen

Da Kristallbildung sowie DMSO den Zellen schaden, musste das Auftauen der Zellen so schnell wie möglich durchgeführt werden, das DMSO bzw. Glycerin musste aus dem Zellkulturmedium entfernt werden.

Die Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff genommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in DMEM + 20 % FCS (37 °C) in ein Zellkulturgefäß ausgesät. Bei Fibroblasten wurde frühestens 4 Stunden nach dem Auftauen das Medium gewechselt und die Anwachsrate bestimmt. Bei HaCaT-Zellen erfolgte der Mediumwechsel 4 – 16 h nach dem Auftauen.

2.4.10 Färbemethoden in der Zellkultur

2.4.10.1 Coomassie-Färbung – Proteinfärbung

Mittels Coomassie-Färbung lassen sich die (zytoplasmatischen) Zellproteine blau anfärben. Das Medium wurde von den Zellen gesaugt und letztere mit PBS⁻ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3,7 %iger Formaldehyd-Lösung 10 min auf dem Kulturgefäß fixiert. Das Formaldehyd wurde abgegossen und die Zellen wurden für weitere 10 min, mit 70 % Ethanol bedeckt, inkubiert. Nachdem das Ethanol abgegossen worden war, wurden die Zellen (im Trockenschrank) getrocknet.

Die Coomassie-Lösung (0,05 % Coomassie Brilliant Blue G, 20 % Methanol, 7,5 % Eisessig in H₂O_d) wurde nun für 30 – 40 s auf den Zellen belassen, woraufhin die Zellen gewässert und erneut getrocknet wurden.

2.4.10.2 Giemsa-Färbung – Kernfärbung

Die Giemsa-Färbung dient der Deutlichmachung der Zellkerne, welche durch A-T-Spezifität des Farbstoffes violett angefärbt werden und nun z.B. auf ihre Größe hin untersucht werden konnten.

Die Fixierung erfolgt ebenso wie bei der Coomassie-Färbung bis zum ersten Trockenvorgang. Sørensen A-Lösung (9,078 g KH_2PO_4 in 1 l H_2O_d) und Sørensen B-Lösung (11,876 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1 l H_2O_d) wurden direkt vor der Färbung gemischt, sodass das Gemisch einen pH-Wert von 7,2 – 7,4 aufwies. Anschließend wurden 100 ml dieser Lösung mit 4 ml Giemsa-Konzentrat gemischt und die Lösung 30 – 40 min auf den Zellen belassen. Danach wurden die Zellen gut gewässert und daraufhin getrocknet.

2.4.10.3 Dapi-Färbung – Kernfärbung und Mykoplasmentest

4',6-Diamidino-2-phenylindole-dihydrochlorid (Dapi) komplexiert mit dsDNA und macht so die Zellkerne und eventuell vorhandene Mykoplasmen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Die zu färbenden Zellen wurden dünn auf Aceton-gereinigten und autoklavierten Deckgläsern ausgesät. Nach 2 Tagen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und mit einem Dapi-Methanol-Gemisch (350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Stock-Lösung, 1:10.000 in Methanol verdünnt) 2 – 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit Methanol gewaschen, in Methanol 2 – 3 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einem Objektträger zur Verstärkung der Fluoreszenz in Mowiol-Lösung eingebettet. Nun konnten die Präparate im Fluoreszenzmikroskop durch den Dapi-Filter bei einer Anregung von 369 nm/ Emission von 450 nm betrachtet werden.

Die benötigte Mowiol-Lösung wurde hergestellt, indem 30 g Glycerin und 12 g Mowiol gemischt wurden, daraufhin wurden 30 ml H_2O_d zugegeben und nach kurzem Rühren 2 h bei RT inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 60 ml 0,2 M Tris-Puffer, pH 8,5 zugegeben und das Gemisch unter gelegentlichem Rühren auf 50 °C erwärmt. Es folgte eine Zentrifugation bei maximaler Drehzahl für 15 min, woraufhin der klare Überstand aliquotiert und bei –20 °C gelagert wurde.

2.4.10.4 β -Galactosidase-Färbung

Zur Unterscheidung postmitotischer Fibrozyten von mitotischen Fibroblasten wurde diese Färbemethode angewandt (Dimri et al., 1995). Da PMF-Zellen β -Galactosidase exprimieren, färbt sich deren Zytoplasma vor allem um den Zellkern herum blaugrün

an. Die Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen, 3 – 5 min in 3 % Formaldehyd fixiert, mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung gewaschen und dann für 16 h ohne CO₂-Begasung mit der Färbelösung inkubiert. Die Färbelösung war zuvor durch 1:20-Verdünnung der Stock-Lösung (20 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid [X-Gal, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D] in N,N-Dimethylformamid) in β-Galactosidase-Puffer und anschließendes Filtern der Lösung hergestellt worden.

β-Galactosidase-Puffer:	Zitronensäure	40 mM
	Kalium-Ferrocynide	5 mM
	Kalium-Ferricynide	5 mM
	NaCl	150 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2 mM
	in H ₂ O _{dd} , pH 5,5, lichtempfindlich	

2.4.10.5 Immunfluoreszenzfärbungen (Kollagen IV, Laminin)

Für den Nachweis von Kollagen IV und Laminin wurden immunzytologische Fluoreszenzfärbungen angewandt. Die Zellen wurden 3 Tage vor der Färbung in Glas-Objektträger-Kammern (BD Falcon, Erembodegem, Belgien) ausgesät, auf welchen die Zellen vor dem Färben 15 min mit 4% Formaldehyd fixiert wurden. Es folgte eine Epitopendemaskierung (5 min Trypsinbehandlung bei 37 °C für Laminin; 2 x 10 min heißer Citratpuffer für Kollagen IV). Anschließend wurden die Objektträger 3 x 5 min in Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Objektträger 30 min in 10% FCS und 0,3 % Triton-X100 in Tris-BSA inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Monoclonal Mouse Anti Human Collagen IV, Verdünnung 1:25 in Tris-BSA/ Polyclonal Rabbit Anti Human Laminin, Verdünnung 1:1000 in Tris-BSA) bei 4 °C über Nacht. Es wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt, welche mit Tris-BSA ohne Primärantikörper inkubiert wurde, ansonsten aber der gleichen Färbeprozedur unterzogen wurde.

Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurden die Objektträger 3 x 5 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend 30 min bei RT im Dunkeln mit dem Cy3-markierten Sekundärantikörper (Goat-Anti-Mouse/Rabbit Cy3-conjugated [Dianova, Hamburg, D], Verdünnung 1:400) dekoriert. Der Antikörper-Lösung wurden 4 % FCS sowie 1% Dapi-Lösung (350 µg/ml in Methanol) zugegeben, um gleichzeitig eine Kernfärbung zu erhalten.

Der überschüssige Sekundärantikörper wurde durch 3 x 5 minütiges Waschen entfernt, die Deckgläschen wurden getrocknet und mit Glyceringelatine auf einem Objektträger befestigt. Die Visualisierung erfolgte durch Anregung der Präparate mit Licht der Wellenlängen 369 nm (Dapi) bzw. 552nm/ 570 nm (Cy3) am Fluoreszenzmikroskop.

10 x Waschpuffer:	Tris Base	0,25 M
	NaCl	1,4 M
	Tween 20	0,5%
	in H ₂ O _{dd} , pH 7,5, vor Gebrauch 1:10 verdünnt	
Tris-BSA:	BSA	0,1% in 1 x Waschpuffer
10 x Citratpuffer:	Zitrat-Monohydrat	0,1 M
	in H ₂ O _{dd} , pH 6,0, vor Gebrauch 1:10 verdünnt	

2.5 ELISA für den Nachweis humanen KGFs

Um den Gehalt des Zellkulturmediums an *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) zu ermitteln, wurde ein *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Fibroblasten verschiedener Differenzierungsstadien wurden in 6-Well-Platten oder großen Zellkulturflaschen (sofern noch eine RNA-Isolation durchgeführt werden sollte) ausgesät. Es folgte ein dreitägiger Serumentzug, sofern Medien mit und ohne FCS verglichen werden sollten, um den Nachklappeffekt zu vermeiden. Anschließend wurden die zu untersuchenden Zellkulturmedien in definierten Mengen zugegeben. Nach definierten Zeitpunkten wurden Aliquots des Überstandes in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Zellzahl bestimmt.

Der Quantikine Human KGF (FGF-7) Immunoassay (R&D Systems Inc., Wiesbaden-Nordenstadt, D) wurde laut Anleitung durchgeführt. Die bei einer OD von 450 nm ermittelten Ergebnisse wurden mit Referenzmessungen bei einer OD von 570 nm verrechnet. Anschließend wurden Mittelwerte der Doppelbestimmungen gebildet und mit den gemessenen Standardkonzentrationen wurde eine Standardkurve erstellt. Mit den Werten der Standardkurve wurden über die Microsoft-Excell-Funktion „Schätzer“ die Werte für den Proteingehalt der jeweiligen Proben errechnet, der KGF-Gehalt auf das Volumen des Zellkulturmediums bezogen und anhand der ermittelten Zellzahlen die Expression des KGF auf 1 Mio. Zellen bezogen. Da die Inter-Assay-Varianz sehr

gering war, wie der Vergleich aller Standardkurven zeigte, konnten auch Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen verglichen werden.

2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE

2.6.1 Probengewinnung aus Zellkulturüberständen und Proteinbestimmung

Die zu untersuchenden Zellen mussten für die Dauer der Konditionierung des Mediums serumfrei kultiviert werden, da serumhaltiges Zellkulturmedium wegen des hohen Proteingehalts nicht einzuengen ist. Die betreffenden Zellkulturmedien wurden von den zu untersuchenden Zellen genommen und zum Entfernen abgelöster Zellen zentrifugiert (5 min, 1250 rpm, 4 °C). Anschließend wurden die Überstände auf Centricon® Plus-20-Säulen (Millipore, Billerica, USA) übertragen und in diesen auf ein Volumen von ca. 100 µl eingengt (2 h, max. rpm, 4 °C). Die Volumina der Überstände sowie deren Proteinkonzentration wurden bestimmt.

Für die Proteinbestimmung der Proben wurden pro Probe 3 x 3 µl einer 1:10-Verdünnung in 3 Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Als Standard diente eine BSA-Lösung, mit welcher ebenso verfahren wurde (1 - 20 mg/ml BSA, je nach erwarteter Proteinausbeute der Proben). Es wurden 25 µl von Lösung A und 200 µl von Lösung B des DC Protein Assay (BioRad Laboratories, Hercules, USA) in jedes Well pipettiert, anschließend wurden die Proben zur Entfaltung der Farbreaktion 5 min bei RT inkubiert. Das Messen der Proben erfolgte mittels Mikrotiterplatten-Photometer (8 s maximal geschüttelt, Wellenlänge 620 nm).

Anhand folgender Formel wurden die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt:

$$Konzentration_{Probe} = \frac{Mittelwert_{Probe}}{Mittelwert_{BSA-Lösung}} \times Konzentration_{BSA-Lösung}$$

Auf ein Gel wurden jeweils gleiche Proteinmengen aller Proben aufgetragen. Daher wurde jeweils die gewünschte Proteinmenge (meistens 100 µg) jeder Probe in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und mit dem entsprechenden Volumen an 5 x Probenpuffer versehen. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C gekocht.

2.6.2 Gießen des Gels

Zwei mit Ethanol gründlich gereinigte Glasplatten wurden mit ebenfalls gereinigten Spacern versehen und in der Vorrichtung zum Giessen der Gele arretiert. Die im Folgenden verwendete Acrylamid-Lösung war eine 37,5:1-Mischung. Zum Abdichten des Gels wurde ein Sockelgel gegossen (für 1-2 Gele 10,05 ml Acrylamid-Lösung, 3 ml Trenngelpuffer, 1,65 ml H₂O_{dd}, 0,15 ml APS-Lösung, 0,03 ml TEMED). Nach dem Polymerisieren des Sockelgels wurde das Trenngel (pro Gel 7,5 ml Acrylamid-Lösung, 8 ml H₂O_{dd}, 7 ml Trenngelpuffer, 0,1 ml APS-Lösung, 0,01 ml TEMED) gegossen, die Acrylamid-Konzentration betrug 10,4 %. Das Trenngel wurde bis zur vollständigen Polymerisation mit Isopropanol überschichtet, welches daraufhin mit H₂O_d entfernt wurde. Es folgte das Gießen des Sammelgels (pro Gel 0,75 ml Acrylamid-Lösung, 3 ml H₂O_{dd}, 1,25 ml Sammelgelpuffer, 0,1 ml APS-Lösung, 0,005 ml TEMED). Je nach gewünschter Anzahl und Größe der Taschen wurde vor der Polymerisation ein gereinigter Kamm zwischen den Glasplatten befestigt.

2.6.3 Elektrophorese

Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt, letztere mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Taschen nach Entfernen des Kammes gespült. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben sowie der Marker (Kaleidoscope Precision Plus Protein™ Standard, Bioad Laboratories, Hercules, USA) in die Taschen gefüllt und eine Stromstärke von 35 mA pro Gel angelegt. Die Gele wurden für ca. 2 h laufen gelassen, bis die Lauffront das Sockelgel erreicht hatte. Vorsichtig wurde das Gel zwischen den Glasplatten herausgenommen und Sammel- sowie Sockelgel entfernt.

2.6.4 Lösungen

APS-Lösung:	Ammoniumpersulfat	10 % (w/v) in H ₂ O _{dd}
5 x Probenpuffer :	Sammelgelpuffer	25 %
	Bromphenolblau	0,1 %
	10 % SDS-Lösung	25 %
	Glycerin	40 %
	β-Mercaptoethanol	10 %
Trenngelpuffer (4 x):	Tris-Base	1,5 M
	10 % SDS-Lsg.	4 %
	in H ₂ O _{dd} , pH 8,8 mit HCl, bei RT gelagert	

Sammelgelpuffer (4 x):	Tris-Base	0,5 M
	10 % SDS-Lsg.	4 %
	in H ₂ O _{dd} , pH 6,8 mit HCl, bei RT gelagert	
Elektrophoresepuffer:	Glycin	0,2 M
	Tris-Base	0,025 M
	SDS	0,5 % (w/v)
	in H ₂ O _{dd} , pH 8,6 stellt sich ein	

2.7 Western Blotting

Um die Proteine eines SDS-Gels auf eine Nitrozellulose-Membran (Optitran BA-S 83 Reinforced NC, 0,2 µm; Schleicher & Schuell, Dassel, D) zu übertragen, wurden ein auf das Gel passendes Stück Membran und 2 – 3 Lagen Whatman-Papier (3 mm; Schleicher & Schuell, Dassel, D) in Anodenpuffer und 2 – 3 Lagen Whatman-Papier Kathodenpuffer getränkt. Anschließend wurden die in Kathodenpuffer getränkten Papiere luftblasenfrei übereinander auf die Kathode der Halbtrocken-Blotting-Vorrichtung gelegt, die Membran aufgebracht und dann das Gel auf die Membran gelegt. Es folgten die in Kathodenpuffer getränkten Papiere. Bevor die Kathodenplatte angebracht wurde, wurden vorsichtig alle Luftblasen aus dem Stapel gewalzt und der Stapel mit etwas Kathodenpuffer befeuchtet. Die Kathode wurde mit Hilfe von Gewichten auf die Anode gepresst und das Gel wurde ca. 2 h bei 0,8 mA/cm² Gel geblottet.

Um den Erfolg des Blottens sofort nach dem Auseinanderbauen der Blotvorrichtung zu visualisieren, wurde die Membran nun in Ponceau S-Lösung geschwenkt, worauf sich die auf der Membran haftenden Proteine anfärbten.

Um nichtspezifische Bindungen bei der nun folgenden Immunreaktion zu unterbinden, wurde die Membran zuerst 1 h in TBS/T-MMP geblockt. Es folgten 3 Waschgänge à 10 min in TBS/T.

Über Nacht wurde der erste Antikörper gegen das gesuchte Protein in der angegebenen Konzentration in TBS/T-MMP bei 4 °C auf der Membran inkubiert. Nach weiteren 3 Waschgängen wurde der 2. Antikörper (Anti-Rabbit/-Mouse, Verdünnung 1:2000) für 2 h bei RT auf der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut 3 mal gewaschen und die Proteinbanden mittels ECL-Kit (GE Healthcare, Uppsala, SE) visualisiert. Hierzu wurden Lösung A und Lösung B in gleichen Anteilen

gemischt und für 5 min auf der Membran inkubiert. Dann wurde die Lösung entfernt und ein Röntgenfilm (Cronex 5; Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, BE) auf der Membran exponiert. Dieser wurde nach spezifischer Belichtungszeit in der Entwicklungsmaschine entwickelt (Entwickler G135, Fixierer G354; Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, BE).

Anodenpuffer :	Borsäure	0,31 % (w/v)
	10 % SDS-Lösung	0,4 %
	Methanol	20 %
	in H ₂ O _{dd} , pH 9,0 mit NaOH	
Kathodenpuffer :	Borsäure	0,31 % (w/v)
	10 % SDS-Lösung	0,4 %
	Methanol	5 %
	in H ₂ O _{dd} , pH 9,0 mit NaOH	
TBS/T:	Tris-HCl	10 mM
	NaCl	100 mM
	Tween 20	0,5 %
	in H ₂ O _{dd} , pH 7,5	
TBS/T-MMP:	Magermilchpulver	5 % in TBS/T

2.8 Zymographie modifiziert nach (Heussen and Dowdle, 1980)

Mittels Zymographie werden die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in Zellkulturmedien von bestimmten Zellen untersucht. Die Methode beruht auf dem Prinzip der SDS-PAGE, wobei dem Trenngel Gelatine zugegeben wird, welche dann durch die MMPs abgebaut werden kann. Nach Coomassie-Färbung des Gels erhält man durchsichtige Banden auf blauem Hintergrund.

2.8.1 Probengewinnung

Die Proben wurden auf die selbe Weise gewonnen, wie Proben für die SDS-PAGE (siehe S. 32). Zur Aktivierung der in den Überständen enthaltenen MMPs wurden Aliquots der Proben 4 h bei 37°C mit APMA (20 mM in 80 mM NaOH, 1:6 bis 1:20 mit der Probe verdünnt) inkubiert. Durch die proteolytische Aktivierung ergibt sich ein für die einzelnen MMPs charakteristischer Bandenshift.

2.8.2 Zymographie

Die Zymographie-Gele wurden wie bei der SDS-PAGE gegossen. Eine Konzentration von 10 % Acrylamid wurde gewählt und dem Sammelgel wurden 0,35 % Gelatine (Stock-Lösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert) zugegeben. Die Proben wurden in gewünschter Proteinmenge mit dem entsprechenden Anteil 4 x Probenpuffer komplettiert und sofort in die Taschen des Gels gegeben. Als Positivkontrolle diente Kollagenase. Das Gel lief bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 35 mA/Gel .

Nach dem Lauf wurde das Gel 1 h in Triton-Lösung geschüttelt, um das SDS aus dem Gel zu entfernen. Das Gel wurde in H_2O_d gespült und dann über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Degradationslösung inkubiert.

2.8.3 Detektion

Am nächsten Morgen wurde das Gel 1 h im Fixierer geschüttelt und dann 20 min in heißer Färbelösung gefärbt. Zur Entfärbung des Gels wurde das Gel im Entfärber inkubiert, bis die Banden deutlich zu sehen waren. Das Gel wurde auf dem Lichttisch betrachtet, fotografiert und anschließend getrocknet.

4 x Probenpuffer:	Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM
	SDS	4 % (w/v)
	Glycerin	20 %
	Bromphenolblau	0,01 (w/v) in H_2O_{dd}
Elektrophoresepuffer:	Tris-Base (pH 8.4)	50 mM
	Glycin	190 mM
	SDS	0,1 % (w/v) in H_2O_{dd}
Triton-Lösung:	Triton-X 100	2,5 %
Degradationslösung:	Tris-HCl (pH 7.5)	50 mM
	NaCl	200 mM
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	10 mM
	Brij 35	0,02 % (v/v) in H_2O_{dd}
Fixierer:	Eisessig	10 %
	Ethanol	10 % in H_2O_{dd}

Färbelösung:	Serva Blau R250	0,5 %
	Eisessig	10 %
	Ethanol	45 % in H ₂ O _{dd}
Entfärber:	Eisessig	10 %
	Ethanol	25 % in H ₂ O _{dd}
Aufbewahrungslösung:	Eisessig	7 %
	Glycerin	1 % in H ₂ O _{dd}

2.9 Realtime RT-PCR (Roche Lightcycler[®])

2.9.1 RNA-Isolation

Zur Isolation einer ausreichenden Menge an RNA wurden pro Bedingung mindestens 0,5 Mio. Zellen benötigt. Die Zellen wurden trypsiniert, pelletiert und in Lysepuffer aufgenommen. Die Isolation der RNA wurde gemäß beigefügter Anleitung mit Hilfe des *Total RNA Isolation NucleoSpin[®] RNA II Kits* (Macherey & Nagel, Düren, D) durchgeführt. Die Zellpellets wurden zuvor durch mehrmaliges Aufziehen in einer Kanüle (\varnothing 0,4 mm) homogenisiert. Die Elution erfolgte mit 50 μ l RNase-freiem Wasser, welches zweimal auf die Säule gegeben wurde.

Nach der Isolation wurde der RNA-Gehalt der Proben durch Messen der Absorption bei 260 nm festgestellt und folgendermaßen errechnet:

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Absorption}_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor.}$$

Die Kontamination der isolierten RNA durch Proteine wurde durch Berechnung der Ratio von OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt. Werte zwischen 1,8 und 2,0 wiesen auf ein hochreines RNA-Isolat hin. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70 °C.

2.9.2 Reverse Transkription

Für die Umschreibung der mRNA in cDNA wurde auf den *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche, Penzberg, D) zurückgegriffen. Es wurde jeweils 1 μ g RNA pro Probe umgeschrieben. Die Umschreibungsreaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen: 2 μ l Primer und 1 μ g RNA wurden mit Wasser auf 8,2 μ l aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde bei 70 °C 10 min denaturiert und anschließend sofort 5 min auf Eis gelagert. Der Mix für die Umschreibereaktion (pro Probe 2 μ l 10 x Reaktionspuffer, 4 μ l MgCl₂,

2 µl dNTPs, 1 µl RNase-Inhibitor und 0,8 µl AMV-reverse Transkriptase) wurde hinzupipettiert und die RNA wurde bei folgenden Temperaturen in cDNA umgeschrieben: 10 min 25 °C, 60 min 42 °C, 5 min 99°C, ∞ 4°C. Vor der RT-PCR wurde die cDNA mit RNase-freiem Wasser auf eine Endkonzentration von 100 µl pro 1 µg eingesetzte RNA aufgefüllt. Falls in den Proben zu wenig RNA enthalten war, wurde das maximale Volumen an RNA (8,2 µl) eingesetzt und nach der Umschreibung nicht auf 100 µl sondern auf ein entsprechend niedrigeres Volumen aufgefüllt.

2.9.3 Realtime PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte mit Hilfe eines Kapillaren-Lightcyclers (Roche, Penzberg, D). Von der erhaltenen und entsprechend aufgefüllten cDNA wurden 5 µl zu einem Mix aus 2 µl Primer-Mix (for und rev, jeweils 5 pM), 2 µl FAST, 2,4 µl MgCl₂ und 8,6 µl H₂O pro Probe in eine Kapillare gegeben. Pro Probe wurden immer Dreifachansätze pipettiert. Die Kapillaren wurden an zentrifugiert und nach Ablauf des Selbsttests im Lightcycler plaziert. Der Lauf erfolgte gemäß der für die verschiedenen Primer spezifisch ermittelten Bedingungen (s.u.). Als Housekeeping-Gen, d.h. als interner Standard diente GAPDH. Für jeden Primer wurde eine Negativkontrolle mit H₂O anstelle von cDNA mitgeführt.

Die Ermittlung der relativen Werte für die mRNA wurde folgender Weise durchgeführt: die Crossing Points (CP) für die GAPDH-mRNA und die der zu untersuchenden mRNA wurden ermittelt, wobei das Hintergrundrauschen entfernt wurde. Es folgte die Differenzbildung der Werte der zu untersuchenden mRNA mit den Werten für GAPDH. Anschließend wurden relative Werte für den mRNA-Gehalt der Proben ermittelt, indem die Zahl 2 mit der negativen Differenz als Exponenten potenziert wurde.

$$rel. Wert für den RNA - Gehalt = 2^{-(CP_{gesuchte RNA} - CP_{GAPDH})}$$

2.9.4 Primer

Alle Primer waren intronumspannend, wurden einzeln etabliert und mittels Schmelzkurvenanalyse und Agarosegelelektrophorese auf unspezifische PCR-Produkte überprüft.

mRNA	Sequenz [alle Angaben in 5'-3'-Orientierung]	T _m [°C]	Zyk len	Frag- ment [bp]	Literatur
FGF-BP	for: GAG CTC TCT CTG CAC ATT CTT CC rev: TAG CAT GAC GTG TCC TGC ACT A	68	35	50	(Beer et al., 2005)
GAPDH	for: CCA GTC AGC TTC CCG TTC AGC rev: CCC ATC ACC ATC TTC CAG GAG C	68	30	472	
KGF	for: CCT GAG CGA CAC ACA AGA AG rev: GCC ACT GTC CTG ATT TCC AT	68	30	382	
Kollagen IV α1	for: ATG TCA ATG GCA CCC ATC AC rev: CCT CAA GGT GGA CGG CGT AG	68	37	382	(Lam et al., 2004)
Laminin 5 γ2	for: TGG TGA TTA CAG AAG CCA GAA GG rev: GTC AGT TGA CCT GAG CAT ACC CAT	68	35	436	(Klees et al., 2005)
MMP-2	for: CGG CCG CAG TGA CGG AAA rev: CAT CCT GGG ACA GAC GGA AG	62	32	211	(Lafleur et al., 2005)
MMP-9	for: GAC GCA GAC ATC GTC ATC CAG TTT rev: GCC GCG CCA TCT GCG TTT	68	45	199	(Lafleur et al., 2005)

2.9.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde genutzt, um die PCR-Produkte des Lightcyclers darauf zu überprüfen, ob nur ein PCR-Produkt pro Schmelzpunkt vorhanden war, oder ob unspezifische PCR-Fragmente das Signal des Lightcyclers verfälschten.

Die Gele wurden gegossen, indem 50 ml 1 x TAE-Puffer mit 1 – 1,5 % (w/v) Agarose mehrfach aufgekocht wurden. Die Lösung wurde auf 60 °C abgekühlt, mit 1 µl Ethidiumbromid komplettiert und anschließend in die abgedichtete Gelkammer gegossen. Ein Kamm mit entsprechender Taschengröße wurde vor dem Erstarren des Gels angebracht.

Die Proben wurden aus den Lightcycler-Küvetten in Eppendorfgeläße zentrifugiert und mit 5 µl Blaumarker gemischt. Für einen Molekulargewichtsstandard wurden 2 µl PeqGold DNA-Leiter-Mix (Peqlab, Erlangen, D) mit 2 µl 1 x TAE-Puffer und 1 µl Blaumarker versehen. Der Kamm wurde entfernt und das erkaltete Gel wurde mit 1 x TAE-Puffer überschichtet, sodass es vollkommen bedeckt war. Von den Proben und dem Marker wurden jeweils 5 µl in jeweils eine Tasche des Gels geladen und die DNA bei 90 V ca. 1,5 h aufgetrennt. Die Visualisierung der Banden erfolgte nach dem Lauf auf dem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 312 nm. Alle Banden wurden fotografisch festgehalten.

Blaumarker:	EDTA, pH 8,0	100 mM
	SDS	1 %
	Glycerin	50 %
	Bromphenolblau	0,1 % in H ₂ O _d
50 x TAE-Puffer:	Tris	2 M
	Eisessig	5,71 %
	0,5 M EDTA	10 %
	in H ₂ O _d , pH 8,0	

2.9.5.1 RNase-freies DEPC-Wasser

Um sicherzustellen, dass alle im Wasser evtl. enthaltenen RNasen inaktiviert sind, wurde 0,1 % DEPC in H₂O_{dd} durch kräftiges Schütteln gelöst. Die Lösung wurde über Nacht im Abzug entlüftet und anschließend autoklaviert, um DEPC-Reste zu entfernen.

3 Ergebnisse

3.1 Expression des Keratinozyten-Wachstumsfaktors KGF durch Progenitor-Fibroblasten und postmitotische Fibrozyten

3.1.1 Analyse der KGF-Expression mittels ELISA

3.1.1.1 Analyse von Fibroblasten/ Fibrozyten in Monokultur in verschiedenen Kulturmedien

KGF wird von Fibroblasten exprimiert und in das Kulturmedium sezerniert. Die Expression des KGF sollte differenziert für die verschiedenen Progenitorfibroblasten- bzw. Fibrozyten-Subtypen untersucht werden. Die Zellen wurden in zwei verschiedenen Zellkulturmedien untersucht: im Standardmedium DMEM + 10 % FCS sowie im potentiellen Kokulturmedium für Fibroblasten und Keratinozyten SFM:DMEM 2:1. Da letzteres Medium kein FCS enthält, wurden die Zellen vor der Zugabe des zu analysierenden Kulturmediums einem dreitägigen Serumentzug unterzogen. Nach 1, 2, 3 oder 4 Tagen wurde das Kulturmedium mittels ELISA auf seinen KGF-Gehalt untersucht und dieser dann mit der Zellzahl und dem Mediumvolumen verrechnet. Die daraus resultierende Einheit war KGF [pg] pro Mio. Zellen. Die Analyse wurde wiederholt mit verschiedenen Fibroblasten-Zellstämmen (HSF-X1, -X2, -X4 und -X8) durchgeführt.

Aus Abbildung 3.1.1 wird ersichtlich, dass über den Zeitraum von 4 Tagen eine Anreicherung des KGF im Zellkulturmedium stattfindet. In beiden Kulturmedien exprimieren terminal differenzierte PMF-Funktionsfibrozyten mehr KGF als MF III-Progenitor-Fibroblasten (bis zur doppelten Menge) und letztere wiederum exprimieren deutlich mehr KGF als Progenitorfibroblasten des Typs MF II. Während MF II-Zellen in DMEM + 10% FCS über einen Zeitraum von 4 Tagen einen gleichbleibenden KGF-Gehalt von ca. 2000 pg KGF pro Mio. Zellen im Medium aufweisen, steigt der KGF-Gehalt im Kulturmedium von MF III-Zellen ab Tag 2 langsam über 2000 pg pro Mio. Zellen. Erst an Tag 4 kann jedoch ein sprunghafter Anstieg auf ca. 4500 pg KGF pro Mio. Zellen beobachtet werden. Der KGF-Gehalt im Kulturmedium von PMF-Zellen steigt ab Tag 2 linear an und erreicht an Tag 4 einen Mittelwert von 7000 pg pro Mio. Zellen. Für einzelne Zellstämme wurden Werte bis zu 10000 pg pro Mio. Zellen gemessen. In SFM:DMEM 2:1 liegt der KGF-Gehalt für alle drei Differenzie-

rungsstadien an Tag 1 nach Serumentzug bei unter 1000 pg pro Mio. Zellen. Im Ver-
 suchsverlauf steigt der KGF-Gehalt in den Kulturmedien aller drei Zelltypen langsam

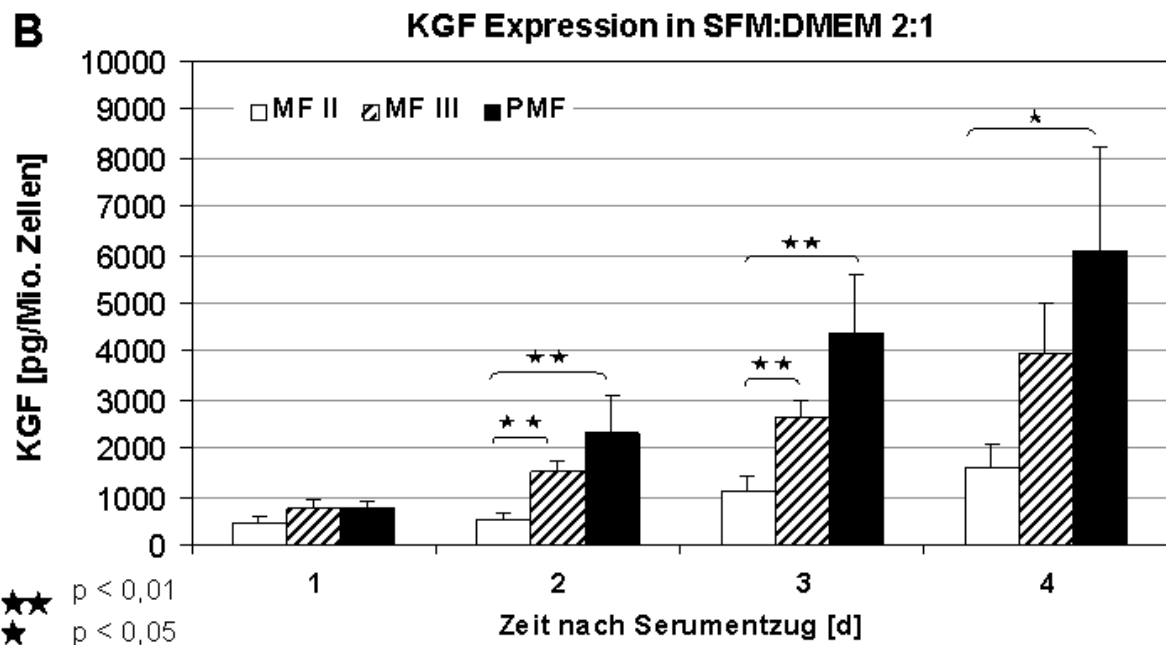
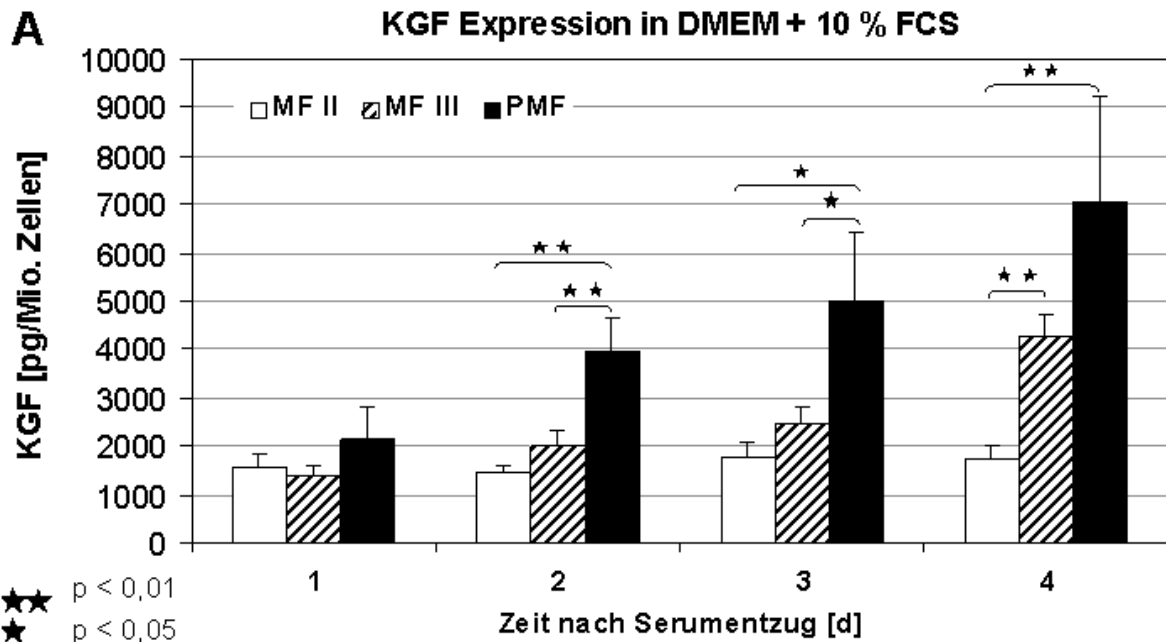


Abbildung 3.1.1 Expression von KGF durch Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungstypen in DMEM + 10 % FCS (A) und SFM:DMEM 2:1 (B). Nach einem dreitägigen Serumentzug wurde das jeweilige Analysemedium auf die Zellen gegeben und nach 1, 2, 3 oder 4 Tagen mittels ELISA auf KGF-Gehalt untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (Anova; $n = 4 - 11$), die Standardfehler wurden in die Diagramme eingezeichnet.

an, bis er an Tag 4 ähnliche Werte wie in DMEM + 10% FCS erreicht. Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster der verschiedenen Fibroblastenstämme wurden hohe Standardfehler berechnet.

3.1.1.2 Analyse von Fibroblasten/ Fibrozyten mit und ohne Kokultur von HaCaT-Zellen

Um die KGF-Expression von Fibroblasten/ Fibrozyten unter normalen Kulturbedingungen zu untersuchen, wurden Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien ohne vorherigen Serumentzug in DMEM + 10 % FCS einzeln sowie in Kokultur mit HaCaT-Zellen auf ihre KGF-Expression untersucht. Hierzu wurden jeweils 0,1 Mio. der jeweiligen Fibroblasten-/ Fibrozytentypen in die Wells einer Sechswellplatte ausgesät. In entsprechende Inserts wurden 50.000 HaCaT-Zellen ausgesät. Am Tag nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel und die Kokultur. Zu den Fibroblasten, welche ohne Kokultur von HaCaT-Zellen untersucht werden sollten, wurden jeweils unbesiedelte Inserts gegeben, die mit derselben Menge an Medium befüllt wurden. Es folgte eine dreitägige Kokultur, in welcher die Zelltypen ihren Stoffwechsel aufeinander einstellen konnten. Nach einem weiteren Mediumwechsel und einer Inkubation von 3 Tagen wurde je Bedingung das Medium aus Insert und Well gepoolt. Ein Aliquot des gepoolten Mediums von jeder Bedingung wurde schockgefroren.

Die Zellzahl der Fibroblasten in den jeweiligen Wells wurde zur späteren Verrechnung der KGF-Expression ebenfalls bestimmt. Da die Zellzahl von PMF- und MF III-Zellen in 6-Well-Platten im Vergleich zur Aussaatdichte stark abnimmt, wurden alle Versuche in Doppelansätzen durchgeführt.

Wie aus Abbildung 3.1.2 ersichtlich wird, ergeben sich bei einer Analyse des Zellkulturmediums ohne vorherigen Serumentzug bereits an Tag 3 signifikante Unterschiede zwischen den Differenzierungsstadien MF II und MF III. Während die MF II-Zellen wie in den Versuchen nach Serumentzug um eine KGF-Expression von 2000 pg pro Mio. Zellen schwanken, haben MF III-Zellen an Tag 3 nach Mediumwechsel das Kulturmedium mit etwa dem doppelten Gehalt an KGF (nämlich 5000 pg pro Mio. Zellen) konditioniert, als dies nach Serumentzug der Fall war. PMF-Zellen wiesen etwa dieselbe KGF-Expression auf, wie an Tag 3 nach Serumentzug, im Mittel etwa 6000 pg pro Mio. Zellen und unterschieden sich damit nicht signifikant von den untersuchten MF III-Zellen. Es wird deutlich, dass die Kokultur mit HaCaT-Zellen die KGF- Synthese aller untersuchten Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungstypen nicht signifikant beeinflusst. Der Unterschied zwischen den PMF-Zellen mit und ohne

kokultivierten HaCaT-Zellen dürfte eher auf Messfehler zurückzuführen sein, die aufgrund der äußerst geringen Zellzahl der PMF-Zellen pro Well entstanden sind. Zwischen den Differenzierungsstadien, welche mit HaCaT-Zellen kokultiviert worden waren, ergaben sich aufgrund der hohen Standardfehler keine signifikanten Unterschiede.

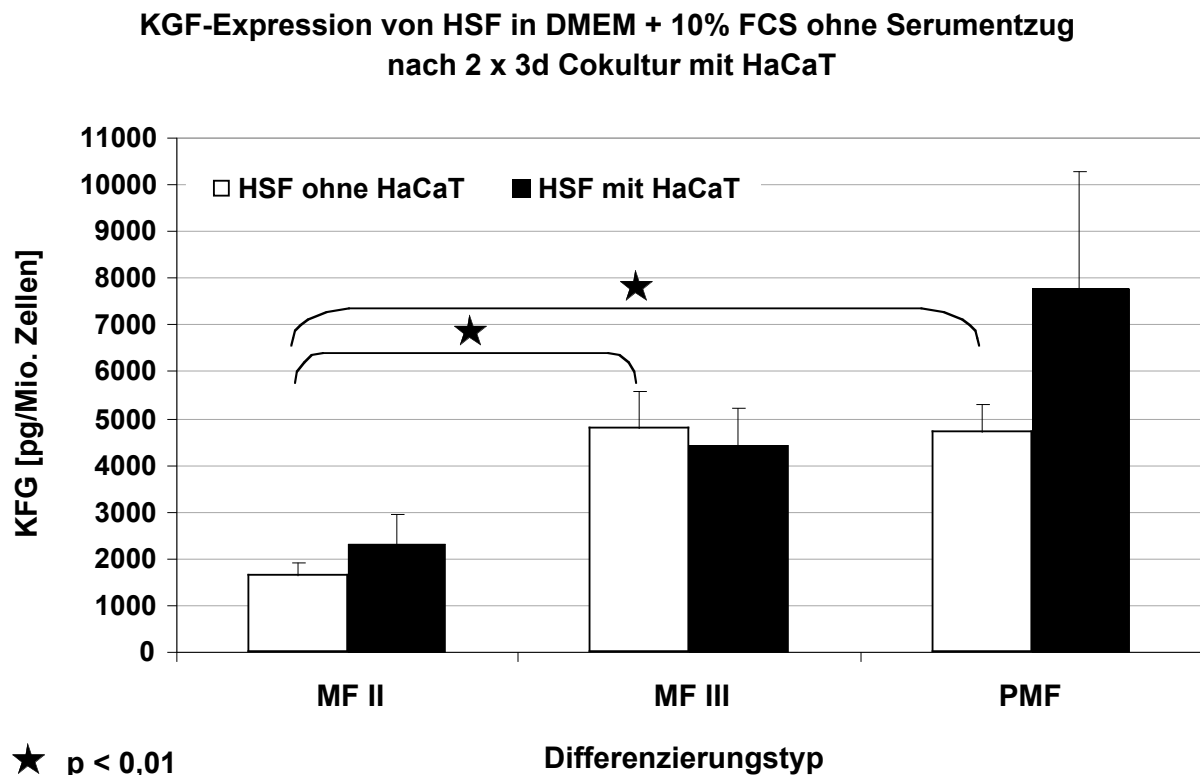


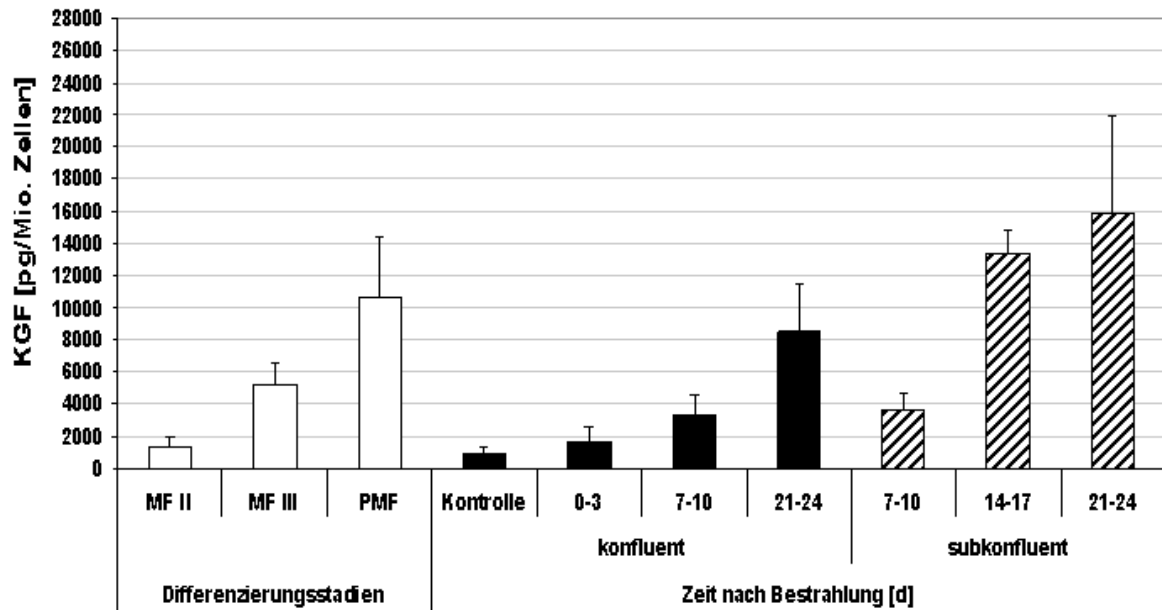
Abbildung 3.1.2: KGF-Expression von Fibroblasten/ Fibrozyten in DMEM + 10% FCS ohne Serumentzug während der Kokultur mit HaCaT-Zellen. Das Medium wurde an Tag 3 nach Mediumwechsel analysiert (Anova; n = 5 – 6; Standardfehler aufgetragen).

3.1.1.3 KGF-Expression von Fibroblasten nach Bestrahlung mit 8 Gy

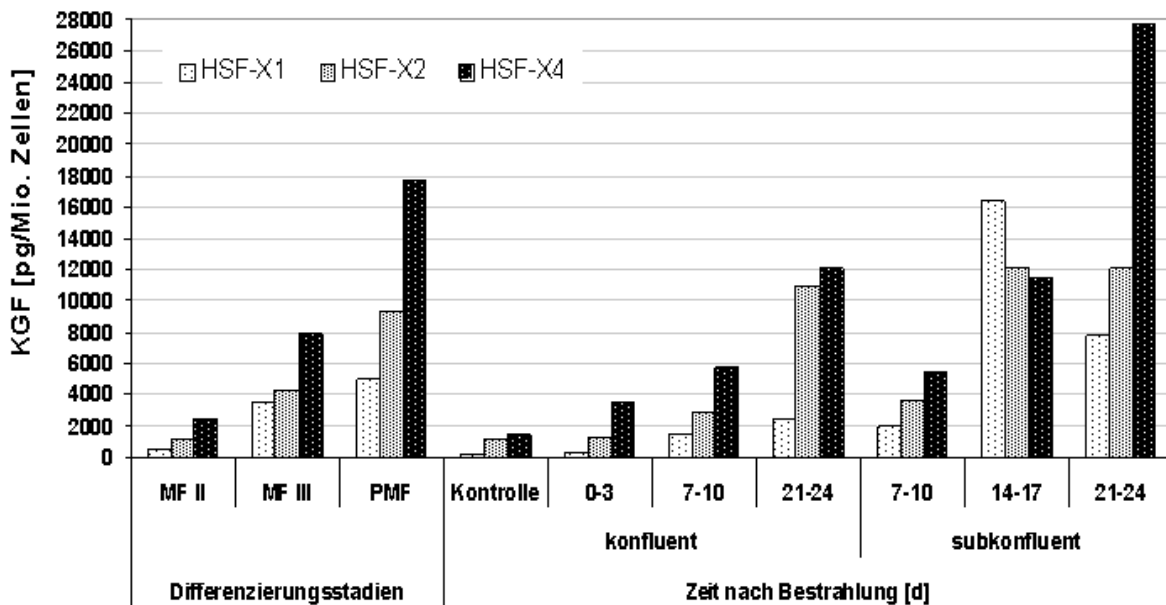
Fibroblasten können nicht nur durch MMC-Behandlung zur Differenzierung gebracht werden, sondern auch durch Bestrahlung. In diesem Experiment sollte überprüft werden, ob die KGF-Expression nach Bestrahlung ebenfalls ansteigt. Zum direkten Vergleich wurden von jedem der drei untersuchten Zellstämme definierte Differenzierungsstadien (MF II, MF III, PMF) im selben ELISA untersucht. Von jedem Zellstamm wurden Zellen einer frühen Passage (CPD: ca. 15) mit 8 Gy Röntgenstrahlung behandelt (RS225 Research System, Gulmay Medical Ltd., Camberley, UK). Die unbe-

strahlte Kontrolle wurde für die Dauer der Bestrahlung aus dem Brutschrank genommen. Da HSF mit dieser geringen CPD sehr proliferativ sind, waren die Kulturgefäße eine Woche nach der Bestrahlung konfluent besiedelt. 7 Tage nach Bestrahlung wurde aus diesem Grund von jedem Zellstamm eine Flasche passagiert und in drei neue Kulturgefäße ausgesät, um neben den konfluenten auch subkonfluente Kulturen zu erhalten. Im gesamten Versuch wurden die Zellen ausschließlich in DMEM + 10% FCS kultiviert. Alle untersuchten Zellen, d.h. sowohl die definierten Differenzierungsstadien als auch die bestrahlten Fibroblasten und die unbestrahlte Kontrolle konditionierten das Analysemedium 3 Tage lang. Zu diesem Zweck wurde an den Tagen 0 (direkt vor Bestrahlung), 7, 14 und 21 ein Mediumwechsel bei allen verbleibenden Zellkulturflaschen durchgeführt. Drei Tage später wurde das Medium der zu analysierenden Zellen schockgefroren und die Zellzahl in den jeweiligen Kulturgefäßen bestimmt. Der ELISA wurde durchgeführt (s.o.) und der KGF-Gehalt der Proben anhand einer linearen Regression der Standardkurve berechnet. Aus Abbildung 3.1.3 geht hervor, dass die KGF-Expression nicht nur von einem zum nächst höheren Differenzierungsstadium ansteigt, sondern auch nach Bestrahlung hochreguliert wird. In der unbestrahlten Kontrolle (CPD ca. 15) ist die KGF-Expression etwas geringer als in den definierten MF II-Zellen (CPD ca. 30). Zwischen unbestrahlter Kontrolle und Analyse direkt nach Bestrahlung (Tage 0 – 3) gibt es nahezu keinen Unterschied in der Expression des KGFs. Eine Woche nach Bestrahlung (Tage 7 – 10) ist die KGF-Expression in konfluenten wie in subkonfluenten Kulturen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle erhöht. Die Expressionsmuster von Zellen aus konfluenter und subkonfluenter Kultur unterscheiden sich hier jedoch nicht voneinander. Überdies exprimieren die Zellen 7 Tage nach Bestrahlung noch deutlich weniger KGF als die entsprechenden MF III-Zellen. Jedoch ist die KGF-Expression an den Tagen 14 – 17 nach Bestrahlung in subkonfluenter Kultur im Durchschnitt höher als die KGF-Expression an den Tagen 21 – 24 in konfluenter Kultur. Bei einem der Zellstämme (HSF-X4) steigt die KGF-Expression an den Tagen 21 – 24 nach Bestrahlung noch einmal extrem an, bei einem weiteren Zellstamm (HSF-X2) bleibt sie im Vergleich zur Vorwoche unverändert und beim dritten Zellstamm (HSF-X1) sinkt die Expression wieder ab, ist jedoch noch immer höher als die Expression der entsprechenden PMF-Zellen oder nach 3 Wochen in konfluenter Kultur. Obwohl für alle untersuchten Zellstämme derselbe Trend in der KGF-Expression nach Bestrahlung

A



B



ermittelt wurde, konnten aufgrund der hohen Unterschiede zwischen den einzelnen Zellstämmen

Abbildung 3.1.3: KGF-Expression von humanen dermalen Fibroblasten nach Bestrahlung (Röntgenstrahlung, 8 Gy). Zum Vergleich wurden im selben Experiment die Differenzierungsstadien MF II, MF III und PMF sowie eine unbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Die KGF-Expression wurde in konfluenten Kulturen sowie in subkonfluenten Kulturen gemessen. In Schaubild A sind die Mittelwerte dreier

Zellstämme (HSF-X1, -X2 und -X4) und die jeweiligen Standardfehler aufgezeigt, in Schaubild B sind die Einzelwerte dargestellt.

keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen des Experiments errechnet werden. Es wird jedoch deutlich, dass eine strahlungsbedingte Differenzierung der Fibroblasten sich frühestens nach einer Woche in einem Anstieg der KGF-Expression zeigt. Offensichtlich benötigen Fibroblasten nicht nur Zeit für ihre Differenzierung, sondern auch eine subkonfluente Kultur, in welcher sie auch morphologisch differenzieren können.

3.1.2 KGF-mRNA-Analyse mittels realtime RT-PCR

Auch auf der mRNA-Ebene sollte die KGF-Expression der verschiedenen Differenzierungsstadien von Fibroblasten/ Fibrozyten untersucht werden, um festzustellen, ob die Unterschiede in der Expression einzig auf vermehrte oder verminderte Translation der KGF-mRNA beruhen, oder ob quantitative Unterschiede im KGF-mRNA-Gehalt selbst festzustellen sind. Die Zellen wurden hierzu entsprechend der Versuchsanordnung für die ELISA-Experimente behandelt (siehe Kapitel 3.1.1). Untersucht wurden Fibroblasten bzw. Fibrozyten 4 Tage nach Serumentzug in den Kulturmedien DMEM + 10 % FCS bzw. SFM:DMEM 2:1 oder Fibroblasten bzw. Fibrozyten ohne Serumentzug 4 Tage nach Mediumwechsel in DMEM + 10 % FCS. Da für die RNA-Isolation ca. 0,6 Mio. Zellen benötigt wurden, konnten keine Kokulturbedingungen untersucht werden, da diese in 6-Well-Platten mit Inserts durchgeführt wurden und diese Wells nicht genügend Platz für 0,6 Mio. MF III- bzw. PMF-Zellen bieten.

Aus Abbildung 3.1.4 wird ersichtlich, dass KGF während der Differenzierung von Fibroblasten zu Fibrozyten auch auf RNA-Ebene hochreguliert wird.

Die mRNA-Levels scheinen jedoch stark vom Zellstamm abhängig zu sein. Während bei den Stämmen HSF-X8 und HSF-X4 lediglich ein Anstieg des KGF-mRNA-Gehalts um 20 – 30 % zwischen den einzelnen Zelltypen nachweisbar war, konnte beim Zellstamm HSF-X1 in verschiedenen Kulturmedien ein Anstieg um 100 – 400 % zwischen MF II und MF III bzw. PMF gemessen werden.

Die während der Differenzierung zunehmende Expression des KGF ist somit auf Proteinebene signifikanter als auf mRNA-Ebene.

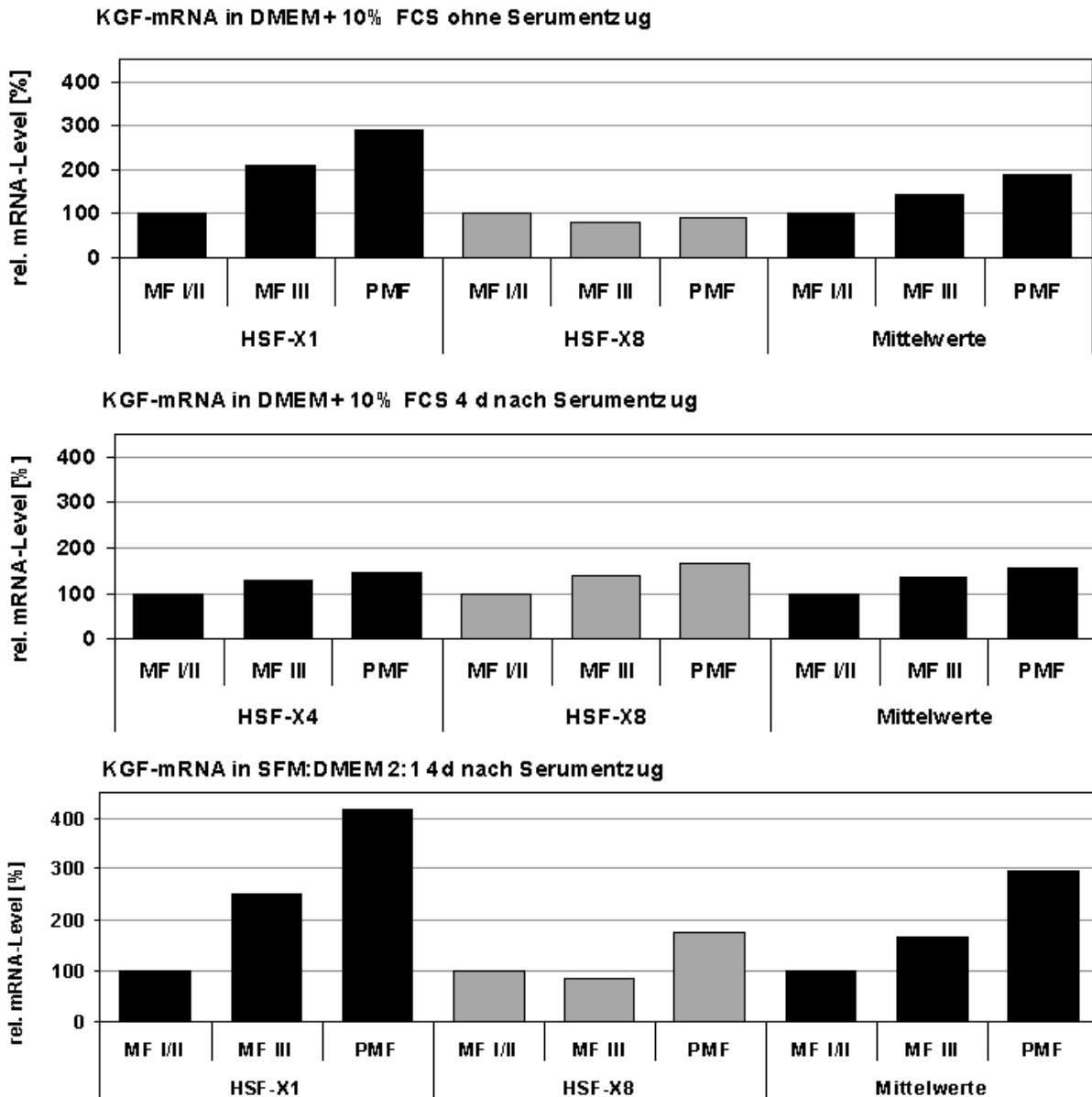


Abbildung 3.1.4 RT-PCR für KGF-mRNA von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien unter verschiedenen Kulturbedingungen. GAPDH diente als Standardgen, die Werte innerhalb eines Zellstammes verstehen sich als Vielfaches des jeweiligen MF II-Wertes.

3.2 Untersuchung des FGF-BP-mRNA-Levels von HaCaT-Zellen

Es sollte untersucht werden, ob die FGF-BP-mRNA von HaCaT-Zellen durch Behandlung der HaCaT-Zellen mit konditionierten Überständen der verschiedenen Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien beeinflusst wird. Da FGF-BP die Wirkung des KGF beschleunigt, indem es das Protein aus der extrazellulären Matrix freisetzt, kann aus dieser Analyse auf die biologische Aktivität des KGF der verschiedenen Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien geschlossen werden.

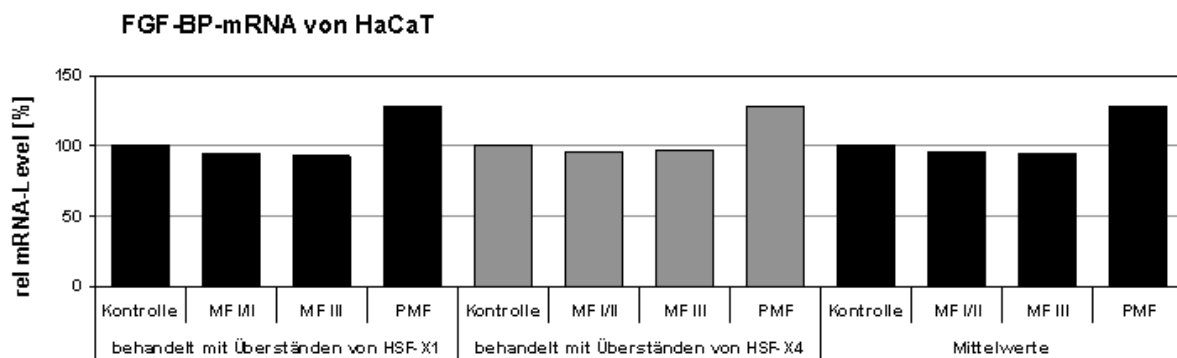


Abbildung 3.2.1: mRNA-Level des FGF-BP von HaCaT-Zellen nach Behandlung mit konditionierten Überständen von Fibroblasten/ Fibrozyten. HaCaT-Zellen wurden mit den Überständen (DMEM + 10 % FCS) von MF II, MF III sowie PMF behandelt, unter deren Einfluss sie die Konfluenz erreichten. Das Experiment wurde mit den Fibroblastenstämmen HSF-X1 (links) sowie HSF-X4 (mittig) durchgeführt. Auf der rechten Seite sind die Mittelwerte beider Experimente dargestellt. Das FGF-BP-mRNA-Level fiel nach Behandlung mit MF II- und MF III-Überständen im Vergleich zur Kontrolle minimal ab, wohingegen es nach Behandlung mit Überständen von PMF-Zellen um ca. 20 % anstieg. GAPDH diente als Standardgen, die Werte innerhalb einer Wiederholung verstehen sich als Vielfaches des jeweiligen Kontrollwertes.

Von den Differenzierungsstadien MF II, MF III, und PMF wurden jeweils 0,8 Mio. Zellen ausgesät. Die Kultur von MF II erfolgte in T25-Zellkulturflaschen, damit sich die Zellen durch Proliferation nicht vervielfältigen konnten. Alle anderen Zelltypen wurden in T75-Flaschen ausgesät. Nach einem Mediumwechsel direkt nach der Adhärenz der Zellen wurde das Zellkulturmedium DMEM + 10% FCS 4 Tage durch die Fibroblasten/ Fibrozyten konditioniert. Als Kontrolle diente Medium, welches während der Konditionierung ohne Fibroblasten im Brutschrank belassen wurde. Die Konditionierungszeit wurde wegen des hohen KGF-Gehalts des Mediums zu diesem Zeitpunkt gewählt. Die immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT wurde 4 Tage mit den Überständen von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien behandelt. Die Stimulationszeit wurde so lange gewählt, damit die HaCaT-Zellen unter dem Ein-

fluss der verschiedenen Medien konfluent werden konnten. Danach wurde die RNA der HaCaT-Zellen isoliert und mittels quantitativer RT-PCR auf FGF-BP-mRNA-Gehalt untersucht. Als Housekeeping-Gen bei der RT-PCR diente GAPDH. Das Experiment wurde zweimal mit verschiedenen Fibroblastenstämmen (HSF-X4 und HSF-X1) wiederholt, die HaCaT-Zellen befanden sich in jedem Versuch in Passage 33.

Wie in Abbildung 3.2.1 dargestellt ist, wird das FGF-BP-mRNA-Level im Vergleich zur Kontrolle nach Behandlung mit Überständen von MF II und MF III minimal herunterreguliert, wohingegen es nach Behandlung mit Überständen von PMF-Zellen um ca. 20 % anstieg. Die Ergebnisse aus beiden Experimenten decken sich sehr genau. Für den Nachweis von FGF-BP auf Protein-Niveau stand kein ELISA zur Verfügung. Für eine Untersuchung des Kulturmediums der HaCaT-Zellen auf FGF-BP mittels Western-Blot wäre eine Kultur in serumfreiem Medium nötig gewesen (siehe unten), welche die Messergebnisse verfälscht hätte. Aus diesem Grund konnte die FGF-BP-Expression von HaCaT-Zellen einzig auf RNA-Niveau untersucht werden.

3.3 Untersuchungen zu Matrix-Metalloproteinasen MMPs

Im folgenden Kapitel sollten Expression und Aktivität von Metalloproteinasen aus den Überständen von Fibroblasten/ Fibrozyten und HaCaT-Zellen untersucht werden. Sollten die MMPs im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden, so wurden die Zellen für eine bestimmte Dauer serumfrei kultiviert, da das Medium sodann eingeeengt werden sollte (Cutt-off 30 kDa). Es wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt und pro Probe jeweils die gleiche Menge an Protein auf die Gele (Zymographie oder SDS-PAGE) aufgetragen.

3.3.1 Expression von MMPs durch Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien

3.3.1.1 Unspezifische Analyse von MMPs mittels Zymographie

Die Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien MF II, MF III und PMF wurden zu jeweils 0,6 Mio. Zellen pro Zellkulturflasche im normalen Kulturmedium in T25/T75-Zellkulturflaschen ausgesät (siehe Kapitel 3.2). Nach der Adhärenz wurde Medium ohne FCS zugegeben und für 3 Tage auf den Zellen belassen. Nach dem Einengen wurden 100 µg Protein pro Spur auf ein Zymographie-Gel aufgetragen.

In Abbildung 3.3.1 sind die Zymogramme zweier Zellstämme (HSF-X4 und HSF-X8) dargestellt. Die MMP-Expression wurde in verschiedenen Kulturmedien untersucht: in DMEM sowie in SFM:DMEM 2:1. Die dominante Bande bei ca. 60 kDa wird durch eine Vielzahl von MMPs verursacht, die hier ihr Molekulargewicht haben. Vergleicht man die Differenzierungsstadien innerhalb eines Kulturmediums, so wird ersichtlich, dass bei höher differenzierten Fibroblasten (MF III und PMF) zunehmend Proteinbanden, vor allem solche mit niedrigerem Molekulargewicht (< 50 kDa) erscheinen.

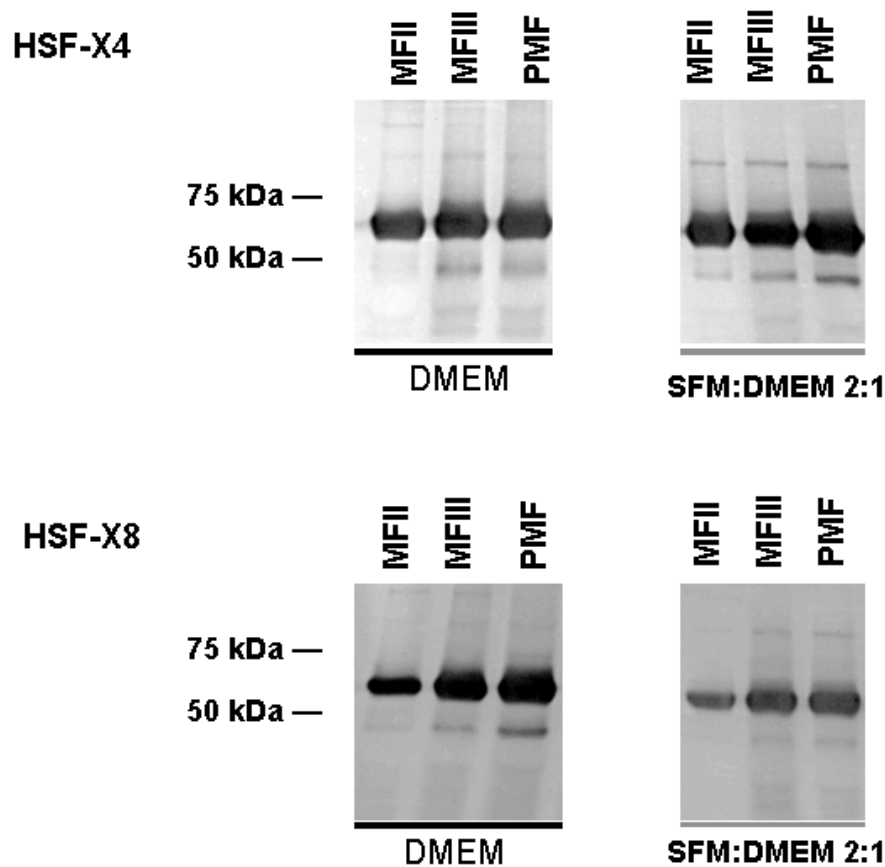


Abbildung 3.3.1: Zymographie der Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien der Zellstämme HSF-X4 und HSF-X8 in verschiedenen Kulturmedien (DMEM und SFM:DMEM 2:1). Mit zunehmender Differenzierung (MF III, PMF) treten vermehrt MMPs, vor allem Banden aktivierter MMPs mit einem Molekulargewicht von < 50 kDa auf. In 2:1-Medium ist die Bande bei ca. 80 kDa deutlicher zu erkennen als in DMEM. Farben invertiert.

Diese Banden werden durch die proteolytische Aktivierung von MMPs höherer Molekulargewichte verursacht. In DMEM kommt eine sehr schwache Bande bei ca. 90 kDa (MF II) mit zunehmender Differenzierung immer mehr in aktiver Form bei ca. 80 kDa vor. In 2:1-Medium tritt allein die 80 kDa-Bande auf, jedoch in verstärkter Form

im Vergleich zu DMEM. Diese Banden könnten durch MMP-9 verursacht werden, welches als einzige Metalloproteinase seine Molekulargewichte in diesem Bereich hat. Die Zymographie besitzt gegenüber dem Western-Blotting eine äußerst hohe Sensitivität. Die Expression von MMP-9 durch Fibroblasten/ Fibrozyten konnte jedoch weder mittels Western-Blot noch mittels RT-PCR bestätigt werden.

3.3.1.2 Analyse von MMP-2, MMP-3 und MMP-10 mittels Western Blot

Um die MMPs, welche von Progenitorfibroblasten bzw. Funktionsfibrozyten exprimiert und aktiviert werden, eindeutig mit spezifischen Antikörpern zu identifizieren, wurden Western-Blots angefertigt. Hierzu wurden die eingengten Überstände der in Kapitel 3.3.1.1 beschriebenen Differenzierungsstadien der Zellstämme HSF-X4 und HSF-X8 auf SDS-Gele aufgetragen (100 µg Protein pro Spur). Pro Zellstamm wurde ein Blot angefertigt, welcher mehrmals mit verschiedenen Primär- und Sekundärantikörpern behandelt wurde (siehe Abbildung 3.3.2). Nach jeder Detektion wurden die anhaftenden Antikörper durch Strippen der Membran entfernt. Bei MMPs mit ähnlichen Molekulargewichten wurde darauf geachtet, dass überdies unterschiedliche Sekundärantikörper verwendet werden konnten. Da in Zellkulturüberständen kein Protein enthalten ist, welches als Ladekontrolle dienen könnte, konnte durch Betrachten der unterschiedlichen MMP-Signale davon ausgegangen werden, dass auf alle Spuren gleich viel Protein aufgetragen worden war und dass die Effekte nicht auf falsches Beladen des Gels zurückzuführen sind, da in diesem Fall immer in der gleichen Spur viel oder wenig Protein detektiert worden wäre.

In beiden Zellkulturmedien und von allen Fibroblastenstämmen wird MMP-2 während der Differenzierung von MF II über MF III zu PMF hochreguliert. Während MMP-2 in DMEM mit Ausnahme des Zellstammes HSF-X2 nur in aktiver Form auftritt, sind in 2:1-Medium sowohl die Banden der aktiven als auch der latenten Form des MMP-2 zu erkennen.

MMP-3 ist in beiden Medien in aktiver und latenter Form detektierbar und scheint während der Differenzierung im Gegensatz zu MMP-2 herunterreguliert zu werden. PMF-Zellen von HSF-X2 und HSF-X4 exprimieren in beiden Kulturmedien den geringsten Anteil an MMP-3. Die PMF-Zellen von HSF-X8 exprimieren in beiden Medien weniger MMP-3 als die jeweiligen MF II-Zellen. Die Bande der aktiven Form von MMP-3 ist immer stärker als die der latenten Form. Es scheint, als würde die Expression von MMP-3 während der Differenzierung von MF II zu MF III hin leicht ansteigen

bzw. unverändert bleiben, jedoch nach der terminalen Differenzierung zu postmitotischen Fibrozyten wieder unter das Niveau von MF II absinken.

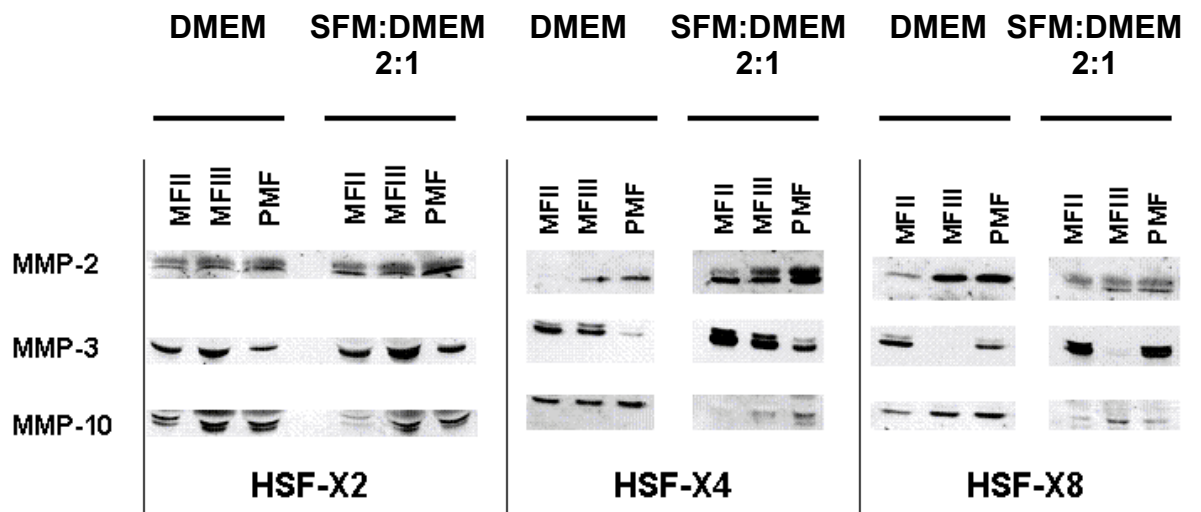


Abbildung 3.3.2 Western-Blots der Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien der Zellstämme HSF-X2, HSF-X4 und HSF-X8 in verschiedenen Kulturmedien (DMEM und SFM:DMEM 2:1). Sofern eine Doppelbande detektiert wurde, stellt die Bande mit höherem Molekulargewicht die latente Form der betreffenden Protease dar, die mit dem geringeren Molekulargewicht repräsentiert die aktive Form. Es wurden 100 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Detektion aller MMPs auf jeweils demselben Blot.

MMP-10 wird von allen drei Zellstämmen in beiden Kulturmedien während der Differenzierung leicht hochreguliert. Hauptsächlich sind die Banden des latenten MMP-10 detektierbar.

3.3.1.3 MMP-2-mRNA-Analyse mittels realtime RT-PCR

Wie bereits erwähnt, konnte die MMP-9-Expression von Fibroblasten/ Fibrozyten nicht mittels RT-PCR nachgewiesen werden, obwohl spezifische Primer vorhanden waren. Es war nicht möglich, zuverlässige Primer für die Lightcycler-RT-PCR von MMP-3 und MMP-10 zu etablieren, sodass auf die Analyse dieser mRNA verzichtet werden musste. Aus diesem Grund konnte einzig MMP-2 auf mRNA-Niveau untersucht werden.

Um Fibroblasten/ Fibrozyten in den Kulturmedien DMEM + 10% FCS und SFM:DMEM 2:1 vergleichen zu können, wurde zuvor ein dreitägiger Serumentzug durchgeführt. Nach dem Serumentzug wurden die Zellen 4 Tage in den jeweiligen Medien kultiviert und anschließend die RNA isoliert, zu cDNA umgeschrieben und mit spezi-

fischen Primern auf den Gehalt an MMP-2-mRNA untersucht. Zellen ohne Serumentzug wurden 4 Tage nach dem letzten Mediumwechsel untersucht. Als Standardgen für die RT-PCR diente GAPDH.

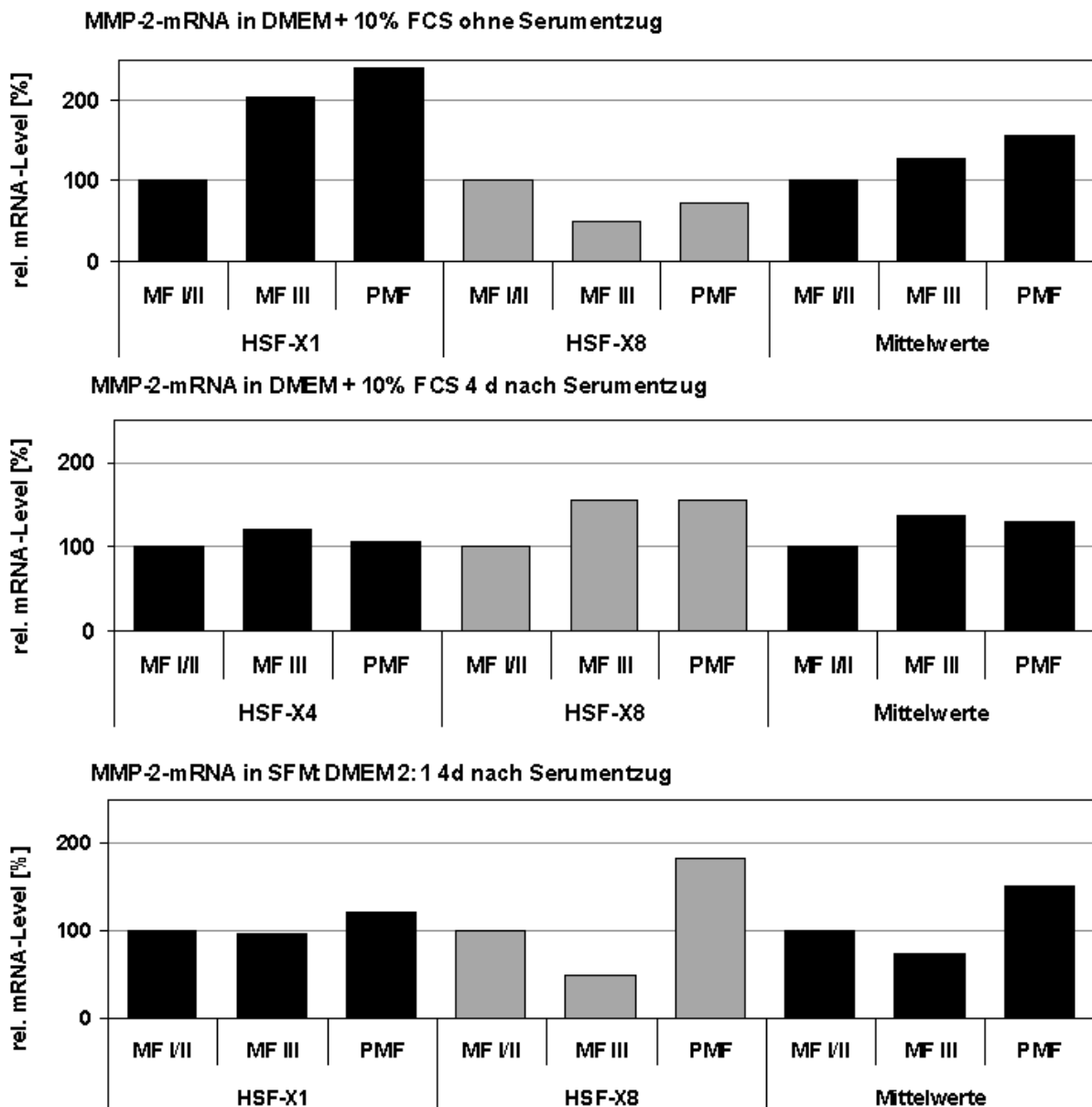


Abbildung 3.3.3: Analyse der MMP-2 mRNA von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien mittels quantitativer realtime RT-PCR in verschiedenen Kulturmedien. GAPDH diente als Standardgen, die Werte innerhalb eines Zellstammes verstehen sich als Vielfaches des jeweiligen MF II-Wertes.

Wie aus Abbildung 3.3.3 hervorgeht, steigt die Expression von MMP-2 tendenziell während der Differenzierung von MF II-Zellen zu PMF-Zellen. Allerdings kommt es zu beträchtlichen Schwankungen zwischen den einzelnen Zellstämmen. Besonders

deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Differenzierungsstadien konnten erneut beim Zellstamm HSF-X1 detektiert werden. Wie im Falle des KGF ist die erhöhte Expression von MMP-2 in MF II- und PMF-Zellen deutlicher auf Proteinebene nachweisbar.

3.3.2 Untersuchung der MMP-Expression von HaCaT-Zellen

3.3.2.1 Unspezifische Analyse von MMPs mittels Zymographie

Um ein Gesamtbild der Metalloproteinase-Aktivität von HaCaT-Zellen zu erhalten, wurden Zymogramme angefertigt. Für diesen Versuch wurden HaCaT-Zellen in verschiedenen Zellkulturmedien und nach Behandlung mit Fibroblasten-/ Fibrozyten-konditionierten Überständen untersucht.

Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien desselben Zellstammes wurden in gleicher Anzahl ausgesät (siehe Kapitel 3.3.1.1) und konditionierten die Testmedien DMEM + 10% bzw. SFM:DMEM 2:1 für 2 – 4 Tage. Anschließend wurde das Kulturmedium auf subkonfluente HaCaT-Zellen gegeben, wo es weitere 3 – 4 Tage verblieb. Das Medium wurde abgenommen und serumfreies Medium derselben Art auf die HaCaT-Zellen gegeben. Dieses Medium wurde nun für die Zymographie konditioniert (1 – 3 Tage). Da nach einem Tag ein ungenügender Proteingehalt in den eingeeengten Überständen festgestellt wurde, wurde die Konditionierung für die Zymographie in späteren Experimenten verlängert. Als Kontrolle diente Medium, welches während der Konditionierungszeiten ohne Zellen im Brutschrank inkubiert wurde.

In Abbildung 3.3.4 kann beobachtet werden, dass MMPs mit den Molekulargewichten von ca. 92 und 82 (wahrscheinlich MMP-9) nach Behandlung mit Überständen von MF II-Zellen im Gegensatz zur Kontrolle nicht mehr ins Zellkulturmedium abgegeben werden. Verglichen mit der mit MF II-behandelten Probe wird aber in der MF III-behandelten und noch deutlicher in der PMF-behandelten Probe die Bande mit dem Molekulargewicht von ca. 82 kDa wieder verstärkt exprimiert. Ein ähnlicher Effekt kann bei der mRNA-Analyse von HaCaT-Zellen unter denselben Bedingungen beobachtet werden (siehe Kapitel 3.3.2.2). Überdies kann man erkennen, dass nach Stimulation mit MF III- und PMF-konditionierten Überständen eine zusätzliche Bande

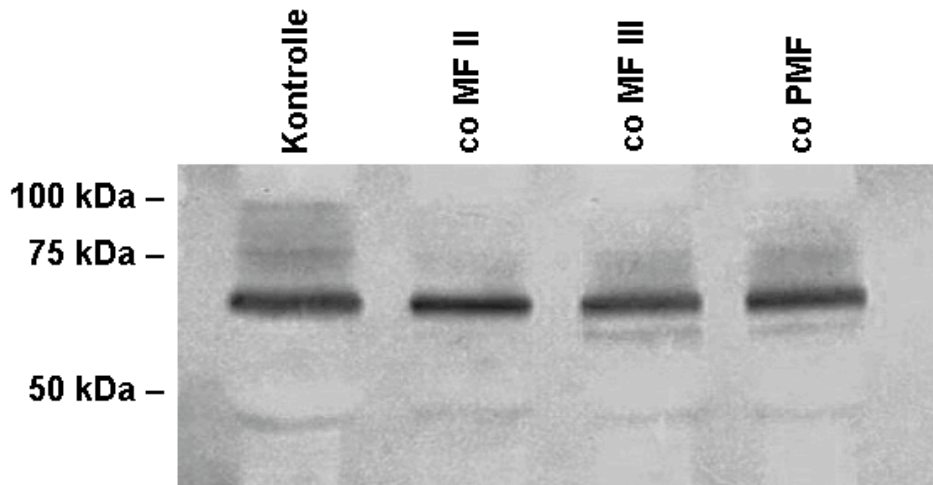


Abbildung 3.3.4: Zymographie von HaCaT-Überständen. Die HaCaT-Zellen wurden zuvor mit Überständen von Fibroblasten/ Fibrozyten (HSF-X3) behandelt. Die Überstände (DMEM + 10% FCS) wurden von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien 2 Tage konditioniert, dann wurden die Überstände für 3 Tage auf HaCaT-Zellen gegeben. Die Konditionierung von DMEM ohne FCS für die Zymographie dauerte 1 Tag. 100 µg Protein pro Spur aufgetragen. Farben invertiert.

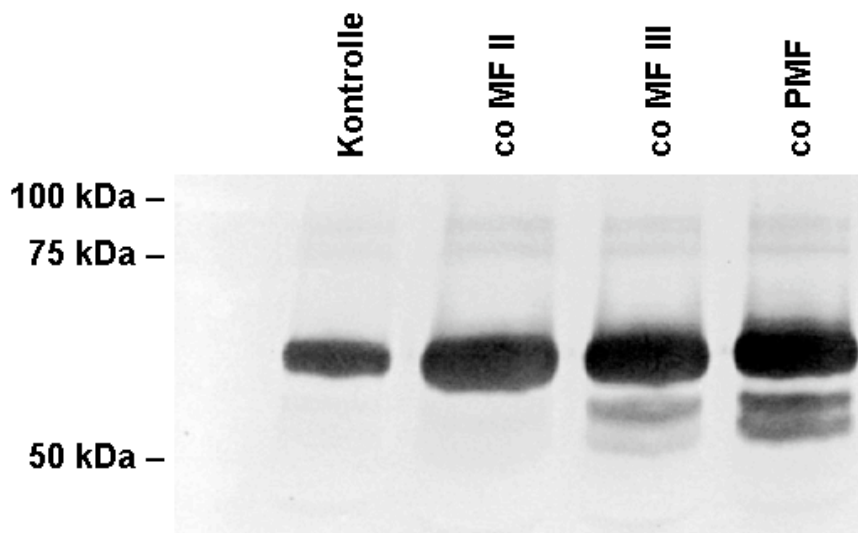


Abbildung 3.3.5 Zymographie von HaCaT-Überständen. Die HaCaT-Zellen wurden zuvor mit Überständen von Fibroblasten/ Fibrozyten (HSF-X1) behandelt. Die Überstände (DMEM + 10% FCS) wurden von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien 4 Tage konditioniert, dann wurden die Überstände für 4 Tage auf HaCaT-Zellen gegeben. Die Konditionierung von DMEM ohne FCS für die Zymographie dauerte 3 Tage. 100 µg Protein pro Spur aufgetragen. Farben invertiert.

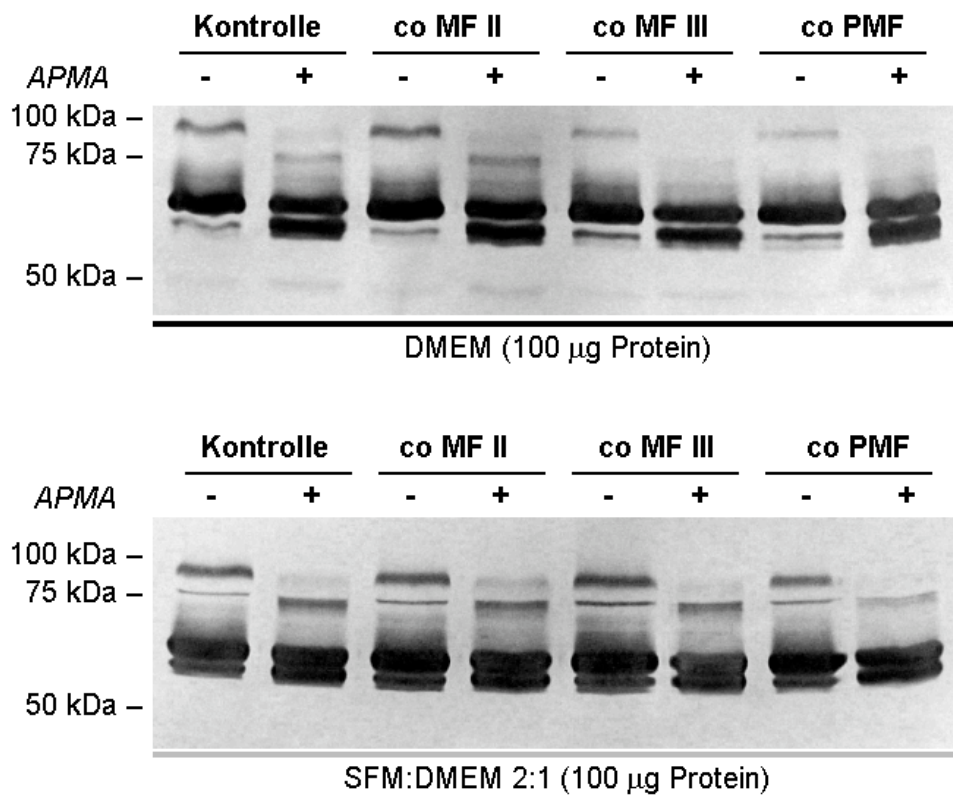


Abbildung 3.3.6 Zymographie von HaCaT-Zellen, behandelt mit den Überständen von Fibroblasten/ Fibrozyten (HSF-X2). Die Überstände (DMEM + 10% FCS bzw. SFM:DMEM 2:1) wurden von HSF-X2 4 Tage konditioniert, dann wurden die Überstände für 3 Tage auf HaCaT gegeben. Die Konditionierung von DMEM ohne FCS für die Zymographie dauerte 3 Tage. 100 µg Protein pro Spur aufgetragen. Farben invertiert.

mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa unterhalb der prominentesten Bande auftritt. Diese ist wahrscheinlich auf die Aktivierung bestimmter MMPs und den damit verbundenen Bandenshift zurückzuführen. Diese Aktivierung ist bei den vielen der durchgeführten Versuche zu beobachten, unabhängig von der Zeit der Konditionierung des Mediums durch die einzelnen Zelltypen. In Abbildung 3.3.5 kann die Aktivierung sehr deutlich beobachtet werden, nicht aber der oben beschriebene Effekt bezüglich MMP-9. Dies kann auf die unterschiedlichen Zeitfenster in beiden Versuchen zurückzuführen sein oder darauf, dass verschiedene Fibroblasten-Zellstämme verwendet wurden.

Um die MMPs durch ihren spezifischen Bandenshift identifizieren zu können, wurden die Proben auf den in Abbildung 3.3.6 dargestellten Gelen zuvor teilweise mit APMA behandelt, wodurch die MMPs aktiviert wurden. Interessanter Weise ist in diesem

Versuch eine Abnahme des MMP-9_{latent}-Gehalts im Medium zu beobachten, wenn die HaCaT-Zellen durch MF III und PMF stimuliert worden waren. Die oben beschriebene MMP-Aktivierung tritt ebenfalls in denselben Spuren auf. Außer in den APMA-behandelten Proben sind keine Banden aktiven MMP-9s (ca. 82 kDa) zu sehen. Im Vergleich zu DMEM sind in SFM:DMEM 2:1 MMP-9 sowie MMPs mit Molekulargewichten von ca. 60 kDa schon in der Kontrolle aktiviert. Dies könnte durch den im Medium enthaltenen EGF verursacht werden. Es soll darauf hingewiesen werden, dass HaCaT-Zellen, anders als primäre Keratinozyten, diesen Faktor nicht für optimales Wachstum benötigen und deshalb auch nicht in speziellem SFM kultiviert werden müssen.

3.3.2.2 Analyse der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 von HaCaT-Zellen mittels Western Blot und RT-PCR

MMPs können anhand von Zymogrammen nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Deshalb wurden sowohl Western-Blots als auch RT-PCRs für MMP-2 und MMP-9 durchgeführt. Beide Gelatinasen sind essentiell für die Wundheilung und werden von Keratinozyten exprimiert. Es muss beachtet werden, dass die Immundetektion von Proteinen nicht so sensitiv ist, wie die Zymographie.

MMP-9 ist auf beiden Blots aus Abbildung 3.3.7 und Abbildung 3.3.8 schwer zu detektieren. Die stärkste MMP-9-Expression erkennt man nach Behandlung von HaCaT-Zellen mit PMF-Überständen. Auf dem Blot in Abbildung 3.3.7 ist das zweitstärkste Signal in der Kontrollspur zu detektieren, während das Signal der MF III-behandelten Probe schwach und das in der MF II-behandelten Probe am schwächsten ist. Während MMP-9 in DMEM vorwiegend in latenter Form vorkommt, ist in SFM:DMEM 2:1 vorwiegend die aktive Form zu erkennen. Die aktive Form von MMP-2 wird mit zunehmendem Differenzierungsgrad der verwendeten Fibroblasten herunterreguliert. Ausnahme hiervon ist die Kontrollspur in Abbildung 3.3.8. In dieser ist jedoch der Proteingehalt allgemein etwas geringer als in den anderen Spuren, wie bei der Ponceau S-Färbung festgestellt werden konnte. Während die latente Form des MMP-2 in Abbildung 3.3.7 mit zunehmendem Differenzierungsgrad der Fibroblasten steigt und das gesamte Protein in SFM:DMEM 2:1 nicht nachzuweisen ist, wird die latente Form des MMP-2 in Abbildung 3.3.8 mit steigendem Differenzierungsgrad der Fibroblasten/ Fibrozyten herunterreguliert.

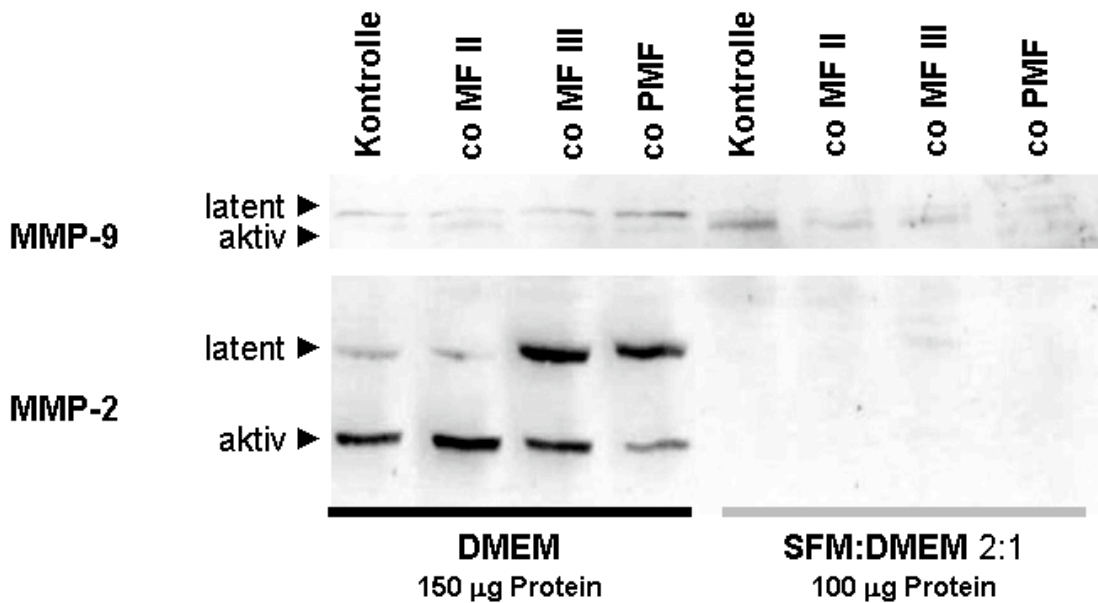


Abbildung 3.3.7 Western-Blots von HaCaT-Zellen, behandelt mit den Überständen von Fibroblasten/ Fibrozyten (HSF-X2). Die Überstände (DMEM + 10% FCS bzw. SFM:DMEM 2:1) wurden von HSF-X2 4 Tage konditioniert, dann wurden die Überstände für 3 Tage auf HaCaT gegeben. Die Konditionierung von DMEM ohne FCS für den Western-Blot dauerte 3 Tage. Selbe Proben wie in Abbildung 3.3.6. 100 µg Protein pro Spur aufgetragen. Detektion beider MMPs auf demselben Blot.

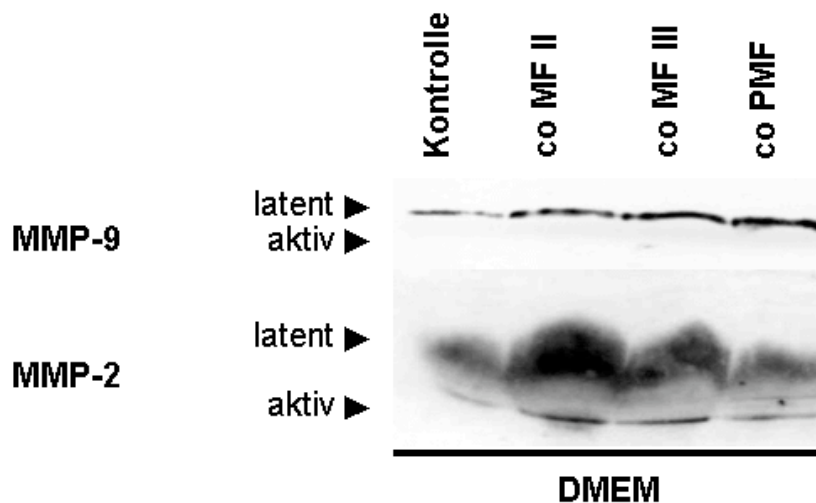


Abbildung 3.3.8 Western-Blot von HaCaT-Überständen behandelt mit den Überständen von Fibroblasten/ Fibrozyten (HSF-X1). Die Überstände (DMEM + 10% FCS) wurden von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien 4 Tage konditioniert, dann wurden die Überstände für 4 Tage auf HaCaT-Zellen gegeben. Die Konditionierung von DMEM ohne FCS für den Western-Blot dauerte 3 Tage. Selbe Proben wie in Abbildung 3.3.5. 100 µg Protein pro Spur aufgetragen. Detektion beider MMPs auf demselben Blot.

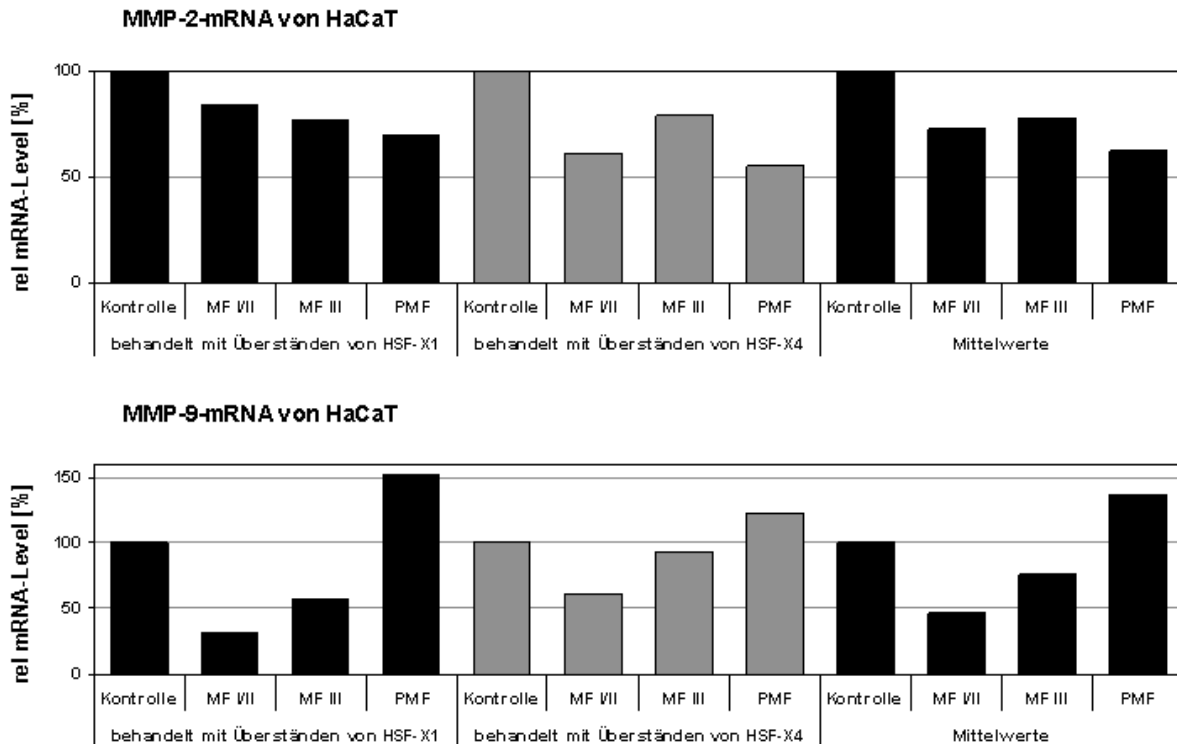


Abbildung 3.3.9: realtime RT-PCR von HaCaT-Zellen. Die HaCaT-Zellen wurden zuvor mit Überständen von Fibroblasten/ Fibrozyten (HSF-X1 und HSF-X4) behandelt. Die Überstände (DMEM + 10% FCS) wurden von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien 4 Tage konditioniert, dann wurden die Überstände für 4 Tage auf HaCaT-Zellen gegeben. GAPDH diente als Standardgen, die Werte innerhalb einer Wiederholung verstehen sich als Vielfaches des jeweiligen Kontrollwertes.

Mittels RT-PCR konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden: in Abbildung 3.3.9 wird gezeigt, dass das MMP-9-mRNA-Level von HaCaT-Zellen nach Behandlung mit MF II-Überständen herunterreguliert wird, nach Behandlung mit MF III etwas höher, jedoch unterhalb des Kontrollwertes liegt und erst nach Behandlung mit PMF-Überständen den Wert der Kontrolle übersteigt. Dies deckt sich mit den in Abbildung 3.3.7 und Abbildung 3.3.8 dargestellten Western-Blots sowie mit der in Abbildung 3.3.4 dargestellten Zymographie. MMP-2 wird im Gegensatz zur Kontrolle durch Behandlung mit Überständen aller Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien herunterreguliert, am stärksten jedoch von PMF-Überständen. Dies ist auch aus dem Western-Blot in Abbildung 3.3.8 zu entnehmen. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die HaCaT-Zellen für die RNA-Isolation in DMEM + 10% FCS untersucht wurden, wohingegen die Western-Blot-Proben aus DMEM ohne FCS gewonnen werden mussten, in welchem die zu untersuchenden Zellen 1 – 3 Tage kultiviert wurden.

3.4 Expression von Proteinen der Extrazellulären Matrix

Neben der Expression von Wundheilungsfaktoren wie KGF und Matrix-Metalloproteinasen ist für die Wundheilung und die Bildung einer neuen Basalmembran die Expression bestimmter Proteine der Extrazellulären Matrix unerlässlich. Laminin-5 wird von Keratinozyten exprimiert, konnte aber einzig auf mRNA-Niveau zuverlässig nachgewiesen werden. Kollagen IV wird von Fibroblasten sowie Keratinozyten exprimiert und ist wie Laminin-5 ein wichtiger Bestandteil der Basallamina. Aufgrund unspezifischer Reaktionen des Sekundärantikörpers bei der Immunzytologie (siehe Abbildung 3.4.1) sowie ausbleibender Signale beim Western-Blot konnte Kollagen IV jedoch nur auf mRNA-Niveau nachgewiesen werden. Einzig die Expression von Laminin-1/Laminin-2 bzw. der Laminin-gamma-1-Kette konnte auf mRNA- und Protein-Niveau gezeigt werden.

3.4.1 Kollagen IV-Expression von Fibroblasten/ Fibrozyten

Kollagen IV ist ein wichtiger Bestandteil der Basallamina und ist demzufolge von großer Bedeutung für die Wundheilung. Es wird von Keratinozyten und Fibroblasten exprimiert. Neben der in Abbildung 3.1.1 dargestellten RT-PCR sollte Kollagen IV auch mittels Immunzytologie untersucht werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass Kollagen IV von keinem der Fibroblastensubtypen in einem solchen Maße exprimiert wird, dass das Signal sich deutlich vom Level der Negativkontrolle abhebt (siehe Abbildung 3.4.1). Dies ist möglicher Weise darauf zurückzuführen, dass Kollagen IV normaler Weise in der Basallamina vorliegt, welche in einer Fibroblasten-Monokultur nicht ausgebildet wird.

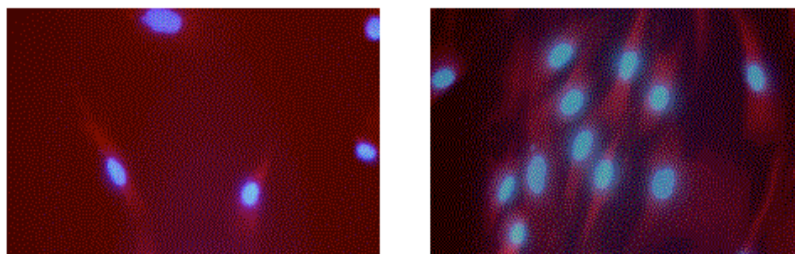


Abbildung 3.4.1: Negativkontrolle der Immunzytologie gegen Kollagen IV: die Proben wurden ohne den Primärantikörper gegen Kollagen IV inkubiert, die Färbung entsteht durch unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers (Goat-Anti-Rabbit). Kernfärbung wurde mit Dapi durchgeführt.

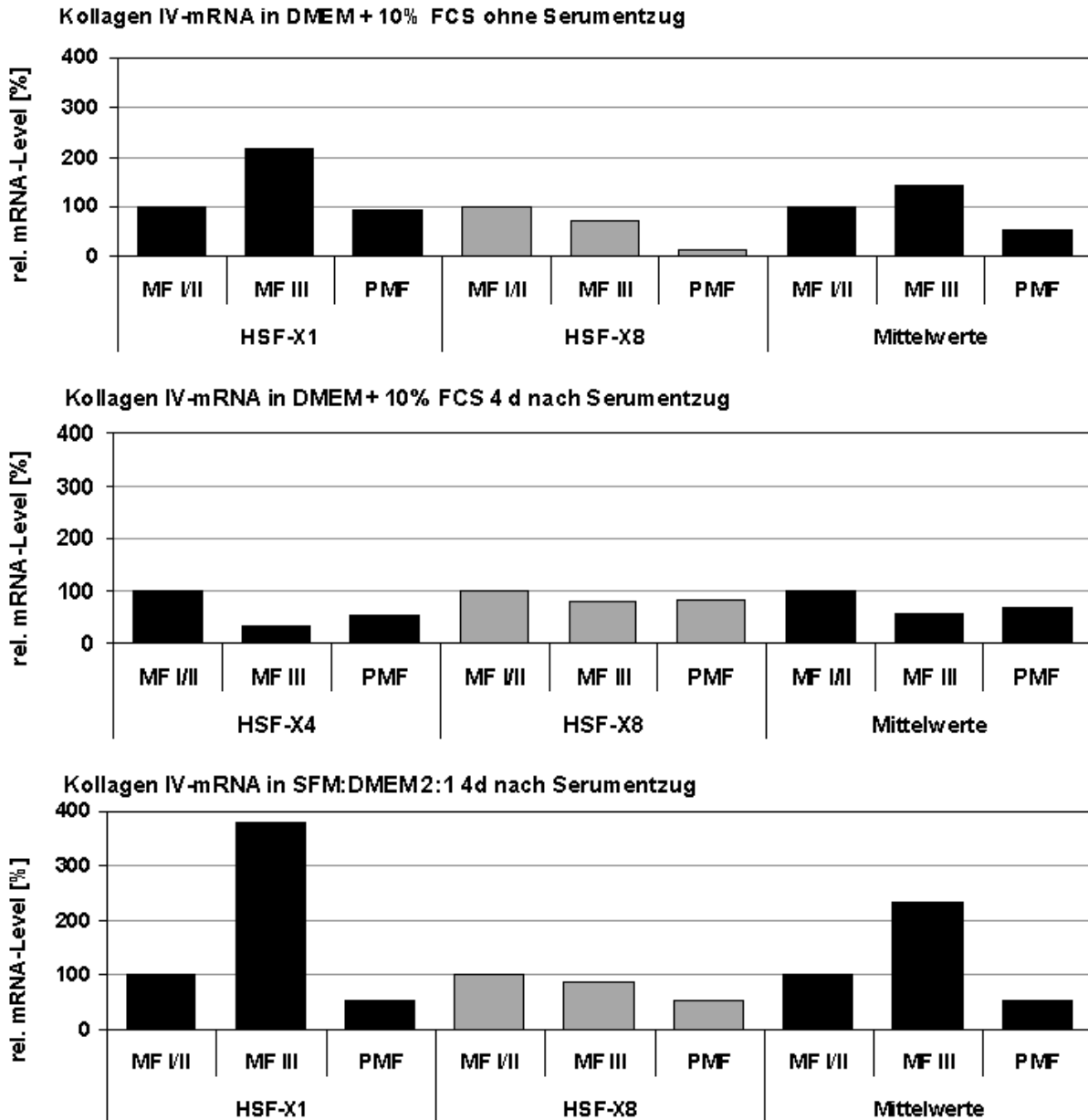


Abbildung 3.4.2: realtime RT-PCR der Kollagen IV-Expression von Fibroblasten-/Fibrozyten-Differenzierungsstadien unter verschiedenen Mediumbedingungen. GAPDH diente als Standardgen, die Werte innerhalb eines Zellstammes verstehen sich als Vielfaches des jeweiligen MF II-Wertes.

Die Ergebnisse der RT-PCR in Abbildung 3.4.2 deuten darauf hin, dass im Gegensatz zu vielen anderen untersuchten Genen Kollagen IV offenbar von den PMF-Zellen am geringsten exprimiert wird. Die MF II-Zellen vom Zellstamm HSF-X8 (in DMEM ohne Serumentzug und in SFM:DMEM 2:1) weisen bei allen untersuchten mRNAs erhöhte Werte auf (siehe Abbildung 3.1.4: KGF, Abbildung 3.3.3: MMP-2 sowie nicht gezeigte Ergebnisse), sodass möglicher Weise dadurch der Trend (dar-

gestellt durch die Mittelwerte von jeweils 2 Zellstämmen) verfälscht wird. Das Verhältnis zwischen MF III und PMF dieses Zellstammes stimmt jedoch mit dem der anderen Zellstämme überein.

In DMEM + 10% FCS ohne Serumentzug sowie in SFM:DMEM 2:1 nach Serumentzug scheint die höchste Kollagen IV-Expression bei den MF III-Zellen zu liegen, zumindest aber ist die Expression dieses Basalmembranproteins bei MF III-Zellen höher als bei PMF-Zellen. In DMEM + 10% FCS nach Serumentzug ergeben sich erstaunlicher Weise komplett verschiedene Werte. Hier wurde allerdings der Zellstamm HSF-X4 anstelle von HSF-X1 untersucht. Erneut wird deutlich, dass sich die Zellstämme stark in ihrem mRNA-Gehalt für die einzelnen Differenzierungstypen unterscheiden. Sehr deutliche Ergebnisse liefert wie schon im Falle des KGF und des MMP-2 der Zellstamm HSF-X1, welcher aus der Biopsie eines achtjährigen Kindes gewonnen wurde.

3.4.2 Laminin-Expression von Fibroblasten/ Fibrozyten

Laminine sind Bestandteil der ECM und dienen der Adhäsion der Zellen an die ECM sowie der Migration. Repräsentativ für das heterotrimere Protein wurde die gamma-1-Kette mittels realtime PCR untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass die Expression von MF III zu PMF in beiden Zellstämmen leicht ansteigt (siehe Abbildung 3.4.3). Da der MF II-Wert des Zellstammes HSF-X8 bei allen anderen untersuchten mRNAs (KGF, MMP-2, Kollagen IV, siehe Abbildung 3.1.4, Abbildung 3.3.3 und Abbildung 3.4.2) wie bereits erwähnt überdurchschnittlich hoch ist, handelt es sich hierbei möglicher Weise um einen nicht repräsentativen Wert. Dies könnte darauf hinweisen, dass Kollagen IV im Allgemeinen auch während der Differenzierung der Fibroblasten von MF II zu MF III hochreguliert wird, wie dies im Zellstamm HSF-X1 zu beobachten ist. Die Unterschiede auf mRNA-Level sind jedoch äußerst gering.

Bei der Untersuchung der Laminin-Expression mittels Immunzytologie (siehe Abbildung 3.4.5) konnte festgestellt werden, dass die Differenzierungsstadien MF II und MF III eine intensive Färbung aufwiesen, wohingegen PMF-Zellen nur schwach gefärbt wurden. Die schwache Färbung stammte jedoch nicht von unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers, da der verwendete Antikörper in der Negativkontrolle keinerlei unspezifische Signale ergab (siehe Abbildung 3.4.4). Es soll darauf hingewiesen werden, dass der für die Immunzytologie verwendete Antikörper nicht wie die bei der RT-PCR verwendeten Primer spezifisch für Laminin gamma-1 ist,

sondern dass er die Laminine 1 und 2 erkennt, welche beide die γ 1- und die β 1-Kette beinhalten, sich überdies jedoch aus α 1- bzw. α 2-Kette zusammensetzen. Der Nachweis auf Protein-Niveau ist im Falle von Proteinen, welche sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzen, aussagekräftiger als der Nachweis einer einzelnen dieser Untereinheiten auf mRNA-Niveau.

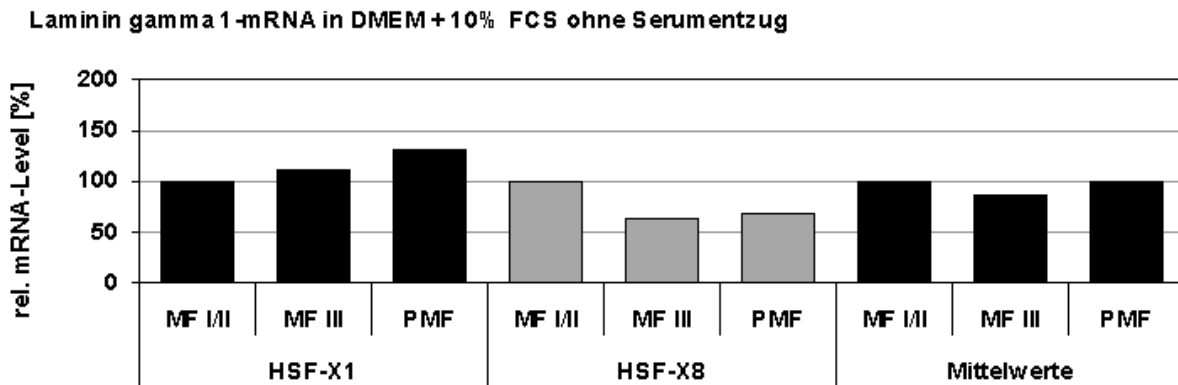


Abbildung 3.4.3: realtime RT-PCR der gamma1-Kette des Laminin von Fibroblasten/ Fibrozyten. GAPDH diente als Standardgen, die Werte innerhalb eines Zellstammes verstehen sich als Vielfaches des jeweiligen MF II-Wertes.



Abbildung 3.4.4: Negativkontrolle der Immuncytologie gegen Laminin. Die Aufnahmen der Dapi-Kernfärbungen wurden mit denen der Cy3-gelabelten Sekundärantikörper (Goat-anti-Mouse) übereinander gelegt.

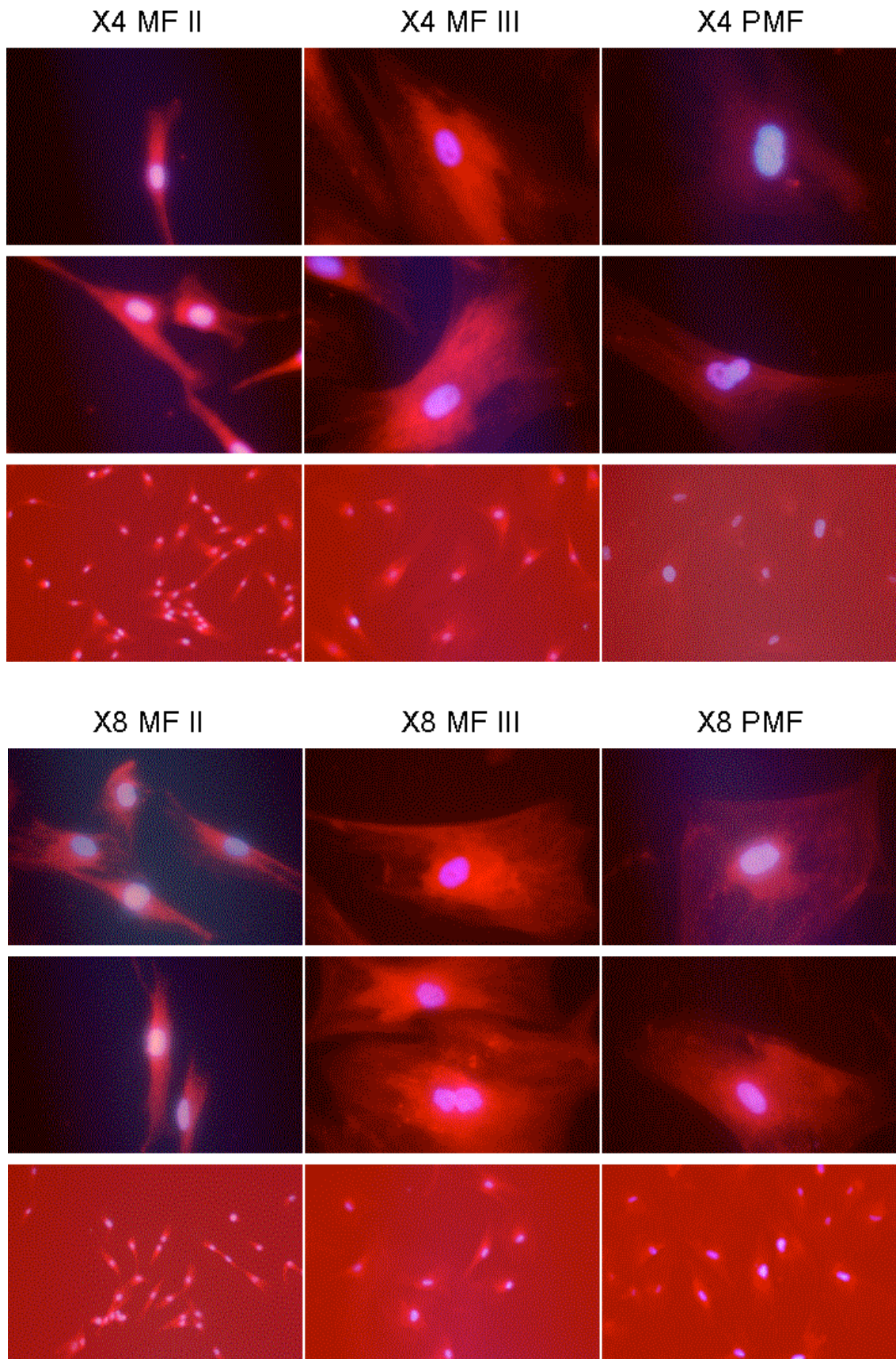


Abbildung 3.4.5: Immunocytochemie von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien (HSF-X4 oben, HSF-X8 unten) gegen Laminin. Kernfärbung mit Dapi, Laminin wurde mit Cy3-gelabeltem Sekundärantikörper detektiert.

3.4.3 Expression von ECM-Proteinen durch HaCaT-Zellen

Um die Synthese von Basalmembranproteinen auch auf Seite der HaCaT-Zellen zu untersuchen, wurde die mRNA von HaCaT-Zellen analysiert, nachdem die Zellen mit den konditionierten Überständen von Differenzierungsstadien der Fibroblasten-Zellstämme HSF-X1 und HSF-X4 behandelt worden waren (Probengewinnung siehe Kapitel 3.2). Beide Proteine konnten bei HaCaT-Zellen nicht per Western-Blot oder durch immunzytologische Färbungen nachgewiesen werden, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass diese Proteine erst in einer intakten Basallamina nachgewiesen können, nicht jedoch in einer Monokultur von immortalisierten Keratinozyten.

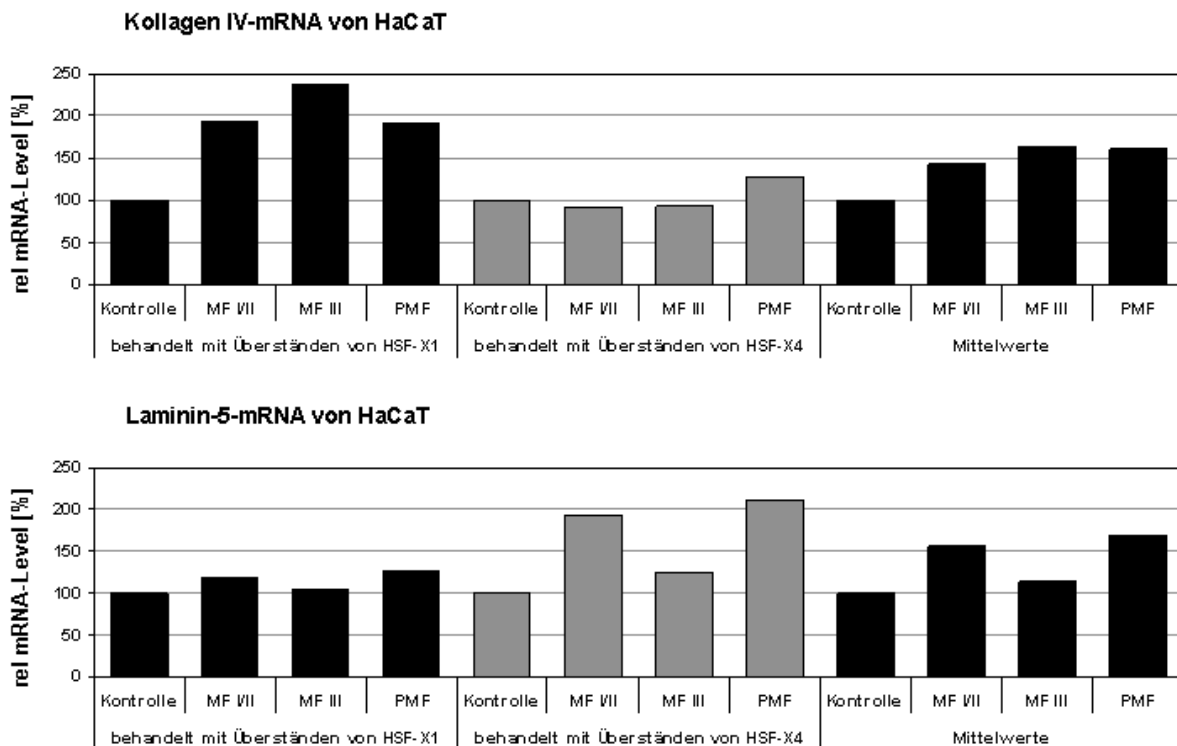


Abbildung 3.4.6: realtime RT-PCR der Kollagen IV- und Laminin-5-Expression von HaCaT-Zellen nach der Behandlung mit konditionierten Überständen von Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien der Zellstämme HSF-X1 und HSF-X4. GAPDH diente als Standardgen, die Werte innerhalb eines Zellstammes verstehen sich als Vielfaches des jeweiligen Kontrollwertes.

Wie aus Abbildung 3.4.6 hervorgeht, steigt die Kollagen IV-Expression von HaCaT-Zellen nach der Behandlung mit Fibroblasten-/ Fibrozyten-konditionierten Überständen tendenziell mit zunehmendem Differenzierungsstadium der Fibroblasten/ Fibrozyten an. Bei beiden Einzelversuchen wird jedoch eine erhöhte Expression von Kol-

lagen IV nach der Behandlung von HaCaT-Zellen mit PMF-konditionierten Überständen im Vergleich zur Kontrolle deutlich.

Die Laminin-5-Expression zeigt bei beiden Einzelexperimenten sehr ähnliche Ergebnisse, jedoch sind die Effekte nach der Behandlung mit HSF-X4-konditionierten Überständen wesentlich deutlicher. Das niedrigste Laminin-5-mRNA-Level ist in der Kontrolle zu finden. Bemerkenswerter Weise wird der zweitniedrigste Wert nach der Behandlung mit MF III-konditionierten Überständen erzielt. Die höchste Laminin-5-Expression kann nach der Behandlung von HaCaT-Zellen mit PMF-konditionierten Überständen beobachtet werden. Im Falle des Zellstammes HSF-X4 kann hier sogar eine Verdoppelung der Expression erzielt werden. Die Werte nach Behandlung mit MF II-konditionierten Überständen sind jedoch ebenfalls vergleichsweise hoch.

Es wird ersichtlich, dass Fibroblasten und Fibrozyten Einfluss auf die Expression Extrazellulärer Matrixproteine von HaCaT nehmen. Die Bedeutung der einzelnen Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien sollte jedoch auf Proteinebene ermittelt werden.

4 Diskussion

4.1 Zellsystem

In dieser Dissertation wurde der Einfluss von Fibroblasten- und Fibrozyten-Differenzierungsstadien auf die immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT untersucht.

Die Fibroblasten/ Fibrozyten wurden in den hier vorgestellten Versuchen in drei Differenzierungsstadien unterteilt. Potentiell mitotische Progenitorfibroblasten des Stadiums MF II mit einer CPD von ca. 30 waren durch Klonkulturen hergestellt worden. MF III-Zellen mit einer CPD von ca. 60 wurden durch Subklonierung und dünne Massenkultur der betreffenden MF II-Zellen gewonnen. Terminal differenzierte postmitotische Fibrozyten (PMF) entstanden durch die Behandlung von MF II-Zellen mit Mitomycin C, einem Wirkstoff aus *Streptomyces caespitosus*. Dieses Antibiotikum interkaliert mit der DNA der behandelten Zellen und verhindert somit weitere Zellteilungen. Die Behandlung von Zellen mit MMC führt, wie u.a. auch H₂O₂, Ethanol oder UV-Strahlung, zur „stressinduzierten vorzeitigen Seneszenz“ (SIPS) (Toussaint et al., 2000; Toussaint et al., 2002). Im Gegensatz hierzu erreichen Fibroblasten nach einer bestimmten Anzahl durchlaufener Zellteilungen sowohl in vivo als auch in vitro die „replikative Seneszenz“ (Hayflick and Moorhead, 1961). Diese wird durch die sich bei jeder Replikation verkürzenden Telomere verursacht (Harley et al., 1990). Im Gegensatz zu Keratinozyten sind Fibroblasten in der Regel nicht in der Lage, durch die Aktivität von Telomerasen die ursprüngliche Länge ihrer Telomere wieder herzustellen. Unterschreiten die Enden der Telomere eine kritische Länge von ca. 4 kbp kann keine weitere Replikation mehr erfolgen. Sowohl die „SIPS“ als auch die „replikative Seneszenz“ führen zu einem irreversiblen Zellzyklusarrest in der G₁/S-Phase.

Auch während der spontanen terminalen Differenzierung von Progenitorfibroblasten zu Fibrozyten konnte eine Verkürzung der Telomere beobachtet werden (Rodemann und von Zglinicki, unveröffentlichte Daten).

Unter „Seneszenz“ versteht sich in beiden Fällen jedoch nicht das Altern des Zellsystems bzw. einzelner Zellen, sondern das Auslaufen der Zellteilungsfähigkeit der potentiell mitotischen Progenitorfibroblasten MF III und der Übergang bzw. die spontane Differenzierung dieses Zelltyps zu irreversibel teilungsinaktiven terminal differenzierten Fibrozyten (PMF). Lebens- und Funktionsdauer der PMF-Zellen sind genetisch determiniert. Dementsprechend setzt die Seneszenzphase im Fibro-

blastenzellsystem erst mit dem Erreichen des terminal differenzierten Endstadiums ein (Herskind and Rodemann, 2000).

Sowohl replikativ bedingt als auch stressbedingt ausdifferenzierte Fibroblasten weisen auf Protein- und mRNA-Ebene ähnliche Expressionsmuster auf (Dierick et al., 2002; Fripiat et al., 2001; von Zglinicki et al., 2005). Aus diesem Grunde werden die durch MMC-Behandlung gewonnenen PMF-Zellen als adäquater Ersatz für telomerbedingt ausdifferenzierte Fibrozyten betrachtet. Es ist zu erörtern, ob PMF-Zellen für die klinische Anwendung durch die Behandlung mit MMC gewonnen werden sollten, oder ob Stressfaktoren wie z.B. Bestrahlung demgegenüber von Vorteil wären. Prinzipiell stellt die Antibiotikabehandlung kultivierter Zellen einen technisch wesentlich geringeren Aufwand als die Bestrahlung dar. MMC findet bereits in der Klinik Anwendung, um beispielsweise die Proliferation von Narben- oder Tumorgewebe zu verhindern. Nebenwirkungen des Mitomycin C, welche in vivo beobachtet werden können, betreffen diejenigen Zellen, welche nicht in ihrer Proliferation gehemmt werden sollen (Khong and Muecke, 2006). In vitro sollen jedoch möglichst alle kultivierten Fibroblasten das postmitotische Stadium erreichen. Auf die Behandlung mit dem Antibiotikum folgt ferner eine ca. vierwöchige Phase, in der die Zellen ausdifferenzieren. Durch Waschvorgänge und Mediumwechsel sowie begünstigt durch die äußerst geringe Halbwertszeit des MMC haben die Zellkulturen an sich keinerlei Potential mehr, proliferationshemmend auf das Wundgewebe zu wirken, auf welches sie aufgebracht werden sollen. Für die Gewährleistung größtmöglicher biologischer Sicherheit sollten postmitotische Fibrozyten für eine Aussaat auf ein Trägergewebe sowie eine anschließende Transplantation durch langfristige Kultivierung (Klonierung und Subklonierung) auf natürlichem Wege gewonnen werden, was jedoch sehr viel Zeit in Anspruch nimmt. Klonierung und Subklonierung wiederum schränken überdies die genetische Heterogenität der Fibroblasten/ Fibrozyten stark ein und können zur Selektion von genetisch veränderten Klonen führen, welche ein besonders starkes Wachstum aufweisen.

Die immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT diente in den in dieser Dissertation durchgeführten Versuchen als Ersatz für primäre Keratinozyten (Boukamp et al., 1988; Nova et al., 2003). Dies verhinderte einerseits donorabhängige Variationen auf Seiten der Keratinozyten, da HaCaT-Zellen immer wieder in ähnlicher Passage eingesetzt werden konnten, andererseits besitzen HaCaT-Zellen jedoch nicht mehr die Eigenschaften primärer Keratinozyten, sind so z.B. nicht mehr abhängig von der Zu-

gabe von EGF (Epidermal Growth Factor) zum Medium. Die Tatsache, dass die Kultur von HaCaT-Zellen in DMEM + 10% FCS erfolgt, macht diese Zellen zu idealen Kokultur-Partnern für primäre humane Fibroblasten, welche im selben Medium kultiviert werden. Auch haben die immortalisierten Keratinozyten nicht ihre Fähigkeit verloren, epidermale Strukturen auszubilden. In organotypischen Kulturen mit Fibroblasten stratifizieren HaCaT-Zellen, was auf eine ähnliche Wechselwirkung zwischen HaCaT-Zellen und Fibroblasten schließen lässt, wie sie zwischen humanen primären Keratinozyten und Fibroblasten besteht (Boukamp et al., 1988; Schoop et al., 1999).

4.2 KGF

Die in dieser Disseration durchgeführten Versuche zeigen, dass die Expression des Keratinozyten-Wachstumsfaktors KGF während der Differenzierung von Progenitorfibroblasten zu terminal differenzierten Funktionsfibrozyten heraufreguliert wird. Dieser Effekt ließ sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisen, wobei auf Proteinebene deutlichere Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen zu verzeichnen sind. Auch konnte derselbe Effekt in drei verschiedenen Zellkulturmedien sowie während der Kokultur der betreffenden Progenitorfibroblasten bzw. terminal differenzierten Fibrozyten mit HaCaT-Zellen beobachtet werden. Beinahe unabhängig vom Zellkulturmedium sezernierten MF II-Zellen innerhalb von 3 Tagen 2000 pg KGF pro Mio. Zellen in das untersuchte Kulturmedium, MF III-Zellen sezernierten im Durchschnitt 4000 pg KGF pro Mio. Zellen und terminal differenzierte PMF-Zellen sezernierten durchschnittlich 6000 – 8000 pg KGF pro Mio. Zellen in das Kulturmedium. Die Expression des KGF wird also während der terminalen Differenzierung von Fibroblasten zu Fibrozyten nahezu vervierfacht. HaCaT-Zellen hatten jedoch keinen Einfluss auf die Expression des KGF durch die verschiedenen Zelltypen, wie dies bei der Kokultur von primären Keratinozyten mit Fibroblasten von Maas-Szabowski et al. beobachtet werden konnte (Maas-Szabowski et al., 2000). Dies wiederum könnte darauf zurückzuführen sein, dass HaCaT-Zellen nicht auf KGF angewiesen sind und daher nicht zwingend die KGF-Expression von Fibroblasten beeinflussen müssen. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass in Kokultur mit terminal differenzierten Fibrozyten die Anzahl der HaCaT-Zellen höher war als in Kokultur mit mitotischen Progenitorfibroblasten bzw. in der Kontrolle (Xu, 2006, unveröffentlichte Daten). Dies bedeutet, dass auch HaCaT-Zellen mit erhöhter Proliferation auf die Anwesenheit

von terminal differenzierten Fibrozyten reagieren, möglicher Weise aufgrund des höheren KGF-Levels im Medium.

In dieser Arbeit werden bezüglich der KGF-Expression von postmitotischen Fibrozyten die Daten von Maas-Szabowski et al. (2000) widerlegt. Aus letzteren geht hervor, dass postmitotische Fibrozyten weniger KGF exprimieren, als potentiell mitotische Progenitorfibroblasten. Die unterschiedlichen Beobachtungen könnten darauf zurückgeführt werden, dass die von Maas-Szabowski et al. als PMF bezeichneten Zellen mit einer sehr hohen Dosis (70 Gy) bestrahlt worden waren, um dann alsbald in den entsprechenden Versuchen eingesetzt zu werden. Sowohl die hohe Strahlendosis als auch die Tatsache, dass die Zellen keine Zeit hatten, auszudifferenzieren, könnten eine niedrige KGF-Expression dieser sogenannten PMF-Zellen mit sich führen (Maas-Szabowski et al., 2000).

Um diesen Vermutung zu bestätigen, wurden in einem weiteren Experiment undefinierte Fibroblastenkulturen niedriger Passagen mit einer Dosis von 8 Gy bestrahlt. Die strahleninduzierte Differenzierung manifestiert sich erst nach 2 – 3 Wochen (Rodemann and Bamberg, 1995; Rodemann et al., 1991). Daher wurden die Fibroblasten bis zu drei Wochen nach Bestrahlung in konfluenten und subkonfluenten Kulturen auf ihre KGF-Expression hin untersucht. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, äußert sich die strahleninduzierte Differenzierung nach 2 Wochen in subkonfluenten Kulturen und nach drei Wochen in konfluenten Kulturen durch eine erhöhte KGF-Expression. Die strahleninduzierte KGF-Expression liegt bei allen untersuchten Zellstämmen frühestens nach 2 Wochen in subkonfluenter Kultur im Bereich der KGF-Expression entsprechender terminal differenzierter Funktionsfibrozyten.

Ein interessanter Aspekt der erhöhten KGF-Expression bei terminal differenzierten Fibrozyten ist der, dass KGF eine zytoprotektive Wirkung auf Epithelzellen entfalten kann. KGF wird in klinischen Studien eingesetzt, um das gesunde Gewebe von Patienten mit verschiedenen Tumoren während einer Radio- oder Chemotherapie zu schützen (Finch and Rubin, 2004). Sowohl durch Bestrahlung als auch durch Antibiotikabehandlung kommt es zur verstärkten terminalen Differenzierung von Progenitorfibroblasten zu Funktionsfibrozyten (Rodemann and Bamberg, 1995). Der Organismus scheint sich also vor einer Gewebeschädigung zu schützen, indem er mit der terminalen Differenzierung von Fibroblasten zu Fibrozyten unter anderem die KGF-Expression heraufreguliert. Somit kann der abrupt einsetzenden Differenzierung

nach Zellstress neben negativen Aspekten wie der Fibrose auch eine biologisch sinnvolle und protektive Rolle zugeordnet werden.

4.3 FGF-BP

Um zu untersuchen, welche Wirkung konditionierte Überstände der einzelnen Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien auf HaCaT-Zellen haben, wurde die Expression des FGF-BP (FGF Binding Protein) von HaCaT-Zellen analysiert. FGF-BP ist als Katalysator für geringe Mengen an KGF beschrieben (Beer et al., 2005). Tatsächlich wurden in der zitierten Arbeit Konzentrationen von 0,01 – 0,1 ng/ml KGF im Medium als niedrig bezeichnet, wohingegen Konzentrationen von 1 – 10 ng/ml als hoch bezeichnet wurden. In den in dieser Dissertation durchgeführten Versuchen mit konditionierten Überständen kann die KGF-Konzentration im Überstand von PMF-Zellen anhand der ELISA-Ergebnisse auf ca. 0,4 ng/ml geschätzt werden. In MF II- und MF III-konditionierten Überständen ist die KGF-Konzentration entsprechend geringer. Dies sowie die Tatsache, dass die FGF-BP-mRNA von HaCaT-Zellen einzig nach Behandlung mit Überständen von PMF-Zellen leicht erhöht wurde, könnte darauf hindeuten, dass die von MF II- und MF III-Zellen sezernierten Mengen an KGF biologisch nicht relevant sind. Die vermehrte Expression des FGF-BP nach Behandlung von HaCaT-Zellen mit KGF konnte von Beer et al. auf Proteinebene nachgewiesen werden (Beer et al., 2005). Die Tatsache, dass die FGF-BP-mRNA von HaCaT-Zellen in der hier durchgeführten RT-PCR-Analyse nur um 25 % im Vergleich zur Kontrolle ansteigt, kann darauf zurückzuführen sein, dass das FGF-BP-mRNA-Level an sich schon sehr hoch war, da die HaCaT-Zellen in DMEM mit 10 % FCS kultiviert wurden und FCS laut der oben zitierten Studie ebenfalls zu einer erhöhten FGF-BP-Expression führt. Die Versuchsreihe in dieser Dissertation konnte jedoch nicht unter serumfreien Bedingungen durchgeführt werden, da dadurch die KGF-Expression der Fibroblasten beeinträchtigt worden wäre. Überdies muss beachtet werden, dass die FGF-BP-Expression von HaCaT-Zellen durch TGF- β 1 gehemmt wird, dass jedoch PMF-Zellen im Vergleich zu ihren mitotischen Vorläufern vermutlich eine erhöhte Expression von TGF- β 1 aufweisen. Der hemmende Effekt des TGF- β 1 wird also dennoch durch weitere Faktoren im konditionierten Zellkulturmedium von PMF-Zellen, wie z.B. KGF, TGF- α oder FCS kompensiert (Beer et al., 2005; Hakenjos et al., 2000; Vande Berg et al., 2005).

4.4 MMPs

Wie Vande Berg et al. berichten, ist in chronischen Wunden (Dekubitus) das Gleichgewicht zwischen MF und PMF gestört. Ein wesentlich höherer Anteil terminal differenzierter Fibrozyten konnte nachgewiesen werden (Vande Berg et al., 2005). Geht man davon aus, dass sich die postmitotischen Fibrozyten aus chronischen Wunden im Bezug auf die KGF-Expression ähnlich verhalten wie die in dieser Arbeit untersuchten Fibrozyten, liegt der Schluss nahe, dass der schlechte Heilungsverlauf chronischer Wunden nicht auf einen Mangel an KGF zurückzuführen ist. Vielmehr muss der Wundgrund die Migration und Proliferation der Keratinozyten in die Wunde hinein verhindern. Dies kann z.B. durch die fehlerhafte Expression von Matrix-Metalloproteinasen verursacht werden.

Es liegt eine Reihe von Studien vor, in denen die anormale Expression von MMPs in chronischen Wunden untersucht wurde. Während in dieser Arbeit nur die MMPs von Fibroblasten bzw. Epithelzellen untersucht wurden, stellen die Neutrophilen Granulozyten einen dritten Zelltypen dar, welcher MMPs exprimiert. Vor allem die Neutrophilen Granulozyten weisen ein großes proteolytisches Potenzial auf, da ihre MMPs schon während ihrer myelopoietischen Entwicklung synthetisiert und danach in diversen Granula und Vesikeln gespeichert werden (Yager and Nwomeh, 1999). Die fortwährende Fragmentierung der Extrazellulären Matrix durch erhöhte MMP-Expression in chronischen Wunden lockt überdies immer neue Neutrophile Granulozyten an. Nicht allein die erhöhte Expression von MMPs führt zur Störung des Gleichgewichtes chronischer Wunden, sondern auch die verringerte Expression der TIMPs (Tissue Inhibitors of MMPs), welche während der normalen Wundheilung die Aktivität der MMPs durch Komplexbildung hemmen können (Martin, 1997; Saarialho-Kere, 1998; Singer and Clark, 1999; Yager and Nwomeh, 1999).

In chronischen Wunden konnte eine erhöhte Expression und Aktivität der Kollagenase MMP-1, der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sowie der Stromelysine MMP-3, MMP-10 und MMP-11 nachgewiesen werden (Philipp et al., 2004; Saarialho-Kere et al., 1994; Wall et al., 2003; Yager and Nwomeh, 1999).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von MMP-2 sowie MMP-10 während der Differenzierung von Progenitorfibroblasten zu Fibrozyten hochreguliert wird. Bei der Beobachtung von MMP-3 konnte ein gegenteiliger Effekt festgestellt werden: Stromelysin 1 wird von terminal differenzierten Fibrozyten in geringerem Maße exprimiert als von potentiell mitotischen Progenitorfibroblasten.

MMP-2 ist für die Migration der Keratinozyten essentiell. MMP-2 spaltet das Basalmembranprotein Laminin-5 und führt dadurch zum Ablösen der wandernden Keratinozyten vom Untergrund. Die gleiche Funktionsweise konnte auch für MMP-10 und MMP-19 beobachtet werden. MMP-2 aktiviert überdies weitere MMPs, welche eine derartige Funktion übernehmen könnten (Giannelli et al., 1997; Krampert et al., 2004; Mäkelä et al., 1999; Sadowski et al., 2005). Es ist denkbar, dass die Überexpression von MMP-2 in chronischen Wunden dazu führt, dass die Keratinozyten nicht am Wundgrund haften bleiben, sondern vollständig abgelöst werden. Möglicher Weise ist die erhöhte MMP-2-Expression in chronischen Wunden auf die in erhöhtem Maße anwesenden PMF-Zellen zurückzuführen, da PMF-Zellen, wie in dieser Arbeit beschrieben, verglichen mit potentiell mitotischen Progenitorfibroblasten ein erhöhtes MMP-2-Expressionslevel aufweisen. Ein derartiger pathogener Effekt könnte auch von der erhöhten Expression von MMP-10 durch seneszente Fibroblasten in chronischen Wunden ausgehen. Die Expression von MMP-2 wird durch TGF- β 1 induziert, welches in erhöhtem Maße von PMF-Zellen in chronischen Wunden sezerniert wird (Mäkelä et al., 1999; Vande Berg et al., 2005). Somit könnte es bei PMF-Zellen zu einer Autoinduktion des MMP-2 kommen. Überdies wird TGF- β 1 seinerseits durch proteolytische Spaltung von MMP-2 und MMP-9 aktiviert, wodurch sich der Kreislauf wiederholt (Yu and Stamenkovic, 2000). Einen Ausweg aus diesem Kreislauf scheinen die TIMPs zu ermöglichen. Diese wiederum werden aber in chronischen Wunden in pathologisch geringer Konzentration exprimiert (Saarialho-Kere, 1998).

Parrinello et al. (2005) argumentieren, dass terminal differenzierte postmitotische Fibrozyten hauptverantwortlich sind für die Tumorentstehung im Alter. Dies wird einerseits begründet durch die Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welche das Wachstum aberranter Zellen fördern sowie durch die Sezernierung von Faktoren, die die Matrix umstrukturieren, woraufhin aberrante Zellen Invasivität entwickeln können. In der zitierten Arbeit sowie bei Millis et al. (1992) wird für MMP-3 eine höhere Expression bei terminal differenzierten Fibrozyten als bei Progenitorfibroblasten gemessen (Millis et al., 1992; Parrinello et al., 2005). In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Expression von MMP-3 zwar von MF II zu MF III leicht hochreguliert wird, jedoch nach dem Ausdifferenzieren der Zellen zu PMF wieder unter das Niveau von MF II absinkt. Die konträren Aussagen könnten daher rühren, dass in den zitierten Studien Zellen später Passagen als „seneszent“ bezeichnet werden, bzw. dass nach Bestrahlung der Zellen letztere nicht ausreichend

lange inkubiert wurden (nur 7 Tage), um vollständig zu postmitotischen Fibrozyten ausdifferenzieren zu können (siehe Kapitel 4.2) (Rodemann and Bamberg, 1995; Rodemann et al., 1991). In beiden Fällen wären die Versuche demnach mit Zellen durchgeführt worden, welche in dieser Arbeit als MF III definiert werden. Geht man aber davon aus, dass postmitotische Fibrozyten eine geringere MMP-3-Expression aufweisen als MF III-Progenitorfibroblasten, so wird das Argument von Parrinello et al., nämlich dass PMF-Zellen eine Grundlage für die Krebsentstehung schaffen, zumindest in Hinsicht auf MMP-3 entkräftet (Parrinello et al., 2005). Wie hier gezeigt wurde, werden jedoch Expression und Aktivität der MMPs im Allgemeinen während der Differenzierung heraufreguliert, wodurch sich ohne Zweifel Veränderungen in der Extrazellulären Matrix ergeben. Zudem kommt die Tatsache, dass MMP-3 in chronischen Wunden ebenfalls von basalen Keratinozyten exprimiert wird und nicht allein von Fibroblasten (Saarialho-Kere et al., 1994; Yager and Nwomeh, 1999). In dieser Dissertation konnte mit Hilfe verschiedener Zymogramme gezeigt werden, dass Fibroblasten/ Fibrozyten der einzelnen Differenzierungsstadien HaCaT-Zellen im Hinblick auf deren MMP-Aktivität unterschiedlich beeinflussen. Es ist daher denkbar, dass die erhöhte MMP-3-Expression der Keratinozyten in der Peripherie chronischer Wunden auf das gestörte Gleichgewicht zwischen MF- und PMF-Zellen zurückgeführt werden kann.

Bezüglich des Argumentes, die von terminal differenzierten Fibrozyten sezernierten Wachstumsfaktoren und Zytokine förderten die Krebsentstehung während des Alterns (Parrinello et al., 2005) kann argumentiert werden, dass sowohl Zytokine als auch Wachstumsfaktoren nicht nur maligne Zellen stimulieren, sondern auch wichtige Funktionen bei der Wundheilung spielen. Zudem verleitet diese Aussage zu der Ansicht, dass terminal differenzierte Fibrozyten erst ab einem bestimmten Lebensalter im menschlichen Organismus vorhanden sind. Da dies durch die Aussagen von Bayreuther sowie Rodemann et al. widerlegt wird, nach denen in menschlichen Individuen jeglicher Altersstufe immer ein Verhältnis von MF:PMF 2:1 besteht, muss den Fibrozyten eine wichtige Rolle im Organismus zukommen (Bayreuther, 1992; Rodemann et al., 1996). Diese Rolle könnte gerade in der vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren und weiteren Proteinen liegen.

Herbig et al. konnten in Primaten jedoch einen altersabhängigen Anstieg von terminal differenzierten Fibrozyten beobachten, da sie die betreffenden Zellen nicht anhand der β -Galactosidase-Färbung klassifizierten, sondern sich drei weitere Marker

zunutze machten: die Telomer-Dysfunktion, die ATM-signalisierte Antwort auf DNA-Schäden sowie die Heterochromatisierung der DNA (Herbig et al., 2006).

Die Expression von MMPs in vitro ist abhängig vom Kulturmedium und von der Matrix, auf welcher die Zellen wachsen (Nova et al., 2003). Daher wurde die MMP-Expression von Fibroblasten in verschiedenen Kulturmedien untersucht. In beiden Zellkulturmedien, welche zur Analyse der MMPs durch Fibroblasten konditioniert worden waren, nämlich DMEM + 10% FCS und SFM:DMEM 2:1 ohne FCS, wurden im Western-Blot annähernd gleich starke Signale für alle MMPs detektiert, d.h. im Kokulturmedium für Fibroblasten und primäre humane Keratinozyten SFM:DMEM 2:1 weisen Fibroblasten keine besondere Expression von MMPs gegenüber dem Standardmedium auf. Allerdings konnte im Kokulturmedium eine stärkere proteolytische Aktivierung von MMP-2 nachgewiesen werden. Dies könnte auf das im Kokulturmedium enthaltene EGF zurückzuführen sein, da EGF die proteolytische Aktivierung von MMP-2 via MT1-MMP katalysiert (Kheradmand et al., 2002; Sato et al., 1999).

Bei der Untersuchung von HaCaT-Zellen auf ihre Expression von MMPs konnten in der Zymographie vermehrt aktivierte MMPs im Kokulturmedium SFM:DMEM 2:1 detektiert werden, was ebenfalls durch das im Medium enthaltene EGF begründet werden könnte (Charvat et al., 1998). Nach der Behandlung von HaCaT-Zellen mit konditionierten Überständen konnten differentielle Effekte für die Expression von MMP-2 und MMP-9 beobachtet werden. Die Expression von MMP-9 durch HaCaT-Zellen wurde durch die Behandlung mit PMF-Zellen erhöht. Dies konnte sowohl auf Proteiniveau (Western-Blot und Zymographie) als auch auf mRNA-Niveau (realtime RT-PCR) beobachtet werden. In porcinen periodontalen Ligamentepithelzellen sowie in der humanen Magenkrebszelllinie SNU und in HPDE-Zellen wurde ein Anstieg der MMP-9-Expression durch KGF-Behandlung nachgewiesen (Niu et al., 2007; Putnins et al., 1995; Shin et al., 2002). Möglicher Weise ist die erhöhte MMP-9-Expression nach Behandlung mit Fibrozyten-konditionierten Überständen auf die erhöhte KGF-Konzentration in diesem Medium zurückzuführen. Die MMP-2-Expression von HaCaT-Zellen wurde durch die Behandlung mit PMF-konditionierten Überständen jedoch sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Niveau herunterreguliert.

Mittels Zymographie konnte festgestellt werden, dass die Aktivität und Expression von MMPs während der Differenzierung von Fibroblasten heraufreguliert wird. Nach Behandlung von HaCaT-Zellen mit konditionierten Überständen von Fibroblasten-/Fibrozyten-Differenzierungsstadien konnte ebenfalls mit zunehmendem Differenzie-

rungsstatus der Fibroblasten bzw. Fibrozyten eine immer stärkere Aktivierung von HaCaT-sezernierten MMPs nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass verschiedenste MMPs die Fähigkeit besitzen, weitere MMPs proteolytisch zu aktivieren (Kerkela and Saarialho-Kere, 2003). Das Zymographie-Medium der HaCaT-Zellen wurde nach der Stimulation durch Fibroblasten-/ Fibrozyten-konditionierte Überstände frisch zugegeben und daraufhin einzig durch die HaCaT-Zellen konditioniert. Die mittels Zymographie detektierten MMPs der HaCaT-Zellen wurden also erst nach dem Entfernen der Fibroblasten- bzw. Fibrozyten-sezernierten MMPs ins Medium abgegeben. Aus diesem Grunde ist eine direkte proteolytische Aktivierung der HaCaT-sezernierten MMPs durch die Fibroblasten-/ Fibrozyten-sezernierten MMPs in diesem Versuchsaufbau ausgeschlossen. Die Aktivierung der HaCaT-sezernierten MMPs muss somit auf indirektem Wege erfolgt sein. Mögliche Mediatoren, die hierfür verantwortlich sein könnten, sollen in Kapitel 4.5 diskutiert werden.

Fibroblasten verändern somit während ihrer Differenzierung zu Fibrozyten nicht nur ihre eigenen Expressionsmuster für MMPs, sondern auch die MMP-Expression der epithelialen Zellen. Die erhöhte Expression von MMP-9 und weiteren MMPs durch Epithelzellen in chronischen Wunden könnte somit indirekt durch vermehrt auftretende Fibrozyten verursacht werden (Saarialho-Kere, 1998).

4.5 Wundheilung

Es sollte die Frage beantwortet werden, ob es zu einer verbesserten Wundheilung beitragen könnte, zusammen mit autologen mitotischen Progenitorfibroblasten auch autologe postmitotische Fibrozyten und intermediäre Differenzierungstypen auf Trägermaterialien aufzubringen, um mit letzteren die Wundheilung chronischer Wunden zu unterstützen. Grundlage für diese Fragestellung war die Erkenntnis darüber, dass mitotische Progenitorfibroblasten und postmitotische Fibrozyten in vivo immer in einem Verhältnis von 2:1 vorkommen (Bayreuther, 1992; Rodemann et al., 1996). Da postmitotische Fibrozyten eine höhere Expression vieler Proteine aufweisen als potentiell mitotische Progenitorfibroblasten, kommt ihnen zweifelsohne und wahrscheinlich besonders während der Wundheilung eine spezielle Funktion zu. Die Tatsache, dass PMF-Zellen sowohl in vivo als auch in vitro mindestens 1 Jahr persistieren können, bevor sie die Apoptose durchlaufen, deutet darauf hin, dass PMF-Zellen in vivo eine wichtige Rolle übernehmen. Diese besteht in der Produktion von Extrazellulärer Matrix sowie Wachstumsfaktoren, wie z.B. KGF oder VEGF

(Coppé et al., 2006). In gesundem Gewebe scheint diese Arbeitsteilung der Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien zwischen Proliferation (MF) und Proteinsynthese (PMF) einwandfrei zu funktionieren. Auch während der Heilung akuter Wunden, wenn MF zu PMF in einem ausgewogenen Verhältnis von 2:1 vorhanden sind, ergeben sich durch PMF-Zellen und deren erhöhte MMP-Produktion keine Probleme. Es konnte sogar gezeigt werden, dass Fibroblasten während der normalen Wundheilung Telomeraseaktivität an der Spitze des Granulationsgewebes aufweisen, wodurch ein Fortbestand des 2:1-Verhältnisses von MF zu PMF gewährleistet werden könnte (Osanai et al., 2002).

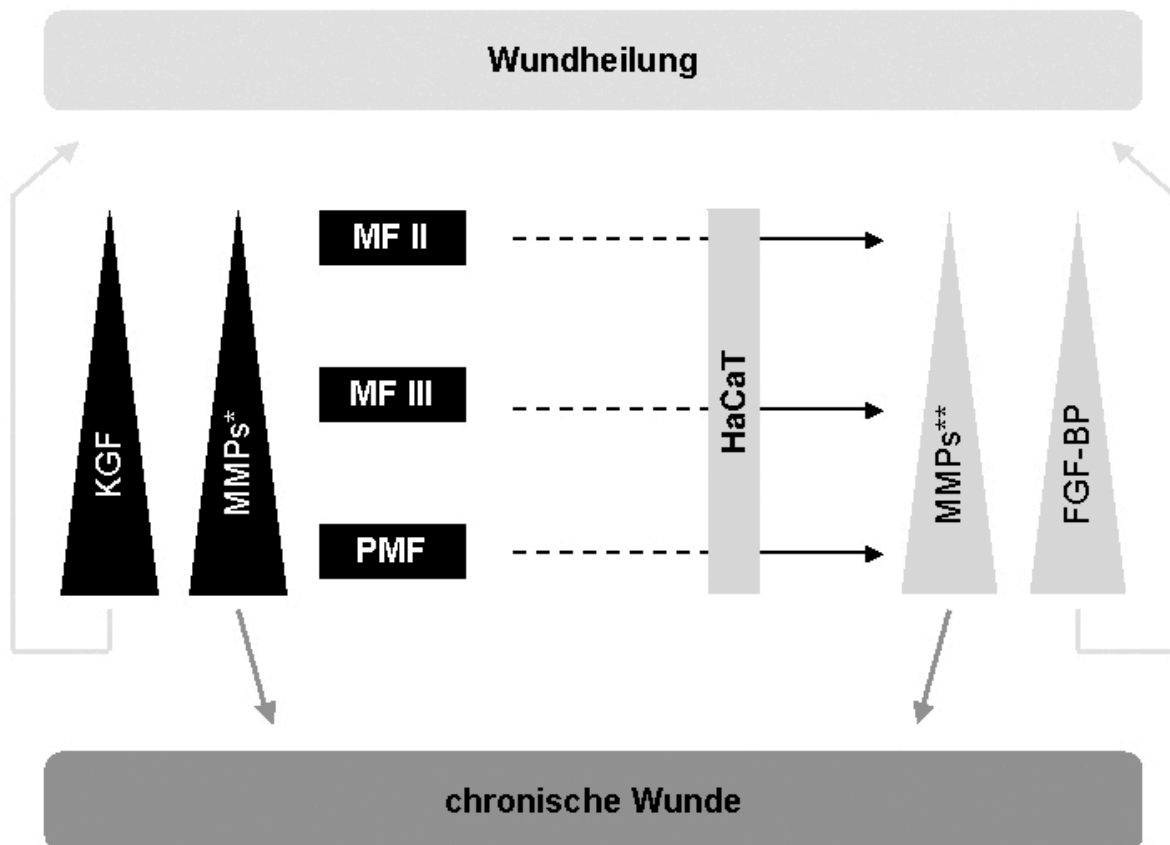


Abbildung 4.5.1: Schematische Darstellung der direkten und indirekten Wirkung von Fibroblasten (MF) und Fibrozyten (PMF) auf die Wundheilung bzw. auf die Förderung chronischer Wunden. KGF: Keratinozyten-Wachstumsfaktor; MMPs: Matrix-Metalloproteinasen; FGF-BP: FGF-Bindeprotein. *Ausnahme MMP-3, **Ausnahme: MMP-2.

In Abbildung 4.5.1 ist der Einfluss von Progenitorfibroblasten- bzw. Fibrozyten-Differenzierungsstadien auf die Wundheilung schematisch dargestellt. Eine erhöhte Expression von KGF durch terminal differenzierte Fibrozyten ist der Wundheilung

zuträglich. Die Stimulation von HaCaT-Zellen zur Produktion von FGF-BP durch terminal differenzierte Funktionsfibrozyten hat ebenfalls einen positiven Effekt auf die Wundheilung. Im Gegensatz hierzu weisen terminal differenzierte Fibrozyten eine höhere Expression und Aktivierung von MMPs im Vergleich zu Progenitorfibroblasten auf. Dies fördert die Entstehung chronischer Wunden. Ebenfalls konnte eine erhöhte Expression und Aktivierung von MMPs durch HaCaT-Zellen gezeigt werden, welche mit den Überständen von terminal differenzierten Fibrozyten behandelt worden waren.

In chronischen Wunden, in denen unverhältnismäßig viele terminal differenzierte Fibrozyten anwesend sind, scheint der negative Effekt dieser Zellen, nämlich die hohe Expression von MMPs, den positiven Effekt, also die hohe Expression des KGFs, zunichte zu machen. KGF könnte sogar der hohen MMP-Expression der Epithelzellen zuträglich sein: in histiotypischen Kulturen auf speziellen Polycarbonatmembranen reagierten porcine periodontale Ligamentepithelzellen auf die Zugabe von KGF mit erhöhter Aktivierung von MMP-9. Dieser Effekt konnte auf normalen Kulturschalen jedoch nicht beobachtet werden (Putnins et al., 1995). Ebenso konnten Madlener et al. zeigen, dass 5 – 8 Stunden nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit KGF ein erhöhter Anteil an MMP-10- (Stromelysin-2-) mRNA in diesen Zellen zu detektieren war. Eingesetzt wurden 10 ng/ml KGF in DMEM ohne FCS. Dies entspräche pro ml etwa der Menge an KGF, welche in den Versuchen dieser Dissertation von 0,5 Mio. PMF-Zellen sezerniert wurde. Ähnliche Effekte konnten in der zitierten Arbeit auch durch Stimulation derselben Zellen mit EGF oder TNF- α erzielt werden, wohingegen der Effekt nach Stimulation mit TGF- β 1 noch deutlicher war (Madlener et al., 1996).

Werden hingegen Fibroblasten mit dem Keratinozyten-sezernierten 14.3.3 σ -Protein Stratifin behandelt oder werden sie in Kokultur mit Keratinozyten kultiviert, so kann ein Anstieg verschiedenster MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-10, MT5-MMP) sowie eine veränderte Expression unterschiedlicher Extrazellulärer Matrixproteine auf Seiten der Fibroblasten beobachtet werden. Die Fibroblasten in einem solchen Kokultursystem wiederum konnten die Stratifin-Expression von Keratinozyten merklich erhöhen. Dies bedeutet, dass bezüglich der MMP-Expression ein synergetischer Effekt zwischen Fibroblasten und Epithelzellen besteht (Ghaffari et al., 2006; Ghahary et al., 2005). Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien adhären je nach Größe des Zelltyps in unterschiedlicher Anzahl in Kokulturgefäßen. Daher konnten in dieser Arbeit keine repräsentativen Versuche bezüglich des synergetischen Effekts

von Keratinozyten mit den einzelnen Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien durchgeführt werden.

Dasu et al. (2003) konnten zeigen, dass MMP-1 in stöchiometrischer Weise durch TIMP-1 inhibiert wird. Inflammatorische Zytokine, die bei der Wundheilung eine wichtige Rolle spielen, wirken in verschiedener Weise auf MMP-1 und TIMP-1 von humanen dermalen Fibroblasten. MMP-1- und TIMP-1-mRNA werden durch IL-6 und TNF- α hochreguliert, bleiben aber durch IL-1 β unbeeinflusst. Auf Proteinebene wurde das Proprotein von TIMP-1 durch TNF- α nicht beeinflusst, durch IL-6 in IL-1 β jedoch stärker exprimiert. TNF- α führte zur verstärkten Expression von TIMP-1 auf Proteinebene (Dasu et al., 2003).

Aus den zitierten Studien geht hervor, dass Faktoren wie KGF, EGF, TNF- α , TGF- β sowie Interleukine (IL-1, IL-6) und Stratifin direkt oder indirekt auf die Aktivität verschiedenster Metalloproteinasen von Keratinozyten und Fibroblasten bzw. Fibrozyten Einfluss nehmen.

4.6 Ausblick

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass sich die Differenzierungsstadien von humanen dermalen Fibroblasten im Bezug auf KGF-Expression sowie Expression von MMPs stark voneinander unterscheiden.

Auf dem Trägermaterial Matriderm wurde nach Besiedelung mit einer physiologischen Mischung aus potentiell mitotischen Progenitorfibroblasten zu terminal differenzierten Fibrozyten im Verhältnis 2:1 eine mindestens genau so deutliche dermoepidermale Struktur gebildet, als nach Besiedelung mit Progenitorfibroblasten und Keratinozyten alleine (Xu, 2007). Die erhöhte KGF-Expression terminal differenzierter Fibrozyten könnte hierfür mit verantwortlich sein. Ebenso konnten in dieser Arbeit besonders für Fibroblasten des Stadiums MF III Hinweise auf eine höhere Expression von Extrazellulären Matrixproteinen gefunden werden, welche maßgeblich an der Produktion der Basallamina beteiligt sind, nämlich Laminin-1/-2 sowie Kollagen IV.

Bevor jedoch ein Trägermaterial, besiedelt mit mitotischen Fibroblasten sowie terminal differenzierten Fibrozyten speziell für die Behandlung chronischer Wunden hergestellt werden kann, sollte die Rolle untersucht werden, die KGF in chronischen Wunden spielt. Hierbei wäre ebenso die Untersuchung der KGF-Expression von Fibroblasten, welche aus gesunder Dermis von Patienten mit chronischen Wunden

entnommen werden (z.B. Diabetiker) interessant. Möglicher Weise ist die Basal-expression in solchen Individuen ebenso vermindert, wie eine erhöhte MMP-Expression festgestellt werden konnte (Lobmann et al., 2006a; Werner et al., 1994). Werner et al. haben über eine verzögerte und verringerte Induktion der KGF-Expression in Mäusen mit genetisch bedingter Diabetes berichtet, wohingegen Senet et al. keinen signifikanten Unterschied im KGF-Gehalt der Wundflüssigkeit von chronischen bzw. nicht-chronischen Wunden des Menschen feststellen konnten (Senet et al., 2003; Werner et al., 1994). Bis heute wurden jedoch keine Studien veröffentlicht, in denen der Wundheilungsverlauf chronischer Ulcera nach Behandlung mit KGF verbessert werden konnte. Der einzige Wachstumsfaktor, welcher bisher erfolgreich zur Heilung chronischer Ulcera angewendet werden kann, ist PDGF (Werner and Grose, 2003). Dies deutet darauf hin, dass der positive Effekt, welchen terminal differenzierte Funktionsfibrozyten auf die Wundheilung spielen könnten, nämlich die hohe KGF-Expression, weniger nützlich ist.

FGF-BP dient der Freisetzung von KGF aus der Extrazellulären Matrix und erhöht somit dessen Rezeptorbindung (Beer et al., 2005). Es bleibt zu klären, welche Faktoren dafür verantwortlich sind, dass HaCaT-Zellen eine erhöhte Expression von FGF-BP nach Stimulation durch Fibrozyten-konditionierte Überstände aufwiesen. Möglicher Weise kann dieser Effekt nicht durch die Behandlung von HaCaT-Zellen mit KGF allein beobachtet werden. Dies würde bedeuten, dass KGF in Kombination mit weiteren Faktoren doch der Heilung chronischer Wunden zuträglich sein könnte.

Die Forschung konzentriert sich jedoch vielmehr auf die Inhibition bzw. Absorption von Matrix-Metalloproteinasen in chronischen Wunden durch spezielle Wundaufgaben (Bennett et al., 2003; Cullen et al., 2002; Lobmann et al., 2006b; Vachon and Yager, 2006). Dies zeigt, welch großes Problem die hohe Expression von MMPs in chronischen Wunden darstellt. In dieser Arbeit wurde eine hohe Expression und Aktivität von MMPs terminal differenzierter Fibrozyten beobachtet. Ebenso reagierten HaCaT-Zellen generell mit einer höheren Aktivität von MMPs auf die Behandlung mit Kulturmedien terminal differenzierter Fibrozyten.

Aus diesen Gründen kann abschließend festgestellt werden, dass sich terminal differenzierte Fibrozyten trotz ihrer hohen KGF-Expression wahrscheinlich nicht für die Behandlung chronischer Wunden eignen, da sie eine zu hohe Expression von MMPs aufweisen. PMF-Zellen in Kombination mit mitotischen Stadien könnten sich aufgrund ihrer hohen KGF-Expression jedoch vorteilhaft auf den Heilungsverlauf lang-

sam heilender, nicht-chronischer Wunden, wie z.B. großflächiger Verbrennungswunden auswirken.

Um das komplette Wechselspiel zwischen den verschiedenen Zelltypen und die Bedeutung der einzelnen Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien ermessen zu können, bedarf es einer differenziellen Analyse der in Kapitel 4.5 erwähnten Wachstumsfaktoren und Zytokine.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane dermale Fibroblasten einzelner Differenzierungsstadien differenzielle Genaktivität und Proteinexpression aufweisen. Auch die epitheliale Keratinozytenzelllinie HaCaT wird in unterschiedlicher Weise durch die einzelnen Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien beeinflusst.

Die Differenzierungsstadien wurden unterteilt in potentiell mitotische Progenitorfibroblasten (MF II und MF III) sowie terminal differenzierte Funktionsfibrozyten (PMF). Die Unterschiede in der Expression konnten sowohl bei wundheilungsfördernden sowie bei für chronische Wunden wundheilungsverzögernden Proteinen, nämlich KGF (Keratinozyten-Wachstumsfaktor) und MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) festgestellt werden. Die Expression der betreffenden Markergene wurde sowohl auf mRNA-Level (realtime RT-PCR) als auch auf Proteinniveau (ELISA, Western-Blot, Zymographie) analysiert. KGF wird während der Differenzierung dermalen Progenitorfibroblasten zu terminal differenzierten Fibrozyten drastisch hochreguliert, sodass der Schluss nahe liegt, die Expression früher Differenzierungsstadien sei lediglich eine Basalexpression, wohingegen PMF-Zellen für die funktionelle Expression d.h. für die Wachstumsförderung und Zytoprotektion der Keratinozyten notwendig seien. Im Falle der MMPs ergeben sich verschiedene Expressionsmuster. MMP-2 sowie MMP-10 werden stärker von postmitotischen Fibrozyten exprimiert, während MMP-3 von Progenitorfibroblasten stärker exprimiert wird als von Funktionsfibrozyten. Die mittels Zymographie ermittelte allgemeine Aktivität der MMPs steigt jedoch während der Differenzierung von Fibroblasten stetig an.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten-/ Fibrozyten-Differenzierungsstadien unterschiedlich auf die Proteinexpression von HaCaT-Zellen wirken. So wurde die Expression des FGF-BP (FGF-Bindprotein) einzig nach Stimulation von HaCaT-Zellen durch PMF-konditionierte Überstände hochreguliert, was ebenfalls auf

eine alleinige funktionelle KGF-Expression der PMF-Zellen hindeuten könnte. In Bezug auf die MMP-Expression von HaCaT-Zellen konnte gezeigt werden, dass die MMP-Expression und -aktivität dieser Epithelzellen in den meisten Fällen nach Inkubation mit PMF-konditionierten Überständen am höchsten ist. Eine Ausnahme hiervon scheint MMP-2 zu sein, welches am stärksten exprimiert wird, wenn die Zellen mit MF II-konditionierten Überständen behandelt werden.

Bezüglich der MMP-Expression von HaCaT-Zellen konnte mit Ausnahme des MMP-2 eine steigende Aktivität und Expression beobachtet werden, je höher der Differenzierungsgrad der Fibroblasten war, mit deren Überstand die HaCaT-Zellen zuvor behandelt worden waren. Die Aktivierung der HaCaT-sezernierten MMPs erfolgte indirekt, d.h. nicht über die proteolytische Spaltung Fibroblasten- bzw. Fibrozyten-sezernierter MMPs.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass den einzelnen Differenzierungsstadien der Fibroblasten im komplizierten Gefüge der Wundheilung differentielle Rollen zukommen.

Abstract

In the present thesis three differentiation types of human dermal fibroblasts as well as their influence on the epidermal keratinocyte cell line HaCaT have been analyzed. The fibroblast types were defined as potentially mitotically active progenitor fibroblasts (MF II and MF III) and terminally differentiated postmitotic fibrocytes (PMF).

It could be shown, that the specific cell types differed with respect to the expression of several proteins important for wound healing process. Keratinocyte Growth Factor (KGF), a wound healing promoting factor is upregulated drastically during the differentiation of fibroblasts to fibrocytes. HaCaT cells treated with supernatants of either differentiation type presented an increased level of FGF-BP mRNA exclusively after treatment with PMF-conditioned medium. As FGF-BP promotes KGF function this factor is also important for wound healing.

In contrast the overexpression of matrix metalloproteinases (MMPs) in chronic wounds is known to inhibit wound healing. In this thesis it could be shown that the general MMP activity and expression increases steadily with differentiation of fibroblasts to terminally differentiated fibrocytes. MMP-2 and MMP-10 were upregulated whereas MMP-3 turned out to be the only analyzed MMP which is downregulated in fibrocytes. Interestingly fibroblast/ fibrocyte differentiation types influenced the

epithelial keratinocyte cell line HaCaT in different fashions to express MMPs. The general expression and activation of MMPs was upregulated after treatment of HaCaT cells with fibrocyte (PMF) supernatant in comparison to untreated or progenitor fibroblast treated HaCaT cells. MMP-2 could be shown to be downregulated in HaCaT cells after treatment with PMF supernatants. Therefore it can be concluded that differentiation subtypes of fibroblasts influence wound healing directly or indirectly in different fashion and are worthy to be analyzed more closely in future studies.

6 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2004). "Molekularbiologie der Zelle," Wiley-VCH, Weinheim.
- Bayreuther, K., Francz, P. I., and Rodemann, H. P. (1995). [Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation]. *Ontogene* **26**, 22-37.
- Bayreuther, K., Francz, P.I., Rodemann, H. P. (1992). Fibroblasts in normal and pathological Terminal Differentiation, Aging, Apoptosis and Transformation. *Arch. Gerontol. Geriatr. suppl.* **3**, 47-74.
- Bayreuther, K., Rodemann, H. P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., and Francz, P. I. (1988). Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5112-6.
- Beer, H. D., Bittner, M., Niklaus, G., Munding, C., Max, N., Goppelt, A., and Werner, S. (2005). The fibroblast growth factor binding protein is a novel interaction partner of FGF-7, FGF-10 and FGF-22 and regulates FGF activity: implications for epithelial repair. *Oncogene* **24**, 5269-77.
- Bennett, S. P., Griffiths, G. D., Schor, A. M., Leese, G. P., and Schor, S. L. (2003). Growth Factors in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Br J Surgery* **90**, 133-146.
- Beyer, T. A., Werner, S., Dickson, C., and Grose, R. (2003). Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair. *Experimental Cell Research* **287**, 228-236.
- Boismenu, R., and Havran, W. L. (1994). Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science* **266**, 1253-5.
- Boukamp, P., Petrussevska, R., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988). Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology* **106**, 761-771.
- Brenneisen, P., Gogol, J., and Bayreuther, K. (1994). DNA synthesis and Fos and Jun protein expression in mitotic and postmitotic WI-38 fibroblasts in vitro. *Exp Cell Res* **211**, 219-30.
- Charvat, S., Chignol, M. C., Souchier, C., Le Griel, C., Schmitt, D., and Serres, M. (1998). Cell migration and MMP-9 secretion are increased by epidermal growth factor in HaCaT-ras transfected cells. *Exp Dermatol* **7**, 184-90.
- Cook, H., Stephens, P., Davies, K. J., Harding, K. G., and Thomas, D. W. (2000). Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* **115**, 225-233.
- Coppé, J. P., Kauser, K., Campisi, J., and Beausejour, C. (2006). Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by primary human fibroblasts at senescence. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 29568-29574.
- Cullen, B., Smith, R., Mulloch, E., Silcock, D., and Morrison, L. (2002). Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound Repair and Regeneration* **10**, 16-25.

- Curran, S., and Murray, G. I. (1999). Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* **189**, 300-8.
- Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., and Basilico, C. (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 233-47.
- Dasu, M. R., Barrow, R. E., Spies, M., and Herndon, D. N. (2003). Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts. *Burns* **29**, 527-31.
- Dierick, J. F., Kalume, D. E., Wenders, F., Salmon, M., Dieu, M., Raes, M., Roepstorff, P., and Toussaint, O. (2002). Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Lett* **531**, 499-504.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-7.
- Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* **366**, 1736-1743.
- Finch, P. W., and Rubin, J. S. (2004). Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair. *Adv Cancer Res* **91**, 69-136.
- Frippiat, C., Chen, Q. M., Zdanov, S., Magalhaes, J. P., Remacle, J., and Toussaint, O. (2001). Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* **276**, 2531-7.
- Frykberg, R. G. (2002). Diabetic foot ulcers: pathogenesis and management. *American Family Physician* **66**, 1655-1662.
- Gearing, A. J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J. M., Crimmin, M., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., and et al. (1995). Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha. *J Leukoc Biol* **57**, 774-7.
- Ghaffari, A., Li, Y., Karami, A., Ghaffari, M., Tredget, E. E., and Ghahary, A. (2006). Fibroblast extracellular matrix gene expression in response to keratinocyte-releasable stratifin. *J Cell Biochem* **98**, 383-93.
- Ghahary, A., Marcoux, Y., Karimi-Busheri, F., Li, Y., Tredget, E. E., Kilani, R. T., Lam, E., and Weinfeld, M. (2005). Differentiated keratinocyte-releasable stratifin (14-3-3 sigma) stimulates MMP-1 expression in dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* **124**, 170-7.
- Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W. G., and Quaranta, V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* **277**, 225-8.
- Gibbs, S., Pinto, A. N. S., Murli, S., Huber, M., Hohl, D., and Ponc, M. (2000). Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair and Regeneration* **8**.

- Gilchrest, B. A., Marshall, W. L., Karassik, R. L., Weinstein, R., and Maciag, T. (1984). Characterization and partial purification of keratinocyte growth factor from the hypothalamus. *J Cell Physiol* **120**, 377-83.
- Guo, L., Degenstein, L., and Fuchs, E. (1996). Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev* **10**, 165-75.
- Hakenjos, L. (2002). Molekularbiologische Charakterisierung der TGF-beta-abhängigen Zytokinproduktion und der Zellzykluskontrollgene bei der strahleninduzierten terminalen Differenzierung von interstitiellen Fibroblasten. Doktorarbeit, Hohenheim, Stuttgart.
- Hakenjos, L., Bamberg, M., and Rodemann, H. P. (2000). TGF-beta1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. *Int J Radiat Biol* **76**, 503-9.
- Harding, K. G., Moore, K., and Phillips, T. J. (2005). Wound chronicity and fibroblast senescence--implications for treatment. *Int Wound J* **2**, 364-8.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-60.
- Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621.
- Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D., and Sedivy, J. M. (2006). Cellular senescence in aging primates. *Science* **311**, 1257.
- Herskind, C., Bentzen, S. M., Overgaard, J., Overgaard, M., Bamberg, M., and Rodemann, H. P. (1998). Differentiation state of skin fibroblast cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *Radiother Oncol* **47**, 263-9.
- Herskind, C., and Rodemann, H. P. (2000). Spontaneous and radiation-induced differentiation of fibroblasts. *Exp Gerontol* **35**, 747-55.
- Heussen, C., and Dowdle, E. B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* **102**, 196-202.
- Hornebeck, W. (2003). Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol Biol (Paris)* **51**, 569-73.
- Jameson, J., Ugarte, K., Chen, N., Yachi, P., Fuchs, E., Boismenu, R., and Havran, W. L. (2002). A Role for Skin gamma delta T Cells in Wound Repair. *Science* **296**, 747-749.
- Kerkela, E., E., and Saarialho-Kere, U. (2003). Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* **12**, 109-25.
- Kheradmand, F., Rishi, K., and Werb, Z. (2002). Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. *J Cell Sci* **115**, 839-48.
- Khong, J. J., and Muecke, J. (2006). Complications of mitomycin C therapy in 100 eyes with ocular surface neoplasia. *Br J Ophthalmol* **90**, 819-22.
- Klees, R. F., Salaszyk, R. M., Kingsley, K., Williams, W. A., Boskey, A., and Plopper, G. E. (2005). Laminin-5 induces osteogenic gene expression in

- human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway. *Mol Biol Cell* **16**, 881-90.
- Krampert, M., Bloch, W., Sasaki, T., Bugnon, P., Rüllicke, T., Wolf, E., Aumailley, M., Parks, W. C., and Werner, S. (2004). Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin. *Mol Biol Cell* **15**, 5242-5254.
- Lafleur, M. A., Drew, A. F., de Sousa, E. L., Blick, T., Bills, M., Walker, E. C., Williams, E. D., Waltham, M., and Thompson, E. W. (2005). Upregulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer xenografts: a major induction of stromal MMP-13. *Int J Cancer* **114**, 544-54.
- Lam, S., van der Geest, R. N., Verhagen, N. A., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2004). Secretion of collagen type IV by human renal fibroblasts is increased by high glucose via a TGF-beta-independent pathway. *Nephrol Dial Transplant* **19**, 1694-701.
- Lobmann, R., Pap, T., Ambrosch, A., Waldmann, K., König, W., and Lehnert, H. (2006a). Differential effects of PDGF-BB on matrix metalloproteinases and cytokine release in fibroblasts of Type 2 diabetic patients and normal controls in vitro. *J Diabetes Complications* **20**, 105-12.
- Lobmann, R., Zemlin, C., Motzkau, M., Reschke, K., and Lehnert, H. (2006b). Expression of matrix metalloproteinases and growth factors in diabetic foot wounds treated with a protease absorbent dressing. *J Diabetes Complications* **20**, 329-35.
- Maas-Szabowski, N., Stark, H. J., and 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**, 1075-84.
- Madlener, M., Mauch, C., Conca, W., Brauchle, M., Parks, W. C., and Werner, S. (1996). Regulation of the expression of stromelysin-2 by growth factors in keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing. *Biochem J* **320 (Pt 2)**, 659-64.
- Mäkelä, M., Larjava, H., Pirilä, E., Maisi, P., Salo, T., Sorsa, T., and Uitto, V. J. (1999). Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratinocytes. *Exp Cell Res* **251**, 67-78.
- Martin, P. (1997). Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75-81.
- Miki, T., Bottaro, D. P., Fleming, T. P., Smith, C. L., Burgess, W. H., Chan, A. M., and Aaronson, S. A. (1992). Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 246-50.
- Millis, A. J., Hoyle, M., McCue, H. M., and Martini, H. (1992). Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Exp Cell Res* **201**, 373-9.
- Moon, S. E., Bhagavathula, N., and Varani, J. (2002). Keratinocyte stimulation of matrix metalloproteinase-1 production and proliferation in fibroblasts: regulation through mitogen-activated protein kinase signalling events. *Br J Cancer* **87**, 457-64.

- Moon, S. E., Dame, M. K., Remick, D. R., Elder, J. T., and Varani, J. (2001). Induction of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) during epidermal invasion of the stroma in human skin organ culture: keratinocyte stimulation of fibroblast MMP-1 production. *Br J Cancer* **85**, 1600-5.
- Morocutti, A., Earle, K. A., Rodemann, H. P., and Viberti, G. C. (1997). Premature cell ageing and evolution of diabetic nephropathy. *Diabetologia* **40**, 244-6.
- Morocutti, A., Earle, K. A., Sethi, M., Piras, G., Pal, K., Richards, D., Rodemann, H. P., and Viberti, G. C. (1996). Premature senescence of skin fibroblasts from insulin-dependent diabetic patients with kidney disease. *Kidney International* **50**, 250 - 256.
- Mott, J. D., and Werb, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 558-64.
- Moustafa, M., Simpson, C., Glover, M., Dawson, R. A., Tesfayet, S., Creagh, F. M., Haddow, D., Short, R., and Heller, S., MacNeil, S. (2004). A new autologous keratinocyte dressing treatment for non-healing diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes UK. Diabetic Medicine* **21**, 786-789.
- Ng, K. W., Khor, H. L., and Hutmacher, D. W. (2004). In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts. *Biomaterials* **25**, 2807-2818.
- Niu, J., Seshradi T Campisi, Chang, Z., S., Peng, B., A. J., Xia, Q., X. J., Lu, W., A., Huang, P., F., Tsao, M., and Chiao, P. (2007). Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappa b transcription factors. *J Biol Chem Epub ahead of print*.
- Nova, D., Le Griel, C., Holvoet, S., Gentilhomme, E., Vincent, C., Staquet, M. J., Schmitt, D., and Serres, M. (2003). Comparative studies on the secretion and activation of MMPs in two reconstructed human skin models using HaCaT- and HaCaT-ras-transfected cell lines. *Clin Exp Metastasis* **20**, 675-83.
- Ornitz, D. M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3005.
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G., and Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* **271**, 15292-7.
- Osanai, M., Tamaki, T., Yonekawa, M., Kawamura, A., and Sawada, N. (2002). Transient increase in telomerase activity of proliferating fibroblasts and endothelial cells in granulation tissue of the human skin. *Wound Repair Regen* **10**, 59-66.
- Parrinello, S., Coppe, J. P., Krtolica, A., and Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* **118**, 485-96.
- Philipp, K., Riedel, F., Sauerbier, M., Hormann, K., and Germann, G. (2004). Targeting TGF-beta in human keratinocytes and its potential role in wound healing. *Int J Mol Med* **14**, 589-93.
- Pilcher, B. K., Wang, M., Qin, X. J., Parks, W. C., Senior, R. M., and Welgus, H. G. (1999). Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous

- wound healing and allergic contact hypersensitivity. *Ann N Y Acad Sci* **878**, 12-24.
- Przybilski, M., Deb, R., Erdmann, D., and Germann, G. (2004). Aktuelle Trends in der Entwicklung von Hautersatzmaterialien. *Chirurg* **75**, 579-587.
- Putnins, E. E., Firth, J. D., and Uitto, V. J. (1995). Keratinocyte growth factor stimulation of gelatinase (matrix metalloproteinase-9) and plasminogen activator in histiotypic epithelial cell culture. *J Invest Dermatol* **104**, 989-94.
- Ravanti, L., and Kahari, V. M. (2000). Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med* **6**, 391-407.
- Rodemann, H. P. (1989). Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C (MMC)-induced postmitotic differentiation states in vitro. *Differentiation* **42**, 37-43.
- Rodemann, H. P. (1990). Degradation of individual intracellular proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and computerized video densitometry. *Electrophoresis* **11**, 228-31.
- Rodemann, H. P., ed. (1993). "Differential Gene Expression, Protein Synthesis, and Degradation in Aging Fibroblasts," pp. 1-272 - 277. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Rodemann, H. P., and Bamberg, M. (1995). Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* **35**, 83-90.
- Rodemann, H. P., and Bayreuther, K. (1984). Abnormal collagen metabolism in cultured skin fibroblasts from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5130-4.
- Rodemann, H. P., and Bayreuther, K. (1986). Differential degradation of [35S]methionine polypeptides in Duchenne muscular dystrophy skin fibroblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2086-90.
- Rodemann, H. P., Bayreuther, K., Francz, P. I., Dittmann, K., and Albiez, M. (1989). Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exp Cell Res* **180**, 84-93.
- Rodemann, H. P., Binder, A., Burger, A., Güven, N., Löffler, H., and Bamberg, M. (1996). The underlying cellular mechanisms of fibrosis. *Kidney Int* **49**, 32 - 36.
- Rodemann, H. P., and Müller, G. A. (1991). Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* **17**, 684-6.
- Rodemann, H. P., Peterson, H. P., Schwenke, K., and von Wangenheim, K. H. (1991). Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. *Scanning Microsc* **5**, 1135-42; discussion 1142-3.
- Saarialho-Kere, U. K. (1998). Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res* **290 Suppl**, S47-54.
- Saarialho-Kere, U. K., Pentland, A. P., Birkedal-Hansen, H., Parks, W. C., and Welgus, H. G. (1994). Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds. *J Clin Invest* **94**, 79-88.

- Sadowski, T., Dietrich, S., Koschinsky, F., Ludwig, A., Proksch, E., Titz, B., and Sedlacek, R. (2005). Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces epithelial cell migration. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 870-880.
- Sasaki, T., Fassler, R., and Hohenester, E. (2004). Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol* **164**, 959-63.
- Sato, T., Iwai, M., Sakai, T., Sato, H., Seiki, M., Mori, Y., and Ito, A. (1999). Enhancement of membrane-type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) production and sequential activation of progelatinase A on human squamous carcinoma cells co-cultured with human dermal fibroblasts. *Br J Cancer* **80**, 1137-43.
- Sawicki, G., Marcoux, Y., Sarkhosh, K., Tredget, E. E., and Ghahary, A. (2005). Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Mol Cell Biochem* **269**, 209-16.
- Schneider, H., Muhle, C., and Pacho, F. (2006). Biological function of laminin-5 and pathogenic impact on its deficiency. *Eur J Cell Biol* **Epub ahead of print**.
- Schoop, V. M., Mirancea, N., and Fusenig, N. E. (1999). Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* **112**, 343-53.
- Senet, P., Bon, F. X., Benbunan, M., Bussel, A., Traineau, R., Calvo, F., Dubertret, L., and Dosquet, C. (2003). Randomized trial and local biological effect of autologous platelets used as adjuvant therapy for chronic venous leg ulcers. *J Vasc Surg* **38**, 1342-8.
- Shin, E. Y., Ma, E. K., Kim, C. K., Kwak, S. J., and Kim, E. G. (2002). Src/ERK but not phospholipase D is involved in keratinocyte growth factor-stimulated secretion of matrix metalloprotease-9 and urokinase-type plasminogen activator in SNU-16 human stomach cancer cell. *J Cancer Res Clin Oncol* **128**, 596-602.
- Singer, A. J., and Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine* **341**, 738-746.
- Slade, N., Pavelic, J., Kurslin, B., and Pavelic, K. (1995). Type IV collagenase in squamous cell and basal cell skin carcinomas. *Arch Dermatol Res* **287**, 512-4.
- Smola, H., Eming, S. A., Hess, S., Werner, S., and Krieg, T., Seshradi (2001). Wundheilung und Wundheilungsstörungen. *Deutsches Ärzteblatt* **98**, 2802-2809.
- Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S., and Liotta, L. A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 541-573.
- Tang, A., and Gilchrest, B. A. (1996). Regulation of keratinocyte growth factor gene expression in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* **11**, 41-50.
- Tarlton, J. F., Vickery, C. J., Leaper, D. J., and Bailey, A. J. (1997). Postsurgical wound progression monitored by temporal changes in the expression of matrix metalloproteinase-9. *Br J Dermatol* **137**, 506-16.

- Taylor, K. R., Rudisill, J. A., and Gallo, R. L. (2005). Structural and Sequence Motifs in Dermatan Sulfate for Promoting Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) and FGF-7 Activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 5300-5306.
- Toussaint, O., Medrano, E. E., and von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* **35**, 927-45.
- Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J. F., Pascal, T., Fripiat, C., Royer, V., Magalhães, J. P., Zdanov, S., and Chainiaux, F. (2002). Stress-induced premature senescence: from biomarkers to likelihood of in vivo occurrence. *Biogerontology* **3**, 13-7.
- Tran, K. T., Griffith, L., and Wells, A. (2004). Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing. *Wound Repair and Regeneration* **12**, 262-268.
- Vachon, D. J., and Yager, D. R. (2006). Novel sulfonated hydrogel composite with the ability to inhibit proteases and bacterial growth. *J Biomed Mater Res A* **76**, 35-43.
- Vande Berg, J. S., Rose, M. A., Haywood-Reid, P. L., Rudolph, R., Payne, W. G., and Robson, M. C. (2005). Cultured pressure ulcer fibroblasts show replicative senescence with elevated production of plasmin, plasminogen activator inhibitor-1, and transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen* **13**, 76-83.
- von Meyersbach, H. (1976). "Spezielle Histologie," Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F., and Jackson, S. P. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* **126**, 111-7.
- Wall, S. J., Sampson, M. J., Levell, N., and Murphy, G. (2003). Elevated matrix metalloproteinase-2 and -3 production from human diabetic dermal fibroblasts. *Br J Dermatol* **149**, 13-6.
- Welt, K., Gall, N., Sindrilaru, A., and Scharffetter-Kochanek, K. (2005). Pathogenese des chronisch-venösen Ulcus cruris. *Phlebologie* **34**, 81-86.
- Werner, S., Breiden, M., Hubner, G., Greenhalgh, D., and Longaker, M. (1994). Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Invest Dermatol* **103**, 469-473.
- Werner, S., and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* **83**, 835-70.
- Xu, W. (2007). Zu veröffentlichende Promotion. Universität Tübingen.
- Yager, D. R., and Nwomeh, B. C. (1999). The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen* **7**, 433-41.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* **14**, 163-76.
- Zeigler, M. E., Chi, Y., Schmidt, T., and Varani, J. (1999). Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production

in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol* **180**, 271-84.

Zeigler, M. E., Dutcheshen, N. T., Gibbs, D. F., and Varani, J. (1996a). Growth factor-induced epidermal invasion of the dermis in human skin organ culture: expression and role of matrix metalloproteinases. *Invasion Metastasis* **16**, 11-8.

Zeigler, M. E., Krause, S., Karmioli, S., and Varani, J. (1996b). Growth factor-induced epidermal invasion of the dermis in human skin organ culture: dermal invasion correlated with epithelial cell motility. *Invasion Metastasis* **16**, 3-10.

Abbildungen:

[1] <http://www.environmentaloncology.org/img/skin-lg.gif>

[2] <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/fig004den.gif>

7 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Sonja Veronika Nolte

Geboren am 23.09.1978 in Stuttgart

Schulische Ausbildung

- 1985 – 1988 Flattichschule Münchingen
1988 – 1990 Gymnasium Korntal-Münchingen
1991 – 1998 Gymnasium Renningen,
Abschluss: Abitur

Studium und Doktorarbeit

- 1998 – 2004 Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim
2001 Vordiplom
2003 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie bei Prof. Dr. J. Rassow zum Thema: „Untersuchungen zur mitochondrialen Lokalisation und Translokation des PorB von *Neisseria gonorrhoeae* *in vivo* und *in vitro*“
2004 Diplom (Fachrichtung Agrarbiotechnologie mit den Vertiefungsfächern Biotechnologie bei Tieren, Mikrobiologie und Virologie)
2004 – 2007 Dissertation zum Dr.rer.nat. an der Radioonkologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen, Sektion Strahlenbiologie und molekulare Umweltforschung bei Prof. Dr. H.P. Rodemann zum Thema: „Expression von Wundheilungs-assoziierten Proteinen durch Progenitor-fibroblasten und terminal differenzierte Funktionsfibrozyten“