

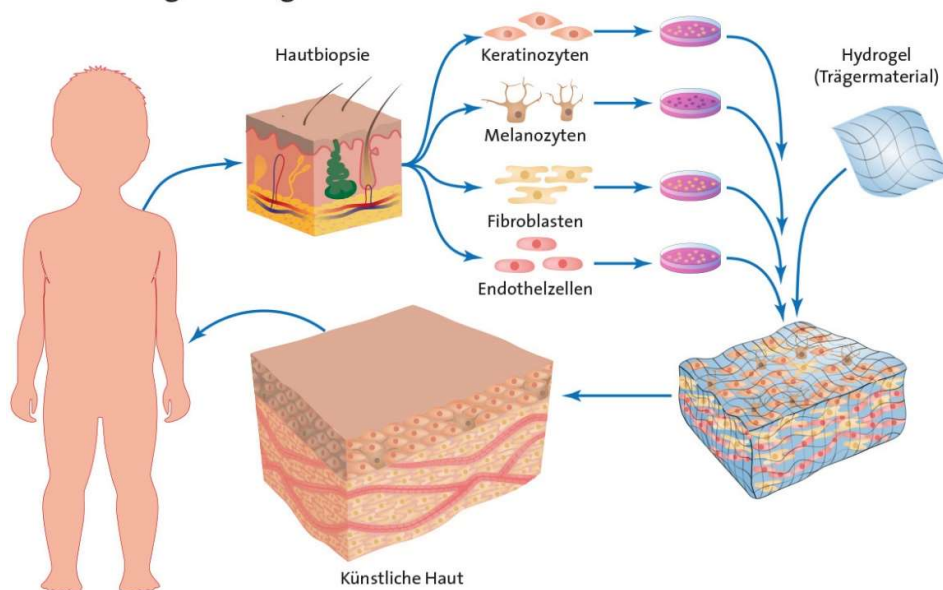


**Kantonsschule
Uetikon am See**

Maturitätsarbeit

Einführung von Retezapfen in einen menschlichen dermo-epidermalen Hautsubstitut

Tissue Engineering der Haut



Autorin:

Sophie von Wartburg

Oktober 2022

Betreuungsperson:

Aline Widmer

Abstract

Die Haut ist das grösste Organ des Menschen und übernimmt verschiedene überlebenswichtige Funktionen. Einerseits schützt sie uns vor äusseren Einflüssen und andererseits ermöglicht sie uns, mit der Umwelt zu interagieren. Bei hochgradigen, grossflächigen Verletzungen der Haut muss die Wunde mit einem Hauttransplantat bedeckt werden. Heute ist es möglich, im Labor aus wenigen Zellen des Patienten ein autologes dermo-epidermales Hautsubstitut zu züchten.

Die Retezapfen vergrössern die dermo-epidermale Kontaktfläche, was eine stärkere Haftung der Epidermis an der Dermis sowie eine erhöhte mechanische Widerstandsfähigkeit der dermo-epidermalen Junktionszone zur Folge hat. Das übergeordnete Forschungsziel ist herauszufinden, ob ein Hautsubstitut mit eingeführten Retezapfen mechanisch stabiler ist, als ein Hautsubstitut bei welchem die Retezapfen fehlen. Um dieses übergeordnete Forschungsziel zu beantworten, muss zuerst das Teilziel erreicht werden, die Retezapfen überhaupt in ein Hautsubstitut einzuführen. In dieser Maturitätsarbeit werden erste Versuche gestartet, dieses erste Teilziel zu erreichen.

Um die Retezapfen in das dermo-epidermale Hautsubstitut einzuführen, wurde ein Teilschritt bei der Herstellung des Substitutes verändert. In besagtem Teilschritt wird das Kollagen-Hydrogel mittels eines Stempels plastisch komprimiert. In diesem Versuch wurde der bisherige Stempel durch einen modifizierten Stempel ersetzt, welcher eine Wellenstruktur in das Kollagen einprägen soll. Dadurch wollte man im Kollagen den Negativabdruck der Wellenstruktur der Stempelunterseite einprägen.

Das Resultat der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigt, dass in den Substituten keine retezapfenähnliche Strukturen vorhanden sind. Wir glauben, dass das Kollagen-Hydrogel bereits vor dem Kompressionsschritt zu kompakt war und gleichzeitig die Zapfen in der Stempelunterseite zu eng nebeneinander lagen, weshalb die Zapfen nicht in das Kollagengel eindringen konnten. Weitere Versuche müssen durchgeführt werden, um dieses Problem zu lösen. Schlussendlich muss bewiesen werden können, dass ein Hautsubstitut mit Retezapfen mechanisch stabiler ist als ein Hautsubstitut ohne, damit diese neue Technik Anwendung in der klinischen Praxis finden wird.

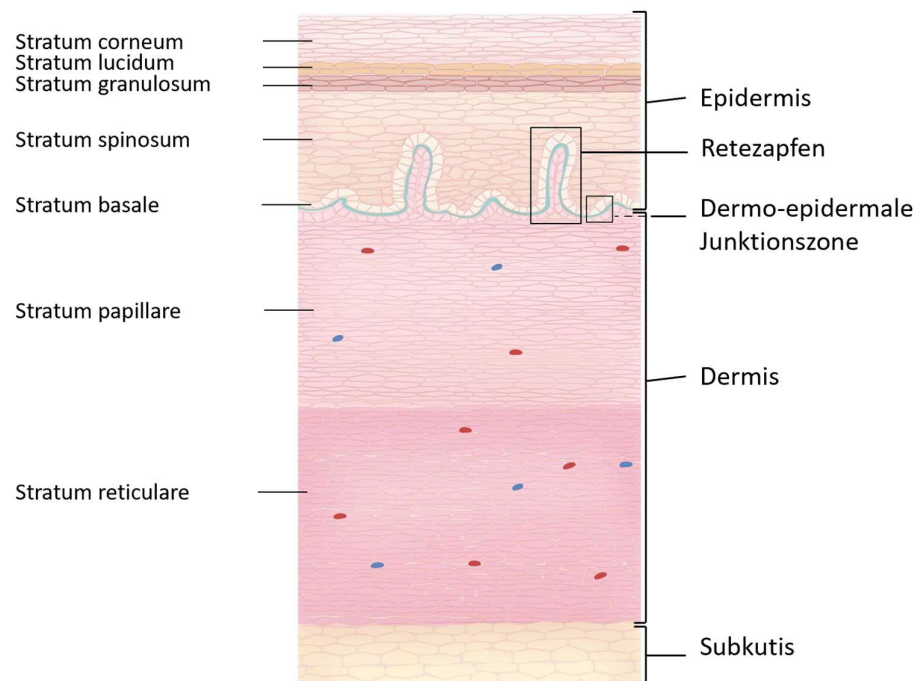
| | |
|--|----|
| 1 Einleitung | 3 |
| 1.1. Anatomie und Struktur der menschlichen Haut..... | 3 |
| 1.1.1. Epidermis | 3 |
| 1.1.2. Dermo-epidermale Junktionszone | 4 |
| 1.1.3. Dermis | 5 |
| 1.1.4. Subkutis..... | 5 |
| 1.2. Hauttransplantation | 5 |
| 1.2.1. Geschichte und aktueller Stand der Technik | 5 |
| 2 Fragestellung, Material und Methoden | 7 |
| 2.1. Problemstellung | 7 |
| 2.2. Fragestellung | 7 |
| 2.3. Material | 7 |
| 2.3.1. Menschliche Hautproben (Biopsien)..... | 7 |
| 2.3.2. Reagenzien, Lösungen, Medien und Antikörper | 7 |
| 2.4. Methodik | 10 |
| 2.4.1. Zellisolation aus der menschlichen Haut | 10 |
| 2.4.1.1. Fibroblasten | 10 |
| 2.4.1.2. Keratinozyten | 10 |
| 2.4.1.3. Mediumwechsel und Waschvorgang | 11 |
| 2.4.1.4. Zellen passagieren..... | 11 |
| 2.4.2. Herstellung der Hautsubstitute (3D Kollagen-Hydrogele)..... | 12 |
| 2.4.2.1. Dermale Komponente | 12 |
| 2.4.2.2. Die plastische Kompression | 13 |
| 2.4.2.3. Die epidermale Komponente | 14 |
| 2.4.3. Kryostatschnitte und Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 15 |
| 2.4.9. Antikörperfärbung | 15 |
| 2.4.10. Mikroskopie | 16 |
| 3 Resultate | 17 |
| 3.1. Isolation und Wachstum der Zellen in Kultur | 17 |
| 3.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 18 |
| 3.3. Antikörperfärbung..... | 20 |
| 4 Diskussion und Ausblick..... | 22 |
| 4.1. Diskussion..... | 22 |
| 4.2. Ausblick | 23 |
| Danksagung | 24 |
| Literaturverzeichnis | 25 |
| Anhang..... | 27 |

1 Einleitung

1.1. Anatomie und Struktur der menschlichen Haut

Das grösste Organ unseres Körpers ist die Haut. Sie schützt unseren Körper vor physikalischen, chemischen und biologischen Einflüssen, sowie vor der UV-Strahlung. Ist die Haut dem Sonnenlicht ausgesetzt, ist sie in der Lage, das für die Kalziumaufnahme und Muskulatur essenzielle Vitamin D3 zu synthetisieren. Neben ihrer Funktion als Schutzbarriere vor Umwelteinflüssen ermöglicht die Haut uns dank ihrer Mechanosensoren mit der Aussenwelt zu interagieren. Darüber hinaus spielt sie eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Wasserhaushalts und der Thermoregulation [1;2;3].

Aufgebaut ist die Haut aus drei Schichten: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut) (Fig.1).



FIGUR 1: HISTOLOGISCHE EINTEILUNG DER HAUT. STRATUM LUCIDUM IST NUR IN DER LEISTENHAUT ERKENNBAR UND DESHALB FÜR DIESE ARBEIT IRRELEVANT, DOCH ZUR VOLLSTÄNDIGKEIT IST SIE IN DER DARSTELLUNG GEKENNZEICHNET.

QUELLE: IN ANLEHNUNG AN AMBOSS, «HAUT UND HAUTANHANGSGEBILDE» (2022)

1.1.1. Epidermis

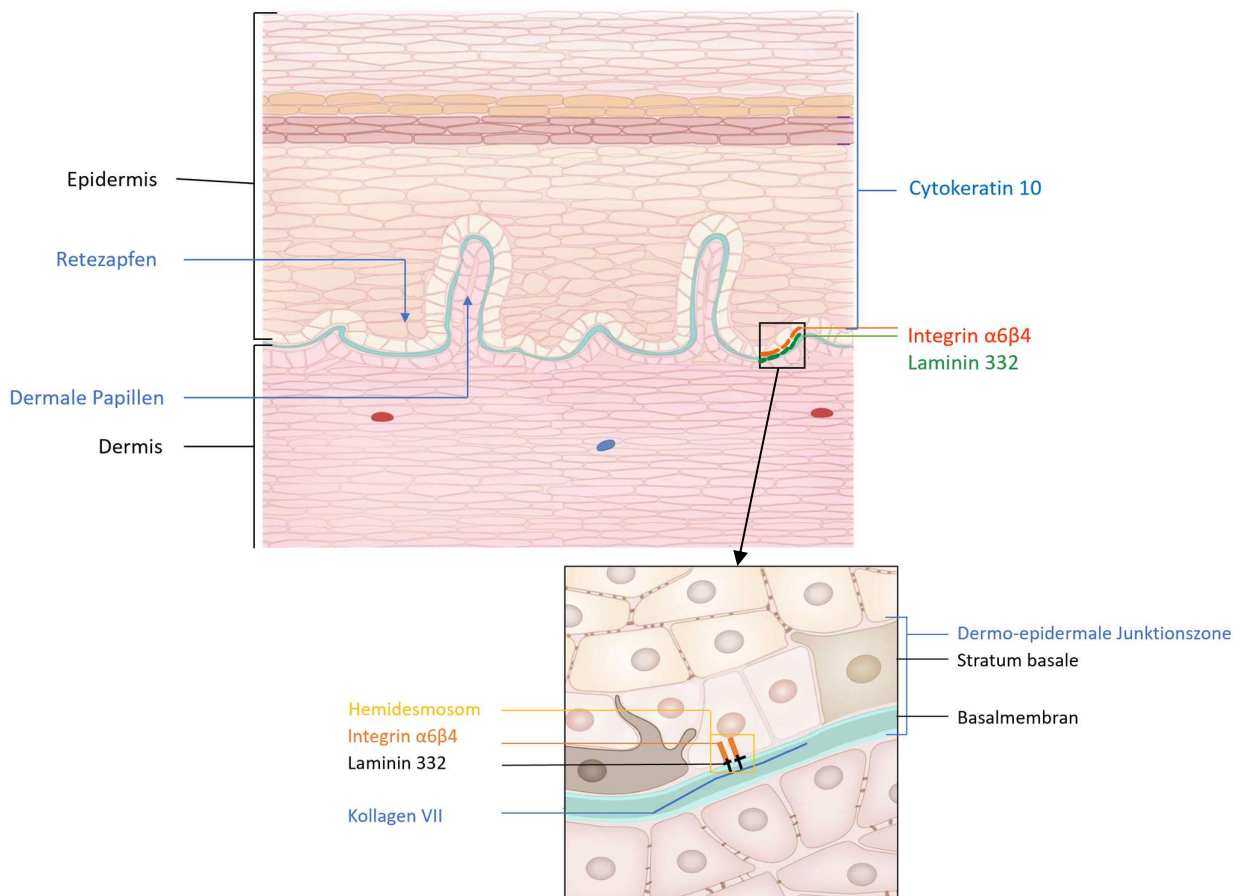
Die Epidermis ist die äusserste Epithelschicht und besteht hauptsächlich aus Keratinozyten (Prozentualer Anteil etwa 90%). Innerhalb der Epidermis werden vier verschiedenen Schichten (Strata) unterschieden, welche durch den Differenzierungsgrad der Keratinozyten bestimmt werden: das Stratum basale, das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum. Einige Keratinozyten sind unipotente Stammzellen, die sich im Laufe ihres Lebens selbst erneuern und Tochterzellen hervorbringen, die die verschiedenen Differenzierungsgrade durchlaufen. Die Schichten weisen histologische, morphologische und biochemische Unterschiede auf [2;4].

Von innen nach aussen bestehen die drei ersten Schichten (Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum) aus metabolisch aktiven Zellen. Die Fähigkeit zu proliferieren und dementsprechend Mitose zu betreiben, nimmt im Menschen von innen nach aussen ab, sodass im Stratum granulosum kaum mehr Proliferation stattfindet. Die Keratinozyten in der Basalschicht werden Basalzellen genannt, im Gegensatz zu den andern die als suprabasal bezeichnet werden. Beide können die Epidermis vollständig regenerieren, obwohl basale Zellen weniger differenziert und deswegen effizienter sind [5].

Die basalen Zellen durchlaufen auf ihrem Differenzierungsweg die verschiedenen Schichten der Epidermis. Die terminale Keratinisierung führt schliesslich zum Zelltod und zur Verhornung der äussersten Hautschicht (Stratum corneum). Die

Zeitspanne zwischen Mitose in der Basalzellschicht und dem Ablösen der terminal ausdifferenzierten Hautschuppen beträgt etwa einen Monat [6]. Die Keratinozyten im Stratum granulosum werden durch ein Protein namens Involucrin miteinander vernetzt, wodurch den Zellen strukturelle Unterstützung gegeben sowie das Eindringen der Krankheitserreger erschwert wird. Zusätzlich sind Keratinozyten im Stratum granulosum durch sogenannte Tight Junctions miteinander verbunden. Tight Junctions sind Zellverbindungen, welche den Zwischenzellraum verschliessen und als Diffusionsbarriere wirken. So wird verhindert, dass unkontrolliert Stoffe von der Aussenwelt in den Körper oder umgekehrt diffundieren. Da es sehr wichtig ist, diese Diffusionsbarriere aufrecht zu erhalten, muss die Epidermis mechanisch sehr stabil sein. Deshalb synthetisieren alle Keratinozyten, unbeachtet zu welchem Stratum sie gehören, das Cytokeratin 10, welches ein Protein ist, das an der Bildung der intrazellulären Filamente beteiligt und ein Teil des Zytoskelettes ist. Durch die Bildung von interzellulären Adhäsionskomplexe sind die Zytoskelette aller Zellen der Haut miteinander verbunden [7;8].

Die Funktion der Epidermis liegt zusammengefasst darin, die Aussenwelt vom Körperinneren zu trennen.



FIGUR 2: DARSTELLUNG DER HISTOLOGISCHEN EINTEILUNG DER HAUT. EINGEZEICHNET SIND PROTEINE, DIE IN DER NATÜRLICHEN HAUT VORKOMMEN, UND WELCHE FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG RELEVANT WERDEN (SIEHE KAPITEL 2.4.9.)

QUELLE: IN ANLEHNUNG AN AMBOSS «HAUT UND HAUTANHANGSGEBILDE»

1.1.2. Dermo-epidermale Junktionszone

Die Dermo-epidermale Junktionszone ist der Gewebereich der Haut, in welchem die Epidermis und die Dermis aneinandergrenzen (Fig. 2, Vergrößerungskasten). Oberhalb dieser Grenzzone befindet sich die Epidermis und unterhalb die Dermis. Die Basalzellen der Epidermis, der Stratum Basale, zählen ebenfalls zu der dermo-epidermalen Junktionszone und bilden deren obere Schicht. Die Basalzellen sind durch die Hemidesmosomen in die Basalmembran, welche die untere Schicht der dermo-epidermalen Junktionszone bildet, verankert. Die Hemidesmosomen sind Proteinkomplexe bestehend aus hauptsächlich zwei Hauptkomponenten, dem Laminin 332 und dem Integrin $\alpha6\beta4$. Ersteres ist Bestandteil der

Basalmembran, letzteres ist das Gegenstück zum Laminin 332 und wird von den Basalzellen der Stratum basale exprimiert. Diese beiden erwähnten Proteine werden zu einem späteren Zeitpunkt bei der Immunfluoreszenzfärbung noch wichtig werden [2].

Die Basalmembran besteht aus Kollagen IV und anderen Komponenten wie beispielsweise dem Kollagen VII, welches von den Fibroblasten der Dermis sekretiert wird. Diese sind für diese Maturaarbeit nicht relevant, weshalb nicht weiter auf diese eingegangen wird.

In einem Querschnitt der Haut ist die Basalschicht als wellenförmige, gezackte Struktur zu erkennen. Diese Wellen haben den Namen Retezapfen. Die Retezapfen vergrössern die Oberfläche der Basalmembran. Folglich nimmt die Anzahl Hemidesmosomen zwischen den beiden Hautschichten zu, was die mechanische Widerstandsfähigkeit der dermo-epidermalen Junktionszone erhöht. Gleichzeitig begünstigt eine grosse Oberfläche die Diffusion der Nährstoffe aus der durchbluteten Dermis in die nicht-durchblutete Epidermis [2;9].

1.1.3. Dermis

Die Dermis befindet sich zwischen Epidermis (Oberhaut) und Subkutis (Unterhaut). Die Dermis besteht hauptsächlich aus Bindegewebe und kann in zwei Schichten gegliedert werden: die obere Papillarschicht (Stratum papillare) und die darunterliegende Netzsicht (Stratum reticulare). Zwischen den beiden Schichten gibt es einen fließenden Übergang. Die Papillarschicht hat ihren Namen aufgrund der Papillen, kleinen Vorsprüngen, die nach oben zwischen die epidermalen Retezapfen ragen. Sie ist überlebenswichtig für die darüberliegende Epidermis, da sie diese mit Nährstoffen versorgt.

Die Papillarschicht ist überlebenswichtig für die über ihr liegende Epidermis, da sie diese mit Nährstoffen versorgt und deren Abfallprodukte entsorgt. Zudem sind in der Papillarschicht neuronale Zellen (Tast- und Vibrationswahrnehmung) zu finden [3].

In der Netzsicht befinden sich Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen. Talgdrüsen sekretieren Fetttröpfchen, welche die Haut geschmeidig halten und ihr Austrocknen verhindern.

Wie in der Epidermis die Keratinozyten, so sind in der Dermis die Fibroblasten die wichtigsten und am häufigsten vorhandenen Zelltypen. Die Fibroblasten synthetisieren unter anderem das Kollagen, welches den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ausmacht. Kollagenfasern sind für die Stabilität und Reissfestigkeit der Haut verantwortlich [3;10].

1.1.4. Subkutis

Die Subkutis, oder auch Unterhaut, speichert Fett und kann den Körper mit Energie versorgen. Dieses Gewebe besteht hauptsächlich aus Fettzellen (Lipozyten) und Blutgefässen. Die Subkutis zählt zu den endokrinen Organen, denn die Lipozyten produzieren das Hormon Leptin, welches das Hungergefühl hemmt und dem Gehirn signalisiert, dass vorerst keine weitere Nahrung mehr aufgenommen werden muss. Durch das fetthaltige Gewebe hilft die Subkutis auch der Wärmeisolation. Die Dicke dieser Schicht hängt von verschiedenen Faktoren wie zum Beispiel dem Geschlecht oder dem geographischen Wohnsitz ab [3; 11].

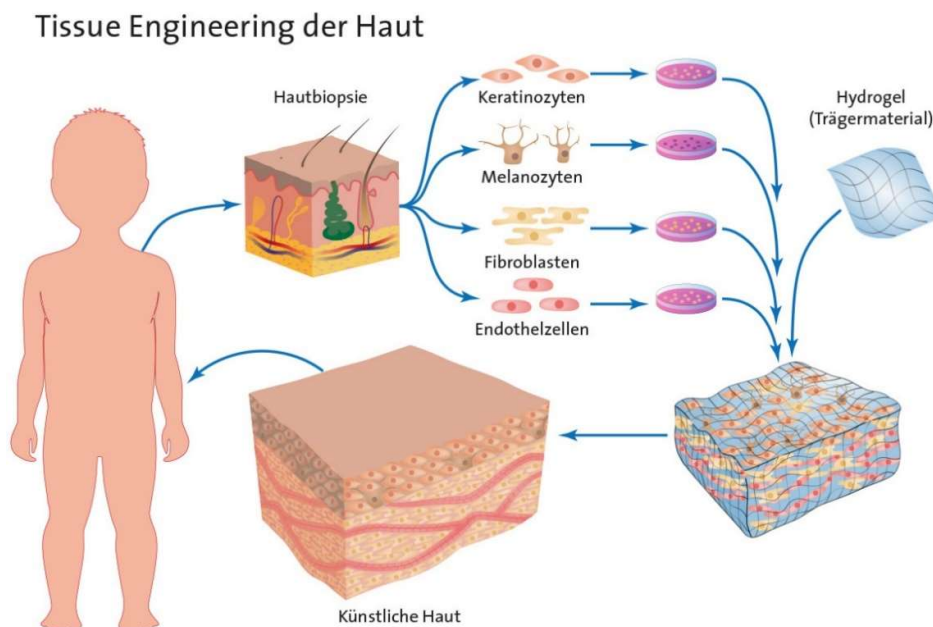
1.2. Hauttransplantation

1.2.1. Geschichte und aktueller Stand der Technik

Unfälle oder chronische Belastungen können zu Läsionen in der Haut führen. Je nach Ausmass der Verletzung kann sich die Haut autonom durch primäre oder sekundäre Wundheilung wiederherstellen. Bei grösseren und tieferen Wunden ist der Heilungsprozess beeinträchtigt und die Wahrscheinlichkeit der Narbenbildung steigt [12]. Die heutigen Standardformen zur Unterstützung dieser Wundheilungen sind Spalt- und Vollhauttransplantationen. Ein Spalthauttransplantat besteht aus der gesamten Epidermis und einem variablen Teil, meistens ein Drittel, der Dermis. Der Vorteil des Spalthauttransplantats ist, dass nur eine oberflächliche Sekundärwunde, welche nicht gedeckt werden muss, in der Spenderregion entsteht. Dementsprechend können grosse Transplantate entnommen werden, welche aufgrund ihrer geringen Dicke eine hohe Anheilungstendenz haben. Spalthauttransplantate führen jedoch zu Wundkontraktion, Narbenbildung und Pigmentunregelmässigkeiten [13].

Ein Vollhauttransplantat ist ein Transplantat, welches die Epidermis und die gesamte Dermis umfasst. Die Verwendung eines Vollhauttransplantats hat verschiedene Vorteile, wie verbesserte kosmetische Ergebnisse, einschliesslich Textur, Farbe und Haarwuchspotenzial sowie die Einschränkung der Kontraktur der primären Wunde. Vollhauttransplantate haben aber auch ihre Grenzen. Die Spenderregion des Vollhauttransplantats muss primär verschlossen werden können (zunähen), wodurch die maximale Grösse eines Vollhauttransplantats stark reduziert wird. Angewendet wird diese Wundbehandlung nur an Körperstellen, die hohen Belastungen ausgesetzt sowie kosmetisch relevant sind wie dem Gesicht oder den Händen [13].

Der Nachteil bei beiden Methoden ist, dass durch das Entnehmen des Hauttransplantats von der Spenderregion neben der eigentlichen Verletzung eine sekundäre Wunde geschaffen wird. Bei Brandunfällen kann zudem sein, dass bis 80-90% der Haut verbrannt sind, wodurch zu wenig Spenderregion zur Verfügung steht. An der Lösung dieses Problems arbeiten Forschern seit Jahrzehnten. Eine neue Ära öffnete sich, als vor etwa vierzig Jahren die beiden Forscher J.G. Rheinwald und H. Green erstmals Keratinozyten im Labor züchteten und die ersten epidermalen autologen Hautsubstitute anwenden konnten [14]. Doch ein epidermales Hautsubstitut ersetzt nur die Epidermis und ist deshalb nur für die Deckung oberflächlicher Hautdefekte geeignet. Bei tieferen Wunden ist auch die Dermis verletzt, weshalb ein Transplantat benötigt wird, welches Epidermis und Dermis ersetzen kann. In den frühen 1990ern wurde ein autologes dermo-epidermales Hautsubstitut erstmal vom Forscher J.F. Hansbrouht kultiviert [15]. Dreissig Jahre später, im Jahr 2019, konnte die Tissue Biology Research Unit (TBRU) des Kinderspitals Zürich in einer klinischen Studie Phase 1 zeigen, dass durch Verwendung eines *in vitro* biotechnisch hergestellten, autologen dermo-epidermalen Hautsubstituts verbesserte funktionelle und ästhetische Langzeitergebnisse bei der Behandlung eines Patienten mit Brandverletzung erzielt werden können [3;16].



FIGUR 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AUS KÖRPEREIGENEN ZELLEN KÜNSTLICH ERZEUGTEN HAUT
 QUELLE: SCIENTIFICA, ZÜRCHER WISSENSCHAFTSTAGE « TISSUE ENGINEERING AM KINDERSPITAL ZÜRICH» (2021)

2 Fragestellung, Material und Methoden

2.1. Problemstellung

Wie vorher erwähnt, besteht die dermo-epidermale Junktionszone aus den Basalzellen der Epidermis und der Basalmembran (siehe Kapitel 1.1.2.).

Die Komponenten der dermo-epidermalen Junktionszone werden zwar in den *in vitro* gezüchteten Hautsubstituten hergestellt, doch ordnen sich die Zellen nicht autonom zu den Retezapfen an, wie es in der natürlichen Haut während der Embryonalentwicklung geschieht. Wie bereits erklärt, vergrössern die Retezapfen die dermo-epidermale Kontaktfläche, was eine stärkere Haftung der Epidermis an der Dermis, sowie eine erhöhte mechanische Widerstandsfähigkeit der dermo-epidermalen Junktionszone zur Folge hat. Das Fehlen der Retezapfen könnte die relative Fragilität der Substitute erklären.

2.2. Fragestellung

Das übergeordnete Forschungsziel ist herauszufinden, ob ein Hautsubstitut mit eingeführten Retezapfen mechanisch stabiler ist, als ein Hautsubstitut bei welchem die Retezapfen fehlen. Um dieses übergeordnete Forschungsziel zu beantworten, muss zuerst das Teilziel erreicht werden, die Retezapfen überhaupt in ein Hautsubstitut einzuführen. In dieser Maturitätsarbeit werden erste Versuche gestartet, dieses erste Teilziel zu erreichen.

Zu diesem Zweck werden im Rahmen dieser Arbeit normale Hautsubstitute mit flacher dermo-epidermalen Junktionszone, verglichen mit Hautsubstituten, bei denen durch ein abgeändertes Verfahren eine wellenartige Struktur eingeführt wird.

2.3. Material

2.3.1. Menschliche Hautproben (Biopsien)

Die für diese Arbeit verwendeten Vorhautproben stammten von Vorhautbiopsien von Jungen im Alter von null bis sechs Jahren, die in der Abteilung für Urologie des Kinderspitals Zürich entnommen wurden. Die Vorhaut wurde nicht extra für diese Arbeit abgeschnitten, sondern auf Wunsch der Eltern im Rahmen von medizinisch oder religiös bedingten Zirkumzisionen. Vor der Beschneidung wurde die Erlaubnis der Eltern eingeholt, die Vorhaut ihres Kindes für die Forschung verwenden zu dürfen. Transportiert und aufbewahrt wurden die Biopsien im Transportmedium (siehe Tabelle 2). Die Zeitspanne zwischen Operation und Verwendung im Labor beträgt maximal fünf Tage. Alle Experimente wurden nach der Deklaration von Helsinki durchgeführt und vom Zürcher Ethikkomitee bewilligt.

2.3.2. Reagenzien, Lösungen, Medien und Antikörper

In der Tabelle 1 sind alle Reagenzien und Lösungen aufgelistet, die für diese Arbeit gebraucht wurden. Tabelle 2 listet alle für diese Arbeit verwendeten Zellkulturmedien auf. Alle für die Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 aufgelistet.

TABELLE 1: REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

| Name | Abkürzung | Konzentration | Aufgabe/Wirkung |
|--------------------------------------|------------|--|--|
| Collagenase Abiel | Abiel | 350ug/ml | Verdaut in Dermis vorhandenes Kollagen 1, Isolation der Fibroblasten |
| Dispase | - | 5'000 Caseinolytic Units | Verdaut das in der Basalmembran vorhandene Kollagen IV |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline | PBS | 1x | Waschlösung der Keratinozyten |
| Ethanol | - | 70% | Desinfizierung der Arbeitsmaterialien |
| Gentamicin Lösung | - | 10 mg/ml in deionisiertem Wasser | Antibiotikum, in allen (Nähr-)Medien vorhanden |
| Hank's Balanced Salt Solution | HBSS | - | Waschlösung für Fibroblasten (enthält Kalzium und Magnesium) |
| HEPES Buffer Solution (1M) | - | 1M | In RGM, stärkerer Buffer als PBS |
| Paraformaldehyde | PFA | 4% | Für Gewebefixierung |
| Fetal Bovine Serum | FBS | 10% | Komponente des Fibroblastennährmediums |
| Type-1 acid soluble collagen | Collagen-1 | 5 mg/ml Kollagen 0.017 N Essigsäure | Für Herstellung der Hydrogele, Hauptkomponente der Dermis |
| Bovin Serum Albumin Solution | BSA | 2% | Blockierungspuffer (Buffer) während der Antikörperfärbungen |
| Collagen neutralization buffer | CV Buffer | 0.32 M NaHCO ₃ 0.15 M NaOH 200 mM HEPES | Die Neutralisierung bewirkt die Gelierung des Kollagens 1. |
| Trypsin-EDTA-Lösung | T/E | 0.5% (10x konzentriert) | Löst Zellen von der Flaschenwand -> für Passagieren |
| Soy-bean Trypsin inhibitor solution | SBTI | 4 mg/ml (10x konzentriert) | Hemmt die Trypsinaktivität |

QUELLE: EIGENE TABELLE

TABELLE 2: ZELLKULTURMEDIEN

| Name | Abkürzung | Inhaltsstoffe | Aufgabe |
|----------------------------------|-----------|---|------------------------------|
| CellnTec 57 | CT57 | <u>Basalmedium:</u> + BPE (<i>Keratinozytennährstoffe</i>) <u>Ergänzt mit:</u> + EGF (<i>Wachstumsfaktor für Keratinozyten</i>) | Nährmedium für Keratinozyten |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium | DMEM+++ | <u>Basalmedium:</u> +FBS (<i>Fibroblastennährstoffe</i>) <u>Ergänzt mit:</u> +PenStrep (<i>Antibiotikum</i>) +HEPES (<i>Puffer</i>) | Nährmedium für Fibroblasten |

| | | | |
|---------------------------|-----|--|--|
| Reinwald and Green Medium | RGM | <p><u>Basalmedium:</u> +DMEM+++ (Nährmedium Fibroblasten)</p> <p><u>Ergänzt mit:</u> +Ham's F-12 (Nährstoffmix für Zellen) +FCS (Serum, Zellwachstum) +Insulin (Stimuliert Aufnahme von Glukose und Aminosäuren) +Hydrocortisone (Erhält Proliferationsrate aufrecht) +Adenine (Stimuliert Zellwachstum) +Triiodthyronine (Reguliert Stoffwechselfunktionen, Zellwachstum, Differenzierung) +Choleratoxin (Bildet Membrankanäle (damit Adenin in die Zelle eindringen kann)) +Gentamicin (Antibiotikum) +EGF (Wachstumsfaktor für Keratinozyten)</p> | Medium für die Gele, enthält Nährstoffe für Keratinozyten und Fibroblasten |
| Transportmedium | | <p><u>Basalmedium:</u> DMEM 500 ml (Nährmedium)</p> <p><u>Ergänzt mit:</u> + 0.75 ml Genta (Gentamicin = Antibiotikum) +15 ml Anti-Anti (Penicillin und Streptomycin = Antibiotika)</p> | Transportmedium in welchen die Vorhautbiopsien transportiert und aufbewahrt wurden |

QUELLE: EIGENE TABELLE

TABELLE 3: ANTIKÖRPER

| Primärer Antikörper | Antikörperklasse | Wirt | Konzentration | Klon | Firma, Land | Bindet an Protein |
|---------------------------------------|------------------|-------|---------------|------------|-------------------------|-------------------------------|
| Anti-Cytokeratin 10 | IgG1 | Maus | 1:100 | DE-K10 | Dako, CH | Cytokeratin 10 |
| Anti-Cytokeratin 19 | IgG | Maus | 1:100 | RCK108 | Dako, CH | Cytokeratin 19 |
| Anti-Involucrin (Anti-IVL) | IgG | Maus | 1:100 | SY5 | P.H.Stehelin&CIE AG, CH | Involucrin |
| Anti-Laminin 5 | IgG1 | Maus | 1:100 | P3H9-2 | Labforce AG, CH | Laminin 332 |
| CD104 (Integrin β 4) Antikörper | IgG1 | Ratte | 1:300 | 7/CD104 | BD Pharmingen, CH | Integrin α 6 β 4 |
| Sekundärer Antikörper | Antikörperklasse | Wirt | Konzentration | Klon | Firma, Land | Farbe |
| do-anti-ms-A488 (donkey-anti-mouse) | IgG | Esel | 2mg/ml | Polyclonal | Abcam, DE | grün |
| Gt-anti-ms-A568 (goat-anti-mouse) | IgG | Ziege | 2 ml/ml | Polyclonal | Abcam, DE | rot |
| Nukleus Färbung | Antikörperklasse | Wirt | Konzentration | Klon | Firma, Land | Farbe |
| Höchst 33342 | - | - | 2 μ g/ml | - | Sigma-Aldrich, US | Blau |

QUELLE: EIGENE TABELLE

2.4. Methodik

2.4.1. Zellisolation aus der menschlichen Haut

Die Vorhautbiopsie wurde mit einer Mikroskopschere in Quadrate, etwa 0.5x0.5 cm², geschnitten. Die Proben wurden anschliessend in ein mit der Dispase-Lösung gefülltes Röhrchen gelegt, in welchem sie über Nacht bei 40°C inkubiert wurden. Die Dispase ist eine Kollagenase, die das Kollagen IV, aus welchem die Basalmembran besteht (siehe Kapitel 1.1.2.), verdaut. Ohne Basalmembran, die die Epidermis in die Dermis verankert, liess sich die Epidermis ohne Probleme mit einer Pinzette von der Dermis abziehen. Die beiden Hautschichten wurden in zwei separate Röhrchen gelegt.

2.4.1.1. Fibroblasten

In das Röhrchen, in das die Dermis gelegt wurde, wurde eine weitere Kollagenase zugefügt, welche die dermalen Kollagenfasern, bestehend aus Kollagen III, VI und VII, verdaut, mit dem Ziel, die Fibroblasten aus der Dermis zu isolieren. Das Gemisch aus Kollagenase und Dermis wurde unter regelmässigem Schwenken für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dieser Stunde wurde die ganze Flüssigkeit durch ein Zellsieb geleitet, um allfällig zurückgebliebenes unverdautes Material herauszufiltern. Anschliessend wurde die Lösung zentrifugiert, damit sich die Fibroblasten am Boden des Röhrchens absetzen und der Überstand abgesaugt werden konnte. Als letzter Schritt wurden die Fibroblasten noch mit PBS gewaschen (Kapitel 2.4.1.3.), mit 10ml DMEM+++ resuspendiert und in eine Petrischale ausplattiert. Für ein optimales Zellwachstum wurde die Petrischale in den Inkubator bei 37°C gestellt (siehe Anhang 3).

2.4.1.2. Keratinozyten

Wie in der Einleitung bereits erklärt, bildet die Epidermis ein Plattenepithel. Durch interzelluläre Adhäsionsstrukturen haften die Keratinozyten sehr stark aneinander [17]. Um die Desmosomen und die Adherens Junctions, der Grossteil der Adhäsionsmoleküle, zu verdauen, wurde in das Röhrchen mit der Epidermis 2 ml einer 10x Trypsin/EDTA-Lösung zugemischt.

EDTA hat die Eigenschaft, Calcium und Magnesium zu binden. Das Calcium bildet einen essenziellen Teil der Cadherine, einer grossen Familie an calciumabhängigen Zelloberflächenglykoproteinen, die in Zelladhäsionsverbindungen wie den Adhärenz Junctions und den Desmosomen zu finden sind. Dadurch, dass Calcium und Magnesium nicht mehr an das Adhäsionsmolekül binden, sondern an das EDTA, wird die Zell-Zell-Verbindung geschwächt. Nun waren die Moleküle schneller angreifbar für Trypsin. Trypsin ist eine unspezifische Protease und schneidet jegliche Proteinverbindungen auseinander. Das Gemisch wurde für 3 Minuten in den Inkubator (37°C) gestellt und regelmässig geschwenkt. Die Trypsinaktivität wurde anschliessend mit 2 ml des Sojabohne-Trypsininhibitors (SBTI) gestoppt. Damit genug Volumen vorhanden war, um die Lösung im nächsten Schritt zu filtrieren, wurden zusätzlich 10 ml PBS zugefügt. Nach dem Filtrieren wurde die Lösung zentrifugiert, sodass sich die Keratinozyten am Röhrchenboden absetzten und der Überstand abgesaugt werden konnte. Die Keratinozyten wurden resuspendiert und mit 6 ml Nährmedium, CellnTec 57, in eine kollagenbeschichtete Petrischale ausplattiert. Die Petrischale wurde bei 37°C in den Inkubator gestellt (siehe Anhang 2).

2.4.1.3. Mediumwechsel und Waschvorgang

Damit die Zellen genug Nährstoffe hatten, musste alle zwei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt werden. Da sich die Keratinozyten und Fibroblasten in ihrer Anatomie und Funktion unterscheiden, brauchen die Zellen verschiedene Nährmedien mit den entsprechenden Nährstoffen. Beim ersten Mediumwechsel nach der Isolation mussten die Zellen gewaschen werden, um tote nicht adhärierende Zellen und sonstige Zelltrümmer zu entfernen. Der Waschvorgang war bei beiden Zelltypen gleich, ausser dass verschiedene Puffer benutzt wurden. Für die Keratinozyten wurde Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, Tabelle 1) verwendet. PBS enthält weder Calcium noch Magnesium, was für die Keratinozyten nicht problematisch ist, da sie nicht viel davon für die Adhäsion brauchen. Die Puffereigenschaft von PBS ermöglicht das Arbeiten bei einem konstanten pH-Wert. Gleichzeitig ist PBS sehr schonend für die Zellen, da PBS eine isotonische Salzlösung ist. Isotonisch bedeutet, dass die Konzentrationswerte der Lösung ausserhalb der Zelle den Konzentrationswerten innerhalb der Zelle entsprechen und dementsprechend ein Konzentrationsgleichgewicht vorlag [3].

Die Fibroblasten brauchen viel Calcium und Magnesium für Adhäsion. Um diese nicht wegzuwaschen, wurde für den Waschvorgang Hanck's balanced salt solution (HBSS) mit Ca/Mg verwendet.

Als erster Schritt musste das alte Nährmedium abgesaugt werden. Für den Waschvorgang wurde in die Petrischale mit den Zellen 5-6 ml Waschpuffer hinzugefügt. Nach leichtem Schwenken der Petrischale wurde der Waschpuffer wieder abgesaugt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Sobald der Waschpuffer zum letzten Mal abgesaugt wurde, ist der Waschvorgang beendet. Alle folgenden Medienwechsel sind ohne Waschen durchgeführt worden. Dabei musste einfach das alte Nährmedium abgesaugt werden. Anschliessend wurde den Keratinozyten 6 ml CT57 (Tabelle 2) und den Fibroblasten 6 ml DMEM+++ (Tabelle 2) zugefügt. Die Zellen wurden zurück in den Inkubator gestellt.

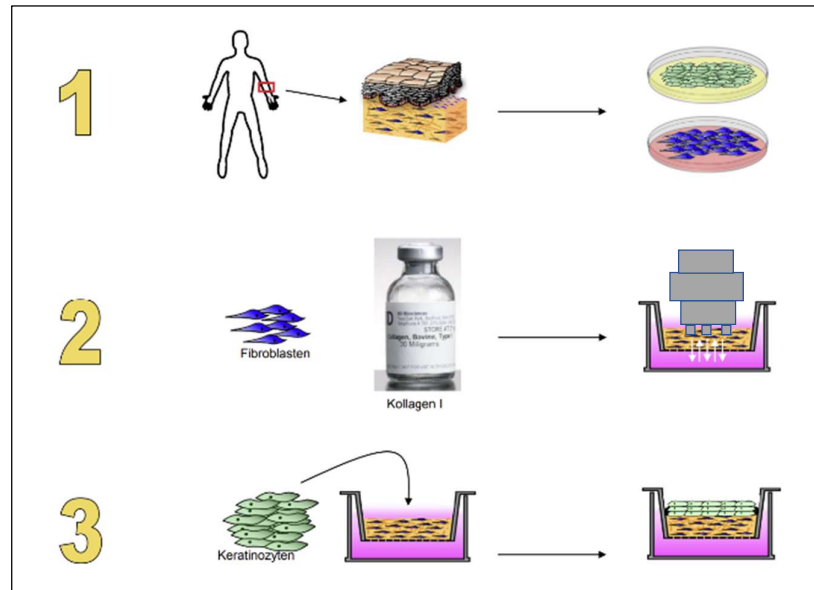
2.4.1.4. Zellen passagieren

Sobald die Petrischale der Keratinozyten 80-90% konfluent war, mussten die Keratinozyten von dieser in eine Petrischale auf drei Petrischalen aufgeteilt (passagiert) werden. Dies hat einerseits den Grund, dass die Zellen mehr Platz haben, um sich zu vermehren, und andererseits, dass die Keratinozyten, sobald sie sich in engem Kontakt zueinander sind, beginnen auszdifferenzieren, was zu diesem Zeitpunkt noch verhindert werden soll.

Fibroblasten müssen nur passagiert werden, wenn sie vermehrt werden sollen. Sie differenzieren nicht aus und können bei 100% Konfluenz im Inkubator aufbewahrt werden.

Für das Passagieren wurde für beide Zelltypen das gleiche Verfahren verwendet. Zuerst mussten die Zellen mit PBS gewaschen werden, um tote Zellen aber auch Calcium und Magnesium zu entfernen. Anschliessend wurde das PBS abgesaugt und 6 ml einer vorgewärmten, 50x verdünnten Trypsin/EDTA-Lösung hinzugefügt. Nach drei bis fünf Minuten bei 37°C im Inkubator haben sich die Zellen von der Petrischale gelöst. Durch leichtes Klopfen an die Schale konnte diesem Prozess mechanisch nachgeholfen werden. Um die Enzymaktivität zu stoppen, wurde 150µl SBTI in die Zellsuspension zugefügt. Die Zellen wurden nun mit einer Pipette resuspendiert und in ein Zentrifugationsröhrchen pipettiert. Um die Zellen aus der Suspension zu trennen, erfolgte eine Zentrifugation. Die Zellen setzten sich ab und die Flüssigkeit konnte abgesaugt werden. Die Zellen wurden mit ihrem entsprechenden Medium resuspendiert, jeweils ein Drittel des Volumens wurde in eine neue Petrischale pipettiert [17; 18].

2.4.2. Herstellung der Hautsubstitute (3D Kollagen-Hydrogele)



FIGUR 4: ÜBERSICHT DER TEILSCHRITTE DER HERSTELLUNG VON HYDROGELN. DIE HERSTELLUNG EINES HAUTERSATZES WIRD IN DREI TEILSCHRITTE UNTERTEILT: (1) DIE ISOLATION UND VERMEHRUNG DER ZELLEN, (2) DIE HERSTELLUNG DER DERMALNEN KOMPONENTE UND (3) DIE VERVOLLSTÄNDIGUNG DES VOLLHAUT-SUBSTITUTES MIT DER EPIDERMALNEN KOMPONENTE.

QUELLE: ARCHIVE TISSUE BIOLOGY RESEARCH UNIT

Figur 4 zeigt eine Zusammenfassung der wichtigsten Teilschritte der Herstellung der Hautsubstitute.

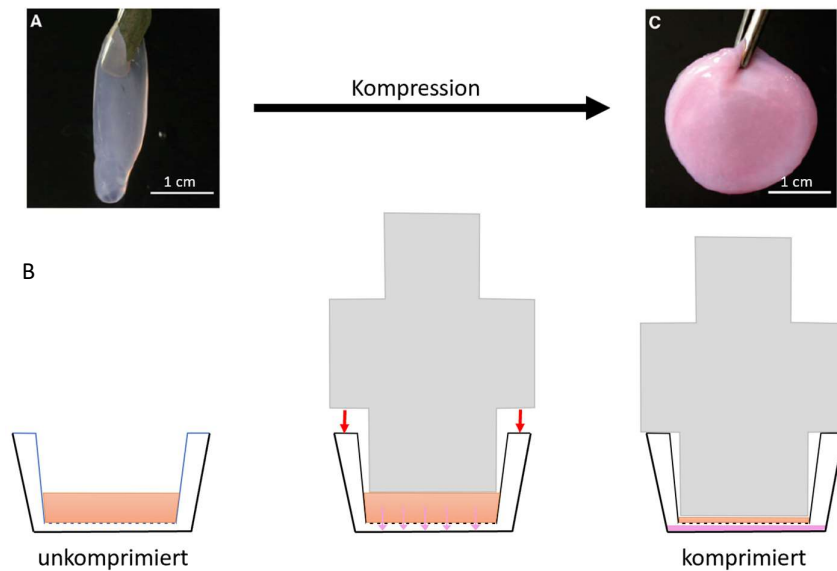
Der erste Schritt beinhaltete das Entnehmen einer Hautbiopsie, das Isolieren der Fibroblasten und der Keratinozyten und deren Vermehrung. Der zweite Teilschritt war das Einführen der Fibroblasten in das Kollagen-Hydrogel für die Herstellung der dermalen Komponente des Substitutes. Im letzten Teilschritt wurden die Keratinozyten auf die dermale Komponente gesät.

Der erste Schritt wurde im Kapitel 2.4.1. beschrieben. In den folgenden Paragraphen werden ausführlich die beiden anderen Teilschritte erklärt.

2.4.2.1. Dermale Komponente

Als eine Art Simulation der Dermis mussten die Fibroblasten in ein Kollagen-Hydrogel eingebettet werden. Dafür wurden folgende Komponenten in folgendem Verhältnis gemischt: 2.0 ml Kollagen I Lösung, 0.6 ml CV-Buffer und 0.4 ml DMEM mit Fibroblasten (0.109 Mio/ml). Durch den CV-Puffer wurde eine pH-Neutralisation der Kollagenlösung bewirkt, was zum Gellieren des Kollagens führte und zum Einfangen der Fibroblasten in einer dreidimensionalen Verteilung. Für das Pipettieren wurde eine Doppelspritze (Medmix Systems AG, CH) mit zwei Kammern verwendet, die eine sehr hohe Reproduzierbarkeit erlaubte. Das Verhältnis zwischen den Volumina der beiden Kompartimente war 2:1. Das Kollagen I wurde in die grosse Kammer gefüllt und das DMEM mit den Fibroblasten und dem CV-Puffer in die kleine Kammer. Der Dispenser wurde so eingestellt, dass pro Abgabe 3.45 ml pipettiert wurden. Pipettiert wurden die Gele in Inserts, die mit kleinen Körbchen vergleichbar sind. Jedes der sechs Hydrogele hatte ein Endvolumen von 3.45 ml mit 44'000 Zellen. 90% des Gellierungsprozesses lief in den ersten Sekunden ab, dennoch war das Hydrogel für die Weiterverarbeitung erst nach zwei Stunden im Inkubator bei 37°C bereit.

2.4.2.2. Die plastische Kompression

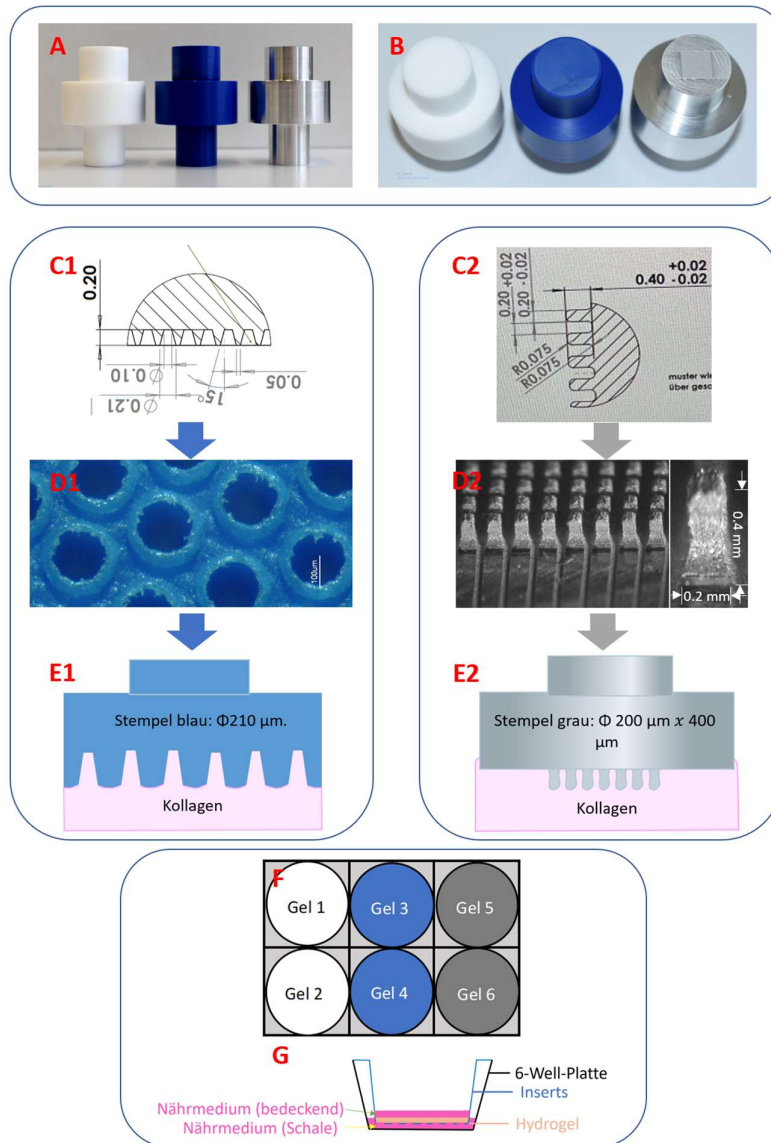


FIGUR 5: PLASTISCHE KOMPRESSION. A ZEIGT DIE KONSISTENZ DES HYDROGELS UNKOMPRIMIERT. B SCHEMATISCHE DARSTELLUNG WIE DAS HYDROGEL DURCH DEN STEMPEL KOMPRIMIERT WIRD. C ZEIGT DIE VERÄNDERTE KONSISTENZ DES HYDROGELS NACH DER PLASTISCHEN KOMPRESSION.

QUELLE: MODIFIZIERTE DARSTELLUNG AUS ARCHIVE TISSUE BIOLOGY RESEARCH UNIT

Die Plastizität beschreibt die physikalische Fähigkeit eines Körpers nach einer Verformung durch eine mechanische Kraft in diesem Zustand zu verbleiben. Bei einer plastischen, irreversiblen Verformung gibt es immer einen elastischen, reversiblen Anteil. Nach dem Aufheben der Krafteinwirkung bleibt nur der plastische Anteil der Verformung dauerhaft bestehen [20]. Wie die Fig. 5 zeigt, wurden für die plastische Kompression der Hydrogele T-förmige Druckstempel verwendet, welche in die Inserts passen. Die Länge des Zylinders wurde so gewählt, dass die Hydrogele nach der Kompression eine Dicke von 1 mm haben. Grund für die plastische Kompression war, dass viel Flüssigkeiten durch die Membran, welche den Boden des Inserts bildet, herausgedrückt wird und dichteres, stabileres Kollagen I und Fibroblasten im Hydrogel verblieben [21]. Nach ihrer Herstellung (siehe Kapitel 2.4.2.1.) und 2 h Inkubation bei 37°C waren die Gele bereit, komprimiert zu werden (Fig. 5). Die Stempel mit den zusätzlichen Metallringen haben ein Gesamtgewicht von 150 g. Durch die mechanische Krafteinwirkung ordneten sich die Kollagenfasern neu an und kehrten nicht mehr in die ursprüngliche Anordnung zurück. Die Kompression dauerte 10 Minuten.

Für die plastische Kompression wurden drei verschiedene Stempel verwendet. Der blaue und der graue Stempel sind von der Tissue Biology Research Unit (TBRU) Zürich für diesen Versuch kreiert worden (Fig. 6, A). Durch ihre modifizierte Stempelunterseite (Fig. 6, B) soll im Kollagen eine Wellenstruktur entstehen. Hergestellt wurden die Stempel an der ETH Zürich. Der weisse sowie der blaue Stempel bestehen aus Polytetrafluorethylen, einem Kunststoff, und der graue Stempel aus Aluminium. Alle drei Stempel weisen das gleiche Gewicht auf. Entscheidend für diesen Versuch waren die verschiedenen Strukturen der Stempelunterseiten. In die Unterseite des blauen Stempels wurden mit dem Bohrer runde Löcher mit einem Durchmesser von 150 µm gebohrt. Die Bohrlöcher befanden sich im Abstand von 210 µm zueinander (Fig. 6, C1, D1, E1). Die Metallzapfen am grauen Stempel waren quadratisch, 200 x 200 µm, und hatten eine Höhe von 400 µm. Der Abstand zwischen den Zapfen beträgt 200 µm (Fig. 6, C2, D2, E2). Der weisse Stempel war der Stempel, welcher bisher für die plastische Kompression der Hydrogele verwendet wurde. Seine Unterseite wurde nicht bearbeitet und war flach. In dieser Arbeit wurde dieser Stempel als Negativkontrolle verwendet.



FIGUR 6: DARSTELLUNG DER STEMPEL. **A** ZEIGT DIE SEITENANSICHT UND **B** DIE UNTERSEITE DER STEMPEL. **C1** GEOMETRISCHE DARSTELLUNG DES BLAUEN STEMPELS. **C2** ANALOG FÜR DEN GRAUEN STEMPEL. **D1** AUFGENOMMEN MIT DEM MIKROSKOP ZEIGT DIE STEMPELUNTERSEITE DES BLAUEN STEMPELS. ANALOG **D2** FÜR DEN GRAUEN STEMPEL. **E1** SCHEMATISCHER QUERSCHNITT DES BLAUEN STEMPELS UND DES KOLLAGENS WÄHREND DEM KOMPRESSIONSSCHRITT. ANALOG **E2** MIT VERWENDUNG DES GRAUEN STEMPELS. **F** IST EINE 6-WEELL-PLATTE UND STELLT SCHEMATISCH DIE HYDROGEL-KOMBINATION IN DIESEM EXPERIMENT DAR. DIE FARBE DES GELS ENTSpricht DER FARBE DES STEMPELS. **G** ZEIGT DAS INSERT IN DER 6-WEELL-PLATTE MIT DEM NÄHRMEDIUM.

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNGEN UND ABBILDUNGEN

Nach der Kompression wurden alle Hydrogele jeweils mit 2 ml DMEM bedeckt, und 2 ml wurden in die Schale der 6-Well-Platte hinzugefügt. Die 6-Well-Platte ist eine sterile Wachstumsfläche, die sechs Inserts auffangen kann (Fig. 6, F und G). Die sechs Hydrogele wurden bei 37°C im Inkubator kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

2.4.2.3. Die epidermale Komponente

Sieben Tage nachdem die Fibroblasten in das Kollagen I eingeführt und komprimiert wurden, sind die Keratinozyten gesät worden, der letzte der drei Teilschritte.

Die Keratinozyten wurden mit Trypsin von der Petrischale gelöst (Kapitel 2.4.1.4.). Auf jedes der Hydrogele wurde 1 ml RGM, das Nährmedium für dermale-epidermale Hydrogele, mit 600'000 Keratinozyten pipettiert. Anschliessend wurden die Gele bei 37°C zurück in den Inkubator gestellt. In dieser Zeit begannen die Keratinozyten an das Kollagen I zu adhären. Nach vier Stunden wurde ein zusätzlicher ml RGM auf die Hydrogele pipettiert und zwei weitere ml in die Schale der 6-Well-Platte (Fig. 6, G). Die Substitute wurden bei 37°C im Inkubator kultiviert und es wurde jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.4.3. Kryostatschnitte und Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Standardfärbung in der Histologie und dient dazu, sich einen Überblick über die Gewebestrukturen verschaffen zu können.

Das Wachstum der Hautsubstitute wurde nach sechzehn Tagen gestoppt. Als erster Schritt mussten die Gele aus den Körbchen, in denen sie in den vergangenen Tagen herangewachsen sind, herausgenommen werden. Dies gelang am besten mit einem Cutter. Sobald die runden Hydrogele von den Körbchen gelöst worden sind, wurde das Hautsubstitut in zwei Halbkreise geschnitten. Alle Halbkreise wurden in Tissue-Tek eingebettet, ein Einbettmedium geeignet für Schnitte im Kryostat. Tissue-Tek ist ein auf Glycerin basierendes Medium und löste sich während des Färbeprozesses restlos aus den Schnitten heraus. Schnitte gefertigt am Kryostat bedeutet, dass die Schnitte in einer Kühlkammer (Kryostat) bei -20 °C hergestellt wurden. Die 10 µm dicke entstandenen Schnitte wurden auf Objektträger gelegt. Anschliessend waren die Schnitte bereit gefärbt zu werden.

Das Hämatoxylin ist ein Naturfarbstoff mit der Eigenschaft, saure beziehungsweise basophile Strukturen, wie beispielsweise den Zellkern, blau zu färben. Der Fachbegriff basophil bezeichnet in der Histologie eine Struktur, die sich durch basische Farbstoffe anfärben lassen, sowie es das Hämalun im Hämatoxylin ist [22]. Eosin ist ein rötlicher Farbstoff und wird als Gegenfärbung zum Blau des Hämatoxylins verwendet. Eosin färbt alle Zellstrukturen rot, die basisch beziehungsweise acidophil sind. Acidophil bezeichnet in der Histologie Strukturen, die sich durch saure Farbstoffe anfärben lassen [23]. Durch Verwendung dieser beiden Farbstoffe nahmen die Zellkerne eine violette Farbe und die restlichen Zellstrukturen eine rötliche Farbe an.

Als erster Schritt wurden die Objektträger für eine Minute in das Hämatoxylin getaucht. Nach Ablauf dieser Minute mussten die Objektträger so lange mit Wasser abgespült werden, bis das abfliessende Wasser keine bläulichen Schimmer mehr hatte. Anschliessend wurden die Objektträger kurz, etwa eine Sekunde, ins Eosinbad getaucht. Sofort mussten die Objektträger wieder unter dem fließenden Wasser gespült werden, ebenfalls so lange bis kein rötlicher Schimmer mehr im abfliessenden Wasser zu sehen war. Um das Wasser aus dem Gewebe der Schnitte zu entfernen, mussten die Objektträger eine Ethanolreihe durchlaufen. Die Objektträger mussten in alle Ethanolkonzentrationen (70%, 96%, 100%) für fünfzehn Sekunden eingetaucht werden. Am Ende der Ethanolreihe wurden die Schnitte für eine Minute ins Xylol getaucht, damit das Ethanol aus dem Gewebe entfernt wurde. Anschliessend wurden die Schnitte an der Luft getrocknet. Dies dauerte zwei bis drei Minuten. Dann wurden drei bis vier Tropfen des Einschlussmediums (Eukitt-quick-hardening mounting medium) auf die Schnitte getropft, damit die Zellstrukturen fixiert und erhalten blieben. Beim Darauflegen der Deckgläser musste darauf geachtet werden, dass sich unter dem Glas keine Luftblasen bildeten (siehe Anhang 5).

2.4.9. Antikörperfärbung

Wie oben wurde das Gewebe mit TissueTek eingebettet und am Kryostat geschnitten.

Die Schnitte wurden mit Acetat Methanol (Ac:MetOH) fixiert. Zuerst wurde den Zellen 4 ml Ac:MetOH (1:1) für fünf Minuten zugefügt. Nach dem Lufttrocknen für dreissig Sekunden wurden mit einem Wattestäbchen Kreise um die Schnitte auf die Objektträger gezeichnet. Diese Kreise wurden mit einem hydrophoben Stift (DAKO, CH) umrandet, der eine dünne, filmartige hydrophobe Barriere bildet. Er ermöglichte eine Mehrfachfärbung, also dass für alle Schnitte auf demselben Objektträger andere Antikörper angewendet werden konnten. Anschliessend wurden die Objektträger mit PBS gewaschen. Danach wurde jeder Schnitt für dreissig Minuten mit 2 % BSA/PBS bedeckt, damit sie bereit für die Immunfluoreszenzfärbung waren.

Die primären Antikörper wurden mit 2% BSA verdünnt und für vierzig Minuten auf die Schnitte aufgetragen (Tabelle 3). In diesen vierzig Minuten wurden die Objektträger in eine lichtundurchlässige Feuchtigkeitskammer auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Schnitte drei Mal mit PBS für fünf Minuten gewaschen und erneut für fünfzehn Minuten mit 2 % BSA/PBS bedeckt. Daraufhin wurden die sekundären Antikörper zugefügt (Tabelle 3). Die Schnitte wurden

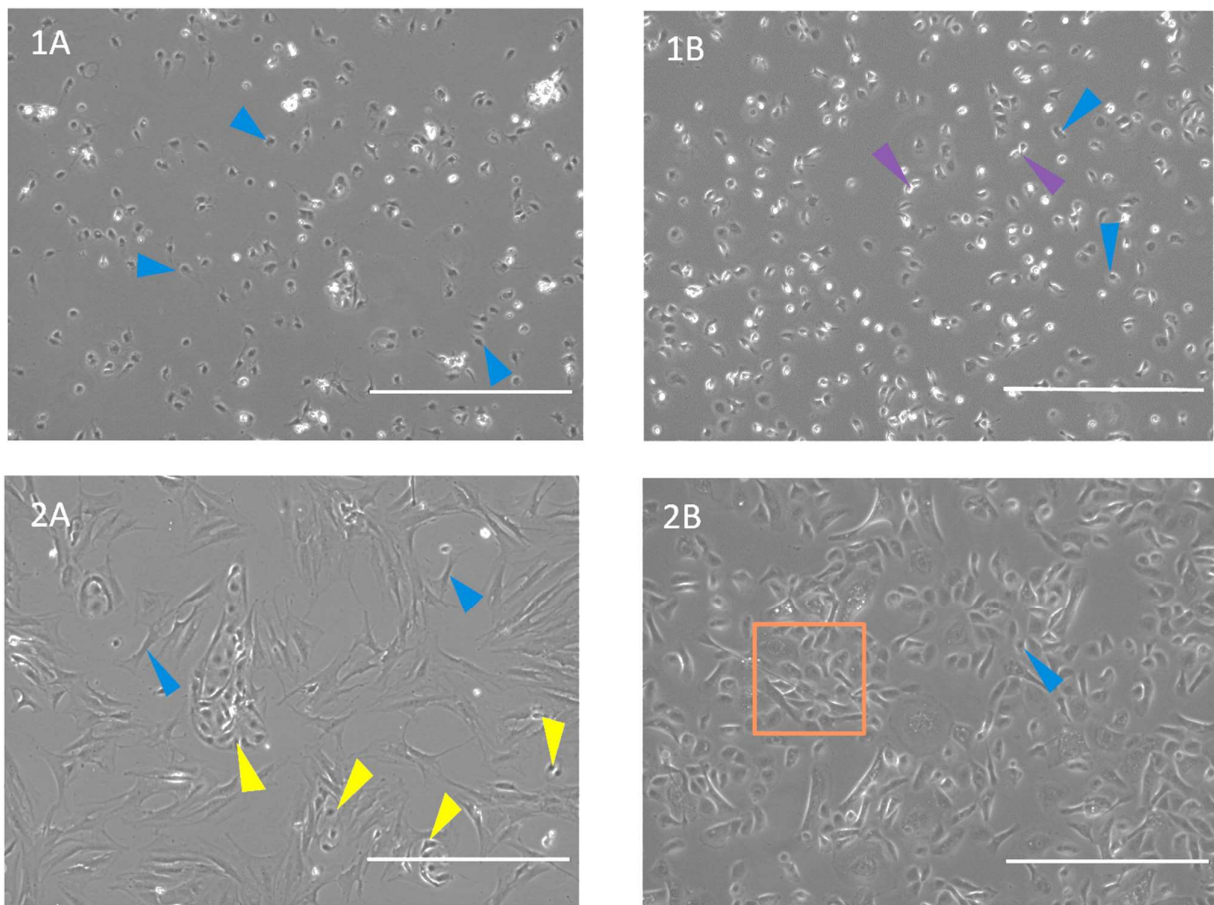
noch einmal für dreissig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Schnitte mit Höchst 33342 (2 μ l/1 ml PBS) für fünf Minuten bedeckt, damit die Zellkerne blau gefärbt wurden. Danach wurden zwei weitere Waschschrte mit PBS durchgeführt. Als letzten Schritt wurde das FluoroshieldTM Histologie-Einbettmedium aufgetragen. Die Schnitte wurden mit einem Deckglas abgedeckt und bis zur mikroskopischen Analyse im Kühlschrank gelagert (siehe Anhang 6).

2.4.10. Mikroskopie

Die Bilder aus der Immunhistochemie wurden mit einem Nikon Eclipse Phasenkontrastmikroskop (TE2000-U, Nikon, Japan), welches für Fluoreszenzmikroskopie ausgerüstet ist, aufgenommen. Die Bilder der Paraffinschnitte wurden mit einem confocal laser scanning microscope (CLSM) Leica SP8 invers (Schlieren) aufgenommen, welches Bilder mit hoher Auflösung in die Tiefe aufnehmen kann. Alle Bilder, die in dieser Arbeit gezeigt wurden, sind mit *Fotos* bearbeitet und mit Power Point und Word zusammengestellt worden.

3 Resultate

3.1. Isolation und Wachstum der Zellen in Kultur



FIGUR 1: FIBROBLASTEN UND KERATINOZYTEN IN KULTUR. **1A** ZEIGT DIE FIBROBLASTEN AM TAG IHRER ISOLATION. BILD **2A** ZEIGT DIE FIBROBLASTEN ACHT TAGE SPÄTER, EINEN TAG BEVOR SIE FÜR DIE HERSTELLUNG DER HYDROGELE MIT DEM KOLLAGEN GEMISCHT WURDEN. ANALOG WIE BEI DEN FIBROBLASTEN ZEIGT BILD **1B** DIE KERATINOZYTEN AM TAG IHRER ISOLATION. **2B** ZEIGT DIE KERATINOZYTEN, BEVOR SIE AUF DIE HYDROGELE GESÄT WURDEN. SEIT DER ISOLATION SIND 15 TAGE VERGANGEN. DER WEISSE BALKEN HAT EINE LÄNGE VON 400 μM

QUELLE: EIGENE AUFNAHMEN

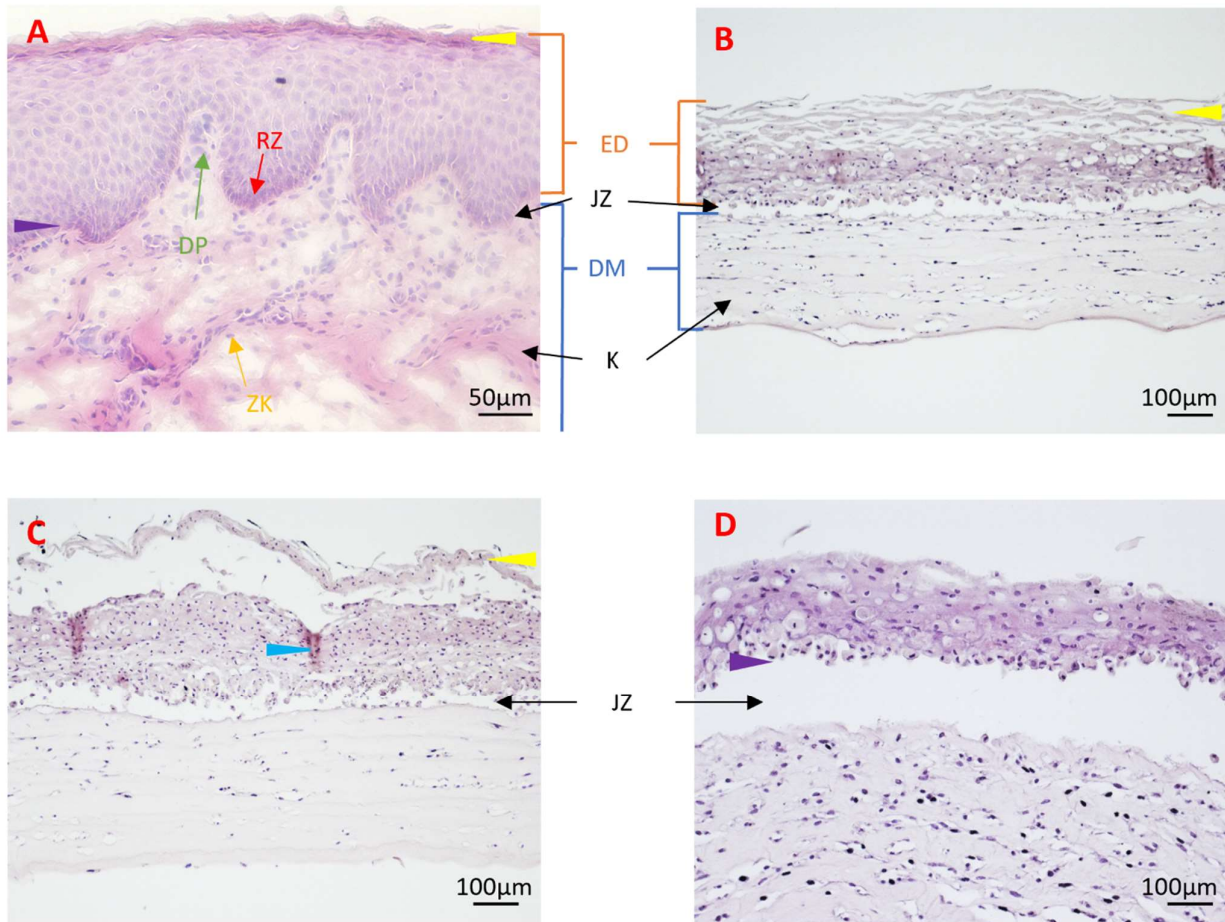
Die Biopsie aus menschlicher Vorhaut eignete sich gut als Quelle für Primärzellen, da die Biopsie einerseits zugänglich war und andererseits alle für diese Arbeit benötigten Primärzellen enthielt. Es konnten Keratinozyten aus der Epidermis und die Fibroblasten aus der Dermis isoliert werden.

Die Fibroblasten hatten wenige Stunden nach dem Ausplattieren eine runde Form, wie im Bild oben (Fig. 7, 1A) ersichtlich ist. Ihr Durchmesser betrug im Schnitt 20 μm und die Zellen waren gleichmässig auf der Kulturschale verteilt (Fig. 7 Bild 1A, blauer Pfeil). Nach acht Tagen haben sich die Fibroblasten vermehrt und waren nicht mehr rund, sondern hatten eine längliche, spindelförmige Morphologie (Fig. 7, 2A, blauer Pfeil). Die Fibroblasten wuchsen verstreut heran, mit einem Mindestabstand von 50 μm zueinander. Zudem waren Regionen auf der Petrischale auszumachen, in denen sich die Zellen zu Gruppen geballt hatten (Fig. 7, Bild 2A, gelbe Pfeile). Es handelt sich um Endothelzellen. Endothelzellen bilden die innerste Wand eines Blutgefässes und sind dementsprechend in der Dermis zu finden. Die Endothelzellen sind für diese Arbeit irrelevant und beeinflussen das Experiment nicht, da die Fibroblasten als Hauptzelltyp der Dermis aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate andere Zellminderheiten überwuchern.

Wie auf Abbildung Fig. 7, 1B zu erkennen ist, waren auch die Keratinozyten nach dem Ausplattieren gleichmässig verteilt. Die Zellen hatten eine runde Form und im Schnitt einen 30 μm grossen Durchmesser (Fig. 7, 1B, Keratinozyten blaue Pfeile).

Zudem sind auf der Abbildung 1B Zellen zu erkennen, die sich in der Cytokinese befinden. Dies war daran zu erkennen, da es sich immer um zwei Zellen handelt, die sehr dicht beieinander lagen und zudem etwas heller als die anderen Zellen leuchteten (Fig. 7, Bild 1B, violette Pfeile). Fig. 7, 2B zeigt dieselben Keratinozyten 15 Tage später. Die Keratinozyten wiesen nicht mehr eine runde Form auf, sondern viele hatten begonnen auszdifferenzieren und eine heterogene Morphologie angenommen. Bei allen Zellen hatte der Durchmesser um rund 10 µm zugenommen (Fig. 7, Bild 2B, Keratinozyten blaue Pfeile). Die Keratinozyten wuchsen in Kolonien und lagen sehr eng beieinander, wie in der Fig 7, 2B im orangen Kasten zu erkennen ist.

3.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung



FIGUR 8: HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG. A ZEIGT DIE FÄRBUNG EINER NATÜRLICHEN HAUT. B ZEIGT DAS HAUTSUBSTITUT, WELCHES MIT DEM WEISSEN STEMPEL KOMPRIMIERT WURDE. C ZEIGT DAS DURCH DEN BLAUEN STEMPEL KOMPRIMIERTE SUBSTITUT. D ZEIGT DAS HAUTSUBSTITUT, WELCHES MIT DEM GRAUEN STEMPEL KOMPRIMIERT WURDE.

QUELLE: EIGENE AUFNAHMEN

Nach sechzehn Tagen wurde das Wachstum der Hautsubstitute gestoppt und die histologischen Färbungen gemacht, um die Gewebestruktur der Hautsubstitute zu untersuchen. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung machte Gewebestrukturen sichtbar, wodurch überprüft werden konnte, ob die Retezapfen im Hautsubstitut vorhanden waren.

Auf allen histologischen Schnitten sind zwei unterschiedlich gefärbte Schichten zu erkennen, eine hellrosafarbene und eine dunkelrosafarbene. Die in den Bildern weiter unten liegende hellrosafarbene Schicht ist die Dermis (Fig. 8A, DM). Die durch das Hämatoxylin dunkelblau gefärbten Punkte in den Schnitten sind die Zellkerne der Fibroblasten und Keratinozyten (Fig. 8A, ZK). Die Zellkerne der Fibroblasten in der Dermis sind von einer hellrosa Matrix umgeben, bei welcher es sich um

Kollagen (Fig. 8A, K) handelt. Am oberen Ende der Dermis befindet sich die dermo-epidermale Junctionszone (Fig. 8A, JZ). Die in der Färbung dunklere Schicht oberhalb der Junctionszone ist die Epidermis (Fig. 8A, ED).

In der Färbung ebenfalls zu erkennen sind die Retezapfen (Fig. 8A, RZ) und die dermalen Papillen (Fig. 8A, DP). Die Retezapfen sind 70 µm breit und 50 µm hoch. Die dermalen Papillen sind 40 µm breit und haben eine Höhe von 70 µm. Ausserdem sind in der Epidermis das Stratum basale und das Stratum corneum zu erkennen. Zu dem Stratum basale gehört die ganze unterste Zellreihe der Epidermis (Fig 8A, violette Pfeilspitze). Zu dem Stratum corneum gehören die obersten Zellreihen der Epidermis. Die Keratinozyten hatten keinen Zellkern mehr und fingen an, sich von der Haut abzulösen (Fig. 8, A, gelbe Pfeilspitze). Die Dichte an Keratinozyten nimmt von innen nach aussengehend bis zu 50 % ab. Abgesehen vom Stratum basale und dem Stratum corneum können keine weiteren Schichten identifiziert werden, da die Zellen keine von Auge erkennbaren Unterschiede ihrer Differenzierungsgrade aufweisen.

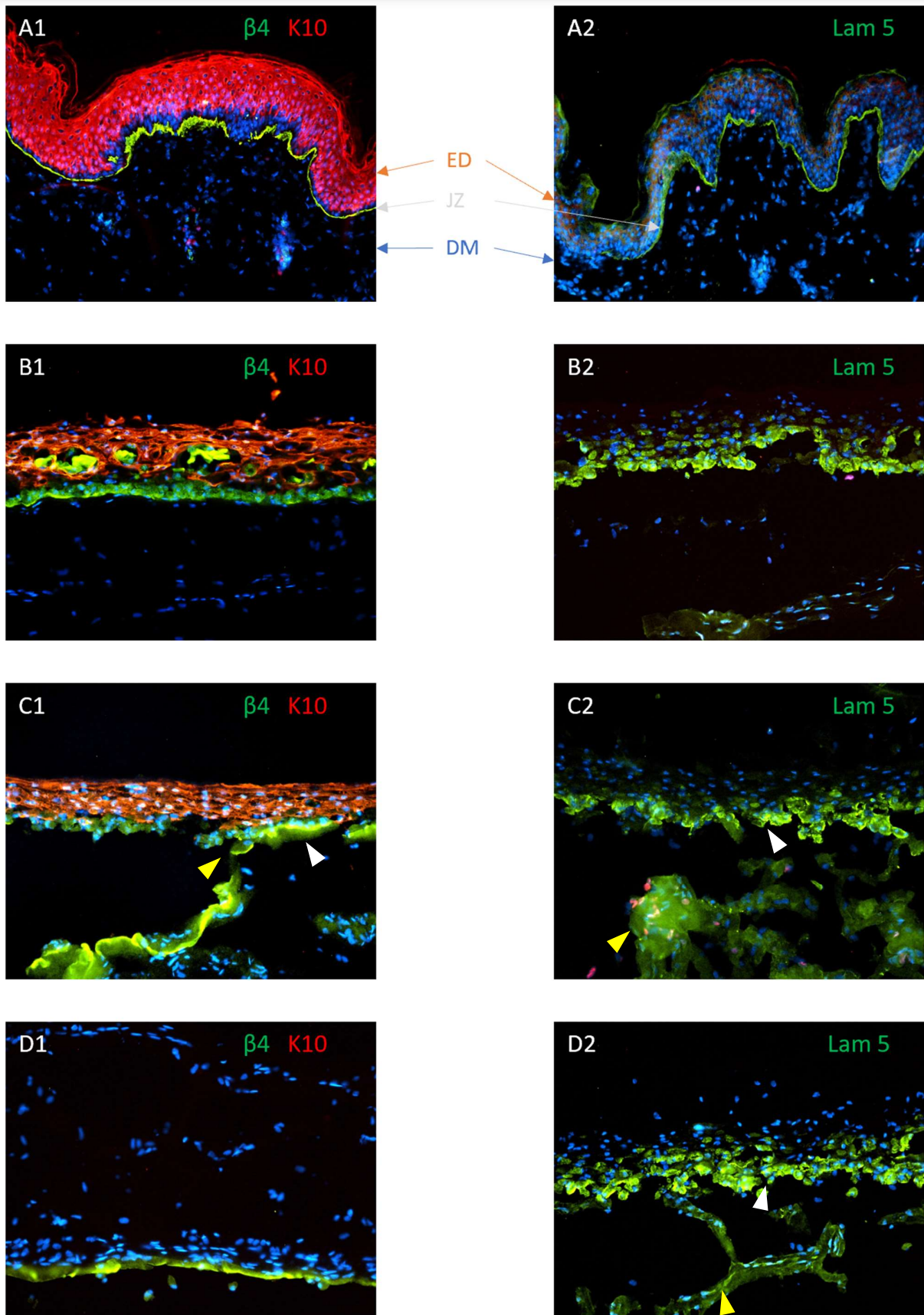
Fig. 8, B zeigt das Hautsubstitut komprimiert mit dem weissen Stempel. Die dermale Junctionszone ist nicht zu erkennen, da sich die Epidermis von der Dermis gelöst hatte. Der Spalt beträgt 50 µm. Diese Trennung von Epidermis von der Dermis, ist darauf zurückzuführen, dass die Junctionszone in den Substituten viel fragiler waren als in der natürlichen Haut (siehe Diskussion) und durch die mechanische Beanspruchung der histologischen Präparation aufgebrochen worden war.

Weder im Kollagen noch in der Epidermis sind Strukturen von Retezapfen zu erwarten, da für die plastische Kompression der weisse, flache Stempel verwendet wurde. Wie in der natürlichen Haut sind auch in diesem Hautsubstitut die Dermis und die Epidermis auszumachen (Fig. 8B, ED und DM). Zudem ist das Stratum corneum in der Epidermis zu erkennen (Fig. 8B, gelbe Pfeilspitze). Obwohl die Epidermis sich gelöst hat, ist zu erkennen, dass sich die Keratinozyten nicht zu einer basalen Schicht und den darüberliegenden Schichten angeordnet haben. Eine Abnahme der Dichte an Keratinozyten von innen nach aussengehend ist ebenfalls nicht zu erkennen (Fig 8B, grüner Balken markiert Zone, in der die Keratinozyten von unten nach oben abnehmen sollten).

Fig. 8, C zeigt das Hautsubstitut komprimiert durch den blauen Stempel. Zwischen Epidermis und Dermis ist wie oben wieder ein 50 µm breiten Spalt zu erkennen. Obwohl die Dermis sowie die Epidermis vorhanden waren, sind weder im Kollagen noch in der Epidermis wellenartige Strukturen zu erkennen, die auf Retezapfen hindeuten. Wie bereits bei der Fig. 8, B haben sich die Keratinozyten in der Epidermis nicht zu den Schichten angeordnet, nur das Stratum corneum ist zu erkennen (Fig. 8C, gelbe Pfeilspitze). Die Dichte der Keratinozyten nimmt von innen nach aussengehend nicht ab (Fig. 8C, grüner Balken). Die Falten in der Epidermis (Fig. 8C, hellblaue Pfeilspitze) sind während der histologischen Präparation entstanden und haben keine weitere Bedeutung.

Fig. 8, D zeigt das Hautsubstitut komprimiert durch den grauen Stempel. Es sind keine dermale Junctionszone zu erkennen, da ein 150 µm breiter Spalt zwischen Epidermis und Dermis vorhanden ist. Die beiden Schichten liegen flach aufeinander und es ist nicht möglich, Strukturen auszumachen, die auf Retezapfen hinwies. Im Gegensatz zu den anderen Substituten kann in Fig. 8, D die Basalschicht ausgemacht werden (Fig. 8D, violette Pfeilspitze). Zudem ist eine Abnahme der Dichte an Keratinozyten entlang des grünen Balkens (Fig. 8D, grüner Balken) von innen nach aussen zu beobachten. Das Stratum corneum kann nicht eindeutig identifiziert werden.

3.3. Antikörperfärbung



FIGUR 9: RESULTATE DER ANTIKÖRPERFÄRBUNG. DIE ABBILDUNGEN BESCHRIFTET MIT **A1, B1, C1, D1** WURDEN MIT DEN ANTIKÖRPERN GEGEN DIE PROTEINE BETA 4 UND K10 GEFÄRBT. IN DEN ABBILDUNGEN BESCHRIFTET MIT **A2, B2, C2, D2** WURDE DER ANTIKÖRPER GEGEN DAS PROTEIN LAM 5 ANGEWENDET. **A1, A2** ZEIGEN DIE FÄRBUNGEN AN DER NATÜRLICHEN HAUT. **B1, B2** ZEIGEN DIE FÄRBUNGEN DER HAUTSUBSTITUTE, WELCHE MIT DEM WEISSEN STEMPEL KOMPRIMIERT WURDEN. **C1, C2** ZEIGEN DIE HAUTSUBSTITUTE, DIE MIT DEM BLAUEN STEMPEL KOMPRIMIERT WURDEN. **D1, D2** ZEIGEN DIE FÄRBUNGEN DER HAUTSUBSTITUTE, WELCHE MIT DEM GRAUEN STEMPEL KOMPRIMIERT WURDEN.

QUELLE: EIGENE AUFNAHMEN

Um die Qualität der Substitute zu testen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Bei dieser Färbungsmethode wurden Antigene mittels Antikörper, an welche wiederum ein Fluoreszenzmolekül gebunden war, markiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht [24]. In diesem Experiment wurden Antikörper verwendet, die an typische in der natürlichen Haut vorkommende Proteine binden. Auf diese Weise konnte überprüft werden, ob diese typischen Proteine auch in den Hautsubstituten vorhanden waren und ob diese am richtigen Ort exprimiert wurden.

Bei den Schnitten in der ersten Spalte (Fig. 9 A1, B1, C1 und D1) sind die Antikörper gegen die Proteine Integrin $\beta 4$ ($\beta 4$) und Cytokeratin 10 (K10) angewendet worden (siehe Tabelle 3). Integrinkomplex $\alpha 6\beta 4$ ist eine Komponente der Hemidesmosomen, welche die Basalzellen auf die Basalmembran verankern. Cytokeratin 10 ist ein Protein, welches an der Bildung der Intermediärfilamente beteiligt ist und von allen Keratinozyten ausser den Basalzellen exprimiert wird.

Aufgrund der Auswahl der sekundären Antikörper (siehe Tabelle 3)) leuchtet der Antikörper gegen $\beta 4$ unter dem Fluoreszenzmikroskop grün. Er bindet an die zur Basalmembran grenzende Seite der Basalzellen. Der Antikörper gegen K10 leuchtet unter dem Fluoreszenzmikroskop rot. Er bindet an alle K10 exprimierenden Zellen, was allen Keratinozyten ausser den Basalzellen entspricht. Diese Verteilung ist besonders gut in der Färbung an der natürlichen Haut zu erkennen (Fig. 9, A1). Die blauen Punkte in dieser sowie in allen anderen Abbildungen sind die Zellkerne, welche durch den Fluoreszenzfarbstoff Höchst 33342 blau gefärbt wurden.

An der Färbung des Hautsubstitutes, welches mit dem weissen Stempel komprimiert wurde (Fig. 9, B1), ist zu erkennen, dass beide Proteine, $\beta 4$ sowie K10, im Substitut vorhanden sind. $\beta 4$ wird von allen Keratinozyten exprimiert, die sich in der unteren Hälfte der Epidermis befinden. K10 wird von allen Keratinozyten, ausser den Basalzellen, exprimiert.

Bei der Färbung des Hautsubstitutes, welches mit dem blauen Stempel komprimiert wurde (Fig. 9, C1), ist zu erkennen, dass beide Antikörper der Proteine $\beta 4$ und K10 gebunden haben. Der Antikörper gegen $\beta 4$ hat an die zur Dermis angrenzende Seite der Basalzellen gebunden (Fig. 9, C1, weisse Pfeilspitze). Auf der linken Seite des Bildes ist zu erkennen, dass sich die Dermis und die Basalzellen vom restlichen Teil der Epidermis abgelöst hat und ein Spalt entstanden ist (Fig. 9, C1, gelbe Pfeilspitze). Der Antikörper gegen K10 hat an alle Keratinozyten, ausser die Basalzellen gebunden.

Fig. 9, D1 zeigt die Färbung am Hautsubstitut, welches mit dem grauen Stempel komprimiert wurde. Im Bild ist zu sehen, dass in diesem Schnitt nur der Antikörper gegen $\beta 4$ gebunden hat. $\beta 4$ wird auf der Unterseite der Basalzellen exprimiert. Anhand der blau gefärbten Zellkerne ist gewiss, dass Keratinozyten im Hautsubstitut vorhanden sind, aber der Antikörper gegen K10 nicht gebunden hat.

Bei den Schnitten in der zweiten Spalte (Fig. 9 A2, B2, C2, D2) wurde der Antikörper gegen das Protein Laminin 332 (Lam 5) angewendet. Laminin 332 ist eine Komponente der Basalmembran und wird von den Basalzellen der Epidermis synthetisiert (siehe Kapitel 1.1.2.). Dies ist besonders gut an der grünen Färbung in der natürlichen Haut zu erkennen (Fig. 9, A2).

Fig. 9, B2 zeigt das Hautsubstitut, welches mit dem weissen Stempel komprimiert wurde. Es ist zu erkennen, dass der Antikörper gegen Lam 5 nicht nur in der Basalmembran gebunden haben, sondern auch an die Keratinozyten, welche zu den untersten Zellreihen der Epidermis gehören.

Fig. 9, C2 zeigt das Hautsubstitut, welches mit dem blauen Stempel komprimiert wurde. Grösstenteils hat der Antikörper an die Basalzellen gebunden (Fig. 9, C2, weisse Pfeilspitze). Dennoch sind in der Dermis ebenfalls grüne Regionen auszumachen, welche aber auf ungebundene Antikörper zurückzuführen sind, die während der Herstellung der Färbung nicht gewegewaschen wurden (Fig. 9, C2, gelbe Pfeilspitze).

Fig. 9, D2 zeigt die Färbung am Hautsubstitut, welches mit dem grauen Stempel komprimiert wurde. Der Antikörper gegen das Protein Lam 5 hat an die Basalzellen gebunden, aber auch an Zellen bis zu drei Zellreihen weiter oben in der Epidermis. Zudem sind grüne Regionen in der Dermis auszumachen, welche entweder aus demselben Grund entstanden sind wie bei Fig. 9, C2, oder es handelt sich um ein Blutgefäss und der Antikörper hatte an dieses gebunden.

4 Diskussion und Ausblick

4.1. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein erster Versuch gestartet, zu überprüfen, ob die mechanische Stabilität eines Hautsubstituts mit eingeführten Retezapfen höher ist als die eines Hautsubstituts ohne Retezapfen. Aufgrund dessen wurde eine neue Methodik entwickelt, um die Retezapfen in ein dermo-epidermales Hautsubstitut einzuführen. Die neue Methodik bestand darin, den für die plastische Kompression bisherigen Stempel durch einen modifizierten Stempel zu ersetzen, welcher eine wellenähnliche Struktur in das Kollagen einprägen sollte.

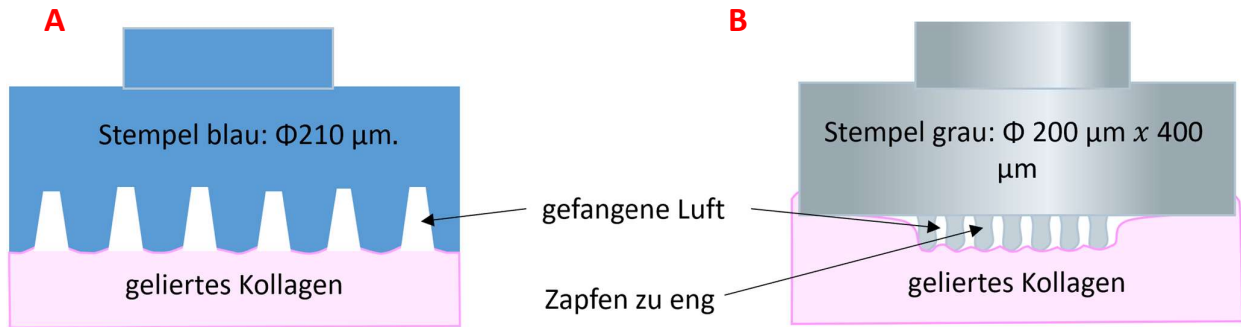
Meine Resultate der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigen, dass keines unserer dermo-epidermalen Hautsubstitute Retezapfen aufwies. Auf der Suche nach einer Erklärung für dieses Resultat möchte ich einen menschlichen Fehler ausschliessen. Durch leichtes Zittern beim Entfernen der Stempel nach der plastischen Kompression der Hydrogele hätten die Retezapfen zerstört werden können. Auf diese Gefahr wurde besonders geachtet, weshalb sie nicht die Ursache für dieses Resultat ist. Beim Betrachten der histologischen Färbungen ist zu erkennen, dass sich bei allen Substituten die Epidermis von der Dermis gelöst hat. Auf den ersten Blick scheint dies der Grund für das Fehlen der Retezapfen zu sein. Die Substitute waren zu fragil, um der mechanischen Belastung der histologischen Präparation standzuhalten. Die Fragilität der Hautsubstitute, die *in vitro* gezüchtet werden, ist ein bekanntes Problem. Es werden bessere Resultate erzielt, wenn die Substitute auf Ratten transplantiert werden, da die Qualität der Substitute *in vivo* aufgrund der natürlichen Nährstoffversorgung immer höher ist [25]. Dies hätte aber den Rahmen dieser Maturitätsarbeit überschritten. Dennoch konnte eine Trennung der Epidermis von der Dermis nicht das Verschwinden von 400 μm Zapfen erklären.

Eine biologische Ursache für dieses Resultat ist unwahrscheinlich. Sowohl die Keratinozyten als auch die Fibroblasten wiesen während der Kultivierung eine hohe Proliferationsrate und eine normale Morphologie auf. Die Keratinozyten bildeten kompakte Kolonien und adhärten aneinander. Diese Beobachtungen stimmen mit dem Verhalten der Keratinozyten und Fibroblasten in der natürlichen Haut überein. Daraus kann geschlossen werden, dass die kultivierten Zellen gesund waren. Die Antikörperfärbung an den Gefrierschnitten der Hautsubstitute bestätigte diese Annahme. Sie zeigt, dass die Zellen die getesteten Proteine einer stabilen dermo-epidermalen Junctionszone ($\beta 4$ und Lam 5) sowie einer normalen Schichtung der Epidermis (K10) synthetisiert haben. Die Lokalisation der geprüften Proteine wies eine leichte Abweichung zur natürlichen Haut auf. Dafür hätten die Substitute länger *in vitro* gehalten werden müssen.

Nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Fibroblasten die Form der dermalen Papillen, das dermale Gegenüber der Retezapfen, durch das Verdauen des bovinen Kollagens, mit welchem die Fibroblasten für die Herstellung der Hydrogele gemischt wurden, sowie die Sekretion ihres eigenen humanen Kollagens verändert haben. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass eine so ausgeprägte Veränderung innerhalb von nur zwei Wochen sehr unwahrscheinlich ist.

Die plausibelste Erklärung für dieses Resultat ist, dass schon bei der plastischen Kompression die wellenartige Struktur nicht oder nur ansatzweise gebildet wurde. Möglich ist, dass das Kollagen-Hydrogel bereits vor dem Kompressionsschritt zu kompakt war und gleichzeitig die Zapfen des grauen Stempels zu eng nebeneinander lagen, weshalb die Zapfen nicht in das Kollagengel eindringen konnten. Beim blauen Stempel war es gar nicht möglich, dass das Kollagen in die Löcher eindrang, da die Luft, die sich in den Löchern befand, nicht entweichen konnte (Fig. 10, A und B). Um diese Möglichkeit zu prüfen, könnte ein Hydrogel direkt nach der Kompression fixiert werden. Dies würde zeigen, ob eine Wellenstruktur durch den Stempel entsteht, und wie ausgeprägt diese ist. Zudem könnte versucht werden, den Stempel schon während der vierstündigen Inkubation, welche direkt vor der plastischen Kompression stattfindet, auf das Kollagen-Hydrogel zu platzieren. Da zu diesem Zeitpunkt das Kollagen noch flüssig ist, kann besser zwischen die Zapfen des Stempels eindringen.

An dieser Stelle muss zudem erwähnt werden, dass nur ein Versuch mit sechs Hydrogelen durchgeführt wurde. Für aussagekräftige Resultate müsste eine ganze Versuchsreihe durchgeführt werden, was den Rahmen dieser Maturitätsarbeit gesprengt hätte.



FIGUR 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER INTERAKTION DER VERSCHIEDENEN STEMPSEL MIT DEM KOLLAGEN (VERGLEICHE FIG. 6)
 DIE ANNAHME IST, DASS DAS KOLLAGEN IM VERSUCH ZU STARK GELIERT WAR, SODASS BEI BEIDEN STEMPSELN KEINE STRUKTUREN IN DAS KOLLAGEN EINGEFÜHRT WERDEN KONNTEN. **A** ZEIGT DAS KOLLAGEN-HYDROGEL KOMPRIMIERT MIT DEM BLAUEN STEMPSEL, LUFT KANN NICHT ENTWEICHEN. **B** ZEIGT DAS KOLLAGEN-HYDROGEL KOMPRIMIERT MIT DEM GRAUEN STEMPSEL.

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG

4.2. Ausblick

Es freut mich erwähnen zu dürfen, dass eine Masterstudentin an derselben Fragestellung, die in dieser Maturitätsarbeit untersucht wurde, weiterforscht. Ihr ist es gelungen, die Retezapfen in das Kollagen einzuführen. Leider sind diese noch sehr instabil und fallen mit der Zeit zusammen. Sobald dieses Problem gelöst ist und Substitute mit stabilen Retezapfen vorhanden sind, wird als nächster Schritt getestet werden, ob die mechanische Stabilität eines Hautsubstitutes mit Retezapfen höher ist als ein Hautsubstitut ohne. Dieser Test könnte so verlaufen, dass mit einer Maschine die Epidermis von der Dermis abgezogen wird und diese gleichzeitig misst, wie viel Kraft sie für das Abziehen aufwenden muss. Bei welchem der Kraftaufwand höher ist, bei dem ist auch die mechanische Stabilität der dermo-epidermalen Junctionszone höher. Erweisen sich die Hautsubstitute mit Retezapfen als stabiler, wäre es möglich, dass diese künftig in der klinischen Praxis angewendet werden könnten. Dies besonders in Bereichen, in denen ein Hautsubstitut mit hoher mechanischer Stabilität verlangt ist, wie es in der fetoskopischen Chirurgie der Fall ist.

Danksagung

Als erstes möchte ich meiner Betreuungsperson im Labor, Dr. Luca Pontiggia, danken, dass er die vielen Stunden auf sich genommen hat, um mich mit den verschiedenen Methoden im Labor und den Laborgeräten vertraut zu machen. Luca ist ein exzellenter Forscher und Betreuer und hat mich immer unterstützt, während des praktischen Teils dieser Arbeit sowie während des Schreibprozesses. Danke, Luca, dass du es mir möglich gemacht hast, als erste Maturandin in diesem Labor (TBRU) forschen zu dürfen. Es war mir eine Ehre.

Ich möchte auch meiner Betrauungslehrperson Aline Widmer danken. Sie hat mich motiviert und ermutigt meine Maturitätsarbeit im Labor zu machen. Frau Widmer ist eine passionierte Biologielehrerin und konnte mich mit ihrer Freude am Fach Biologie anstecken. Danke, Frau Widmer, dass sie sich Zeit genommen haben, meine Mentorin zu sein.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinen Eltern und bei Isabel Flynn bedanken. Ihr habt mich während der gesamten Zeit stets motiviert und unterstützt. Dir, Isabel, möchte ich ganz besonders dafür danken, dass du dir die Zeit genommen hast, diese Arbeit gegenzulesen.

Vielen herzlichen Dank!

Literaturverzeichnis

- [1] M. K. C. G. P. Kolarsick, «Anatomy and Physiology of the Skin,» Semantic Scholar, 01 07 2011. [Online]. Available: <https://www.semanticscholar.org/paper/Anatomy-and-Physiology-of-the-Skin-Kolarsick-Kolarsick/e438ad9b53321bc162acd89e0d057a8db0f4d67d>. [Zugriff am 10 09 2022].
- [2] Amboss, «Haut und Hautanhangsgebilde,» Amboss, 28 03 2022. [Online]. Available: <https://next.amboss.com/de/article/so0tWS?q=haut%20und%20hautanhangsgebilde#Zc84f475e5c61d8f8f65c8d5f33322396>. [Zugriff am 10 08 2022].
- [3] F. Graf, «Interrelationship between blood and lymphatic vascular systems in bioengineered skin substitutes,» o.T. 08 2021. [Online]. Available: file:///C:/Users/smvw0/Downloads/BME%20500_%20Masterarbeit_Fabian%20Graf.pdf. [Zugriff am 01 03 2022].
- [4] D. F. Antwerpes, «Keratinocyten,» DocCheck Flexikon, 21 02 2022. [Online]. Available: <https://flexikon.doccheck.com/de/Keratinozyt>. [Zugriff am 20 08 2022].
- [5] A. A. H. Y. D. R. E. R. U. M. a. T. B. L. Pontiggia, «Human Basal and Suprabasal Keratinocytes Are Both Able to Generate and Maintain Dermo–Epidermal Skin Substitutes in Long-Term In Vivo Experiments,» *cells*, pp. 2-18, 09 07 2022.
- [6] M. Giner, «Signalmechanismen der epithelialen Proliferation und Differenzierung,» o.P., 21 10 2007. [Online]. Available: https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/2315/file/Dissertation_Giner_Martin_.pdf. [Zugriff am 10 08 2022].
- [7] D. F. Antwerpes, «Zytokeratin-Antikörper,» 01 06 2021. [Online]. Available: <https://flexikon.doccheck.com/de/Zytokeratin-Antik%C3%B6rper>. [Zugriff am 11 09 2022].
- [8] D. d. B. B. E. K.C. Ormerod BM, «Involucrin,» ScienceDirect, 06 07 2018. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/involucrin>. [Zugriff am 10 09 2022].
- [9] J. Welzel, «Struktur und Funktion der Haut,» Springer Link, 01 01 2000. [Online]. Available: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-59747-3_2. [Zugriff am 10 09 2022].
- [10] E. Rudolf-Müller, «Dermis,» NetDoktor, 22 02 2022. [Online]. Available: <https://www.netdoktor.ch/anatomie/dermis/>. [Zugriff am 10 09 2022].
- [11] E. Rudolf-Müller, «Subcutis,» NetDoktor, 22 02 2022. [Online]. Available: <https://www.netdoktor.ch/anatomie/subcutis/>. [Zugriff am 10 09 2022].
- [12] M. K. S.D. Imahara, «Skin graft,» ScienceDirect, 28 01 2009. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/skin-graft>. [Zugriff am 14 09 2022].
- [13] Amboss, «Wundheilung,» Amboss, 12 09 2022. [Online]. Available: <https://next.amboss.com/de/article/ph0LUf?q=wundheilung#Zc8767a13988818fb962cd153954d06bb>. [Zugriff am 14 09 2022].
- [14] H. G. J.G. Rheinwald, «Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma,» *cells*, p. o.A., 06 11 1975.
- [15] S. B. M. C. T. F. J.F. Hansbrough, «Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagenglycosaminoglycan substrate,» PubMed, 20 10 1989. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2677425/#affiliation-1>. [Zugriff am 14 09 2022].
- [16] o.A., «Basic research leads to innovative therapeutic approaches,» tissue biology research unit, o.T. o.M. 2022. [Online]. Available: <http://www.skengineering.ch/>. [Zugriff am 11 09 2022].
- [17] M. Hertl, «Keratinocyten: Assoziation und Dissoziation,» Springer, 01 01 2003. [Online]. Available: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-55661-6_3. [Zugriff am 02 09 2022].
- [18] A. Bauer, «Zellen: Hypotonisch, Hypertonisch und Isotonisch - Unterschied,» Naturwissenschaften24, o.T. o.M. 2022. [Online]. Available: <https://naturwissenschaften24.com/zellen-hypotonisch-hypertonisch-isotonisch-unterschied-xz2/>. [Zugriff am 24 06 2022].
- [19] o.A., «PBS-Puffer,» Chemie.de, 24 01 2021. [Online]. Available: <https://www.chemie.de/lexikon/PBS-Puffer.html>. [Zugriff am 24 06 2022].

- [20] o.A, «elastische und plastische Verformung,» Studyflix, o.T. o.M. o.J.. [Online]. Available: <https://studyflix.de/ingenieurwissenschaften/elastische-und-plastische-verformung-1125>. [Zugriff am 24 09 2022].
- [21] E. Braziulis, «Modified Plastic Compression of Collagen Hydrogels Provides,» Mary Ann Liebert, Tissue Biology Research Unit, 2012.
- [22] D. m. N. Ostendorf, «Basophilie,» DocCheck Flexikon, 17 05 2021. [Online]. Available: <https://flexikon.doccheck.com/de/Basophilie>. [Zugriff am 18 09 2022].
- [23] D. m. N. Ostendorf, «Azidophil,» DocCheck Flexikon, 24 01 2021. [Online]. Available: <https://flexikon.doccheck.com/de/Acidophil>. [Zugriff am 18 09 2022].
- [24] M. Anhäuser, «Immunfluoreszenz,» Spektrum, Lexikon der Biologie , o.T. o.M. o.J.. [Online]. Available: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/immunfluoreszenz/33800>. [Zugriff am 09 10 2022].
- [25] L. Pontiggia, *Bioengineering von klinisch anwendbaren Hauttransplantaten*, Schlieren ZH: o.V., 2021.

Anhang

| | |
|---|----|
| Anhang 1: Zeitplan und Protokoll | 28 |
| Anhang 2: Protokoll Isolation Keratinozyten | 30 |
| Anhang 3: Methodik Kultivierung der Fibroblasten..... | 31 |
| Anhang 4: Kompression der Hydrogele | 32 |
| Anhang 5: Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 33 |
| Anhang 6: Immunhistochemie, Antikörperfärbung..... | 34 |
| Anhang 7: Bilder zum Arbeitsprozess | 35 |
| Anhang 8: Maturitätsvereinbarung | 36 |
| Anhang 9: Redlichkeitserklärung | 38 |

Anhang 1: Zeitplan und Protokoll

| Datum | Was wurde gemacht? | Bemerkungen | Arbeit |
|-----------|---|--|--------|
| 1.2.2022 | Vorhautbiopsie zerkleinern und in Dispase über Nacht inkubieren → Epidermis von Dermis trennen (siehe Kapitel 2.4.1) | Ein Gewebestück der Biopsie wurde in TissueTek eingefroren. Die natürliche Haut dient bei der Auswertung der Resultate als Vergleichswert. | Labor |
| 2.2.2022 | Keratinocyten aus Epidermis isolieren und Fibroblasten aus Dermis isolieren (siehe Kapitel 2.4.3. und 2.4.4.) | Siehe Anhang 2 und 3 | Labor |
| 4.2.2022 | Mediumwechsel (MedW) (siehe Kapitel 2.4.5.) | MedW gilt immer für Keratinocyten und Fibroblasten | Labor |
| 7.2.2022 | MedW und Splitten der Keratinocyten (siehe Kapitel 2.4.6.) | Kulturschale der K war 90 % konfluent -> K mussten gesplittet werden | Labor |
| 9.2.2022 | MedW | | Labor |
| 11.2.2022 | Fibroblasten mit Kollagen 1 mischen → Hydrogel Anschließend plastische Kompression mit Stempeln (siehe Kapitel 2.4.7., Anhang 4) | Siehe Anhang 4 | Labor |
| 14.2.2022 | Medw | Einführen des neuen Nährmediums der Hautsubstitute. Nicht mehr DMEM+++ sondern neu RGM (siehe Tabelle 2) | Labor |
| 16.2.2022 | Medw | | Labor |
| 18.2.2022 | Keratinocyten säen (siehe Kapitel 2.4.7.) | Durch säen der Keratinocyten wurden aus dermalen Hautsubstituten dermo-epidermale Hautsubstitute. In der Wartezeit konnte Hämatoxylin-Eosin-Färbung an der natürlichen Haut gemacht werden. siehe Anhang 5 | Labor |
| 19.2.2022 | MedW | | Labor |
| 21.2.2022 | MedW | | Labor |
| 23.2.2022 | MedW | | Labor |
| 25.2.2022 | MedW | | Labor |
| 28.2.2022 | MedW | | Labor |
| 2.3.2022 | MedW | | Labor |
| 4.3.2022 | MedW | | Labor |
| 7.3.2022 | Wachstum stoppen, Hautsubstitute einbetten für Kryoschnitte oder Paraffinschnitte, Kryoschnitte machen | | Labor |
| 8.3.2022 | Immunfluoreszenzfärbung 1 und Paraffinschnitte | Immunfluoreszenzfärbung durchführen und gefärbte Schnitte in den Kühlschrank. Siehe Anhang 6 | Labor |

| | | | |
|----------|---|---|-------|
| 9.3.2022 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Immunfluoreszenzfärbung 2 | Mit Antikörpern gefärbte Schnitte unter Fluoreszenzmikroskop anschauen und die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte unter Mikroskop | Labor |
|----------|---|---|-------|

Anhang 2: Protokoll Isolation Keratinozyten

Isolation:

1. After circumcision foreskin in Transport medium (protocol 26) (can be stored up to 5 days).
2. Rinse Foreskin 2-3 times in PBS without $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (containing 20 μg Gentamycin)
3. Cut foreskin in small pieces (approx. 3-4 mm \varnothing) and put them in a 50 ml tube.
4. Add 5 ml diluted dispase
5. Incubate for 15-18 h at 4°C.
6. Separate mechanically epidermis and dermis (for fibroblasts see protocol 02)
7. Distribute the epidermis in 15 ml tubes containing 2 ml **pre-warmed** Trypsin/EDTA 2x (alternative: Trypsin/EDTA 10x).
8. Digest for 10 min at 37°C. Mix every 2 min (alternative: digest for max. 2 min, mix every 30 sec)
9. Stop digestion with ≥ 2 ml 2x SBTI (alternative: 10x SBTI).
10. Add PBS to a volume of 10 ml.
11. Pass through a sterile 50 μm filter.
12. Spin cells down (400 g, 3 min), discard supernatant.
13. Resuspend cells in 1 ml Medium for counting. Add 9 ml of Medium.
14. Centrifuge again, resuspend in Medium.
15. Plate 6ml of medium per 75 cm² flask, containing ca. 5 Mio cells (or 3 Mio if you use collagen I-coated flasks). Incubate at 37°C, 5% CO₂. (Add 4 ml medium the day after)
16. Change medium (8-10 ml) every 2–3 days.
17. Split at 80-90% confluency.

Passaging:

18. Wash cells 1x using PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.
19. Add 6 ml of PBS and 20-40 μl of EDTA 0.5M, incubate at 37°C for 20-30 min.
20. When the cells are rounded up, add 50-100 μl of Trypsin/EDTA 10x, incubate at 37°C ca. 2 min.
21. When cells detach from the bottom by slight hitting at the flask/dish border, add SBTI 10x (the same volume or more as T/E 10x) to neutralize Trypsin and 5.3 μl of Ca^{2+} 2M (for each 20 μl of EDTA).
22. Transfer the cells in a 15 ml tube.
23. Centrifuge at 400g for 3 min.
24. Re-suspend the cells, wash once with PBS of Medium and count.
25. Plate to ca. 30 % confluency on collagen coated flasks (previous flask can be re-used if necessary).

Material:

| | |
|----------------------------------|---|
| SFM-Medium: | 500 ml SFM 800 μl Bovine Pituitary Extract (to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 30 μl rEGF (to 0.1-0.2 ng/ml) 250 μl Gentamycin (to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) |
| Trypsin/EDTA 2x: | diluted in DPBS w/o Ca^{2+} und Mg^{2+} from 10x |
| Soybean-Trypsin-Inhibitor (SBTI) | From 1 g (Gibco 17075-029) |
| Dispase (for 5 ml): | 2.5 ml Dispase (25 caseolytic Units/ml, BD Falcon, 354235) 2.5 ml HBSS ⁻ 2.5 μl Gentamycin |

Anhang 3: Methodik Kultivierung der Fibroblasten

Isolation (after epidermis/keratinocyte isolation, see protocoll Anhang 2):

26. Prepare a fresh collagenase (2mg/ml) in DMEM containing 2% FCS (or new: Liberase)
27. Transfer the dermis to collagenase solution
28. Incubate for 45min-60min at 37°C, 5% CO₂; shake regularly
29. When the digested dermis can be sucked through the tip of a 25ml pipette tip, digestion is far enough for fibroblasts to be isolated.
30. .strain....
31. Centrifuge 1000rpm, 5-10min, room temperature
32. Remove medium, resuspend in 10ml DMEM-Medium.
33. Plate on 100mm petridishes

Passaging:

34. Remove medium, wash cells 1-2 times using PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺
35. Add 2 ml Trypsin/EDTA ?x, incubate at 37°C
36. Add 5 ml DMEM/FCS, rinse rest from plate
37. Centrifuge at 500rpm, 10min.
38. Resuspend the cells in 5-10 ml DMEM-Medium at approx. 1-3 x 10⁶ Zellen / flask, endvolume 10 – 15ml medium

Material:

- | | |
|--------------|--|
| Medium: | 500 ml DMEM 50 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin (oder Gentamycin 250 µl) 5 ml HEPES Buffer 1 M |
| Collagenase: | 10 mg Collagenase + 1 ml DMEM/10% FCS + 4 ml DMEM ^{w/o} pass through a sterile filter. New: 1 aliquot liberase for 4 ml Medium |

Anhang 4: Kompression der Hydrogele

Verhältnisse: 0.6 ml buffer
 0.4 ml DMEM mit F (0.109 Mio/ml)
 2.0 ml Kollagen type I*

| | validiert | validiert | validiert | | validiert |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-------|-----------|
| Anzahl Gele | 3 | 4-5 | 6-7 | 10-11 | 12 |
| CV-Puffer | 3.00 | 4.50 | 6.00 | 9 | 10.50 |
| Fibros/DMEM | 2.00 | 3.00 | 4.00 | 6 | 7.00 |
| Kollagen | 10.00 | 15.00 | 20.00 | 30 | 35.00 |
| Tot | 15.00 | 22.50 | 30.00 | 45 | 52.50 |
| Transfer | 10.35 | 17.25 | 20.70 | 34.5 | 41.40 |

10 mit RT, ≥ 2 h 37°C, bereit für Kompression

* BD : unverdünnt (4mg/ml)

* Symathèse: 100 ml Kollagen (5mg/ml) + 25 ml AA 0.189M° (gleiche [Kollagen] wie BD) oder 100 ml Kollagen +
 0.41 ml 10M AA°° ([coll] +20%)

° [496.4 ml ddH₂O + 5.4 ml AA 100%]

°° [4.3 ml ddH₂O + 5.7 ml AA 100%]

Anhang 5: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Material:

| | |
|------------|---|
| Solutions: | A Hematoxylin (Sigma, MHS-32) |
| | B Eosin B (Sigma, E-8761) |
| | C EtOH 70% |
| | D EtOH 96% |
| | E EtOH 100% |
| | F Xylol 100% |
| | G Eukitt-quick-hardening mounting medium (Fluka 03989) |

Procedure:

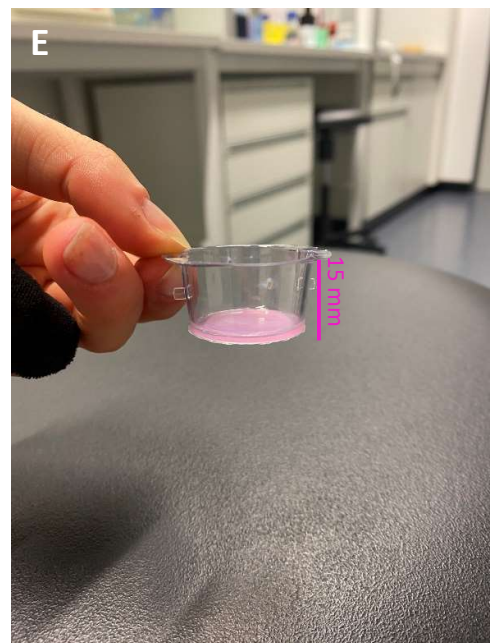
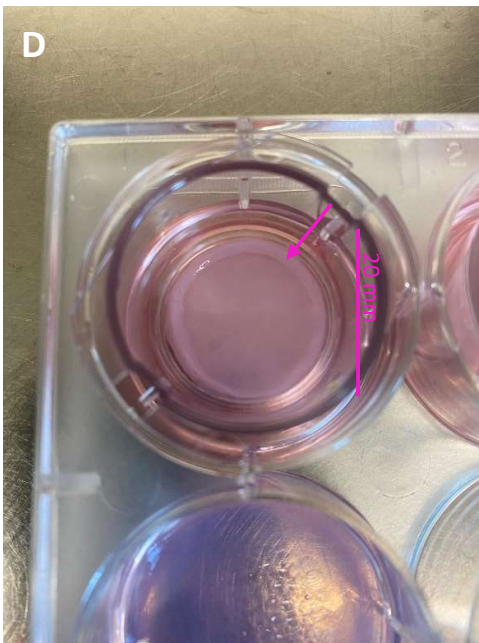
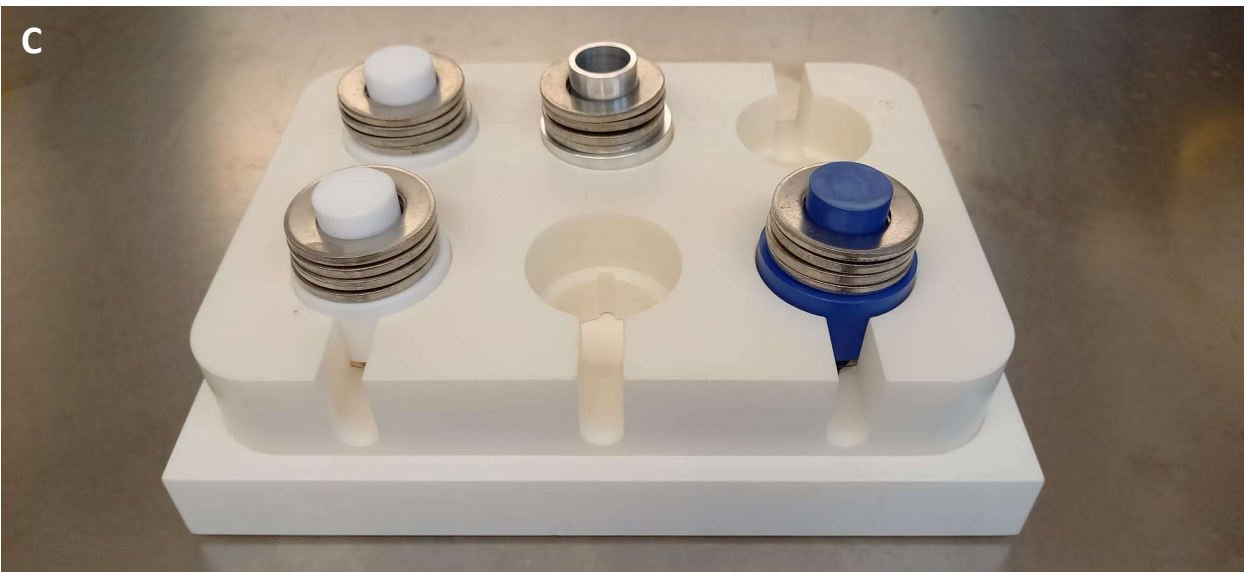
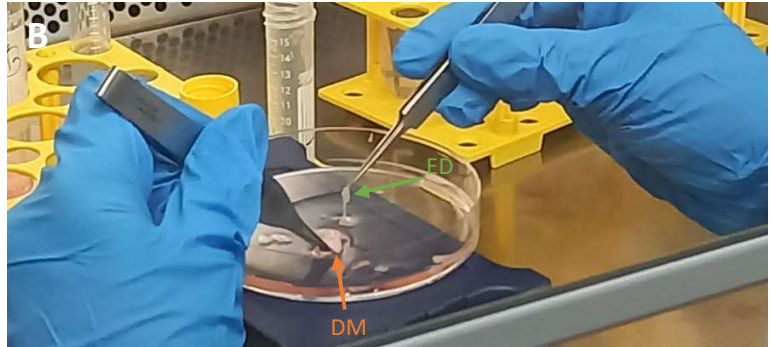
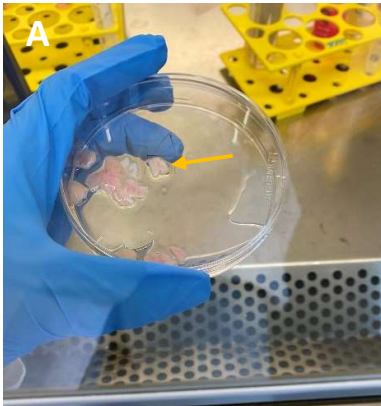
39. Dip for 1 min in **A** Hematoxylin
40. Rinse with H₂O until violet stain almost disappeared
41. Dip shortly (1 sec) in **B** Eosin
42. Rinse with H₂O
43. Dehydrate sequentially in **C** EtOH 70%, **D** EtOH 96%, **E** EtOH 100% each for approx. 15 sec
44. Dip in **F** Xylol until all the slides are ready
45. Dry completely at air (2-3 min)
46. 3-4 drops of **G** mounting medium
47. Apply the coverslide (avoid bubbles)
48. Let dry for few minutes

Anhang 6: Immunhistochemie, Antikörperfärbung

Procedure:

1. 30' 42°C
2. 3x 5' PBS
3. 5 min acetone:methanol 1:1 -20°C (or acetone, EtOH, MeOH alone)
4. dry 30'' + Dakopen
5. 1x PBS
6. 30 min in 2% BSA/PBS at RT or 5%FCS in DMEM
7. Ab1 40 min RT
8. 3x 5 min PBS than immediately in 2% BSA/PBS
9. optional: 15 min in 2% BSA/PBS at RT
10. Ab2 30 min RT
11. 3x 5 min PBS than immediately in 2% BSA/PBS
12. optional 15' in 2% BSA/PBS at RT
13. Ab3 30 min RT
14. 1x Höchst 2 µg/ml in PBS for 5 min
15. 2x 5 min PBS
16. Mount

Anhang 7: Bilder zum Arbeitsprozess





Anhang 8: Maturitätsvereinbarung

Name: von Wartburg

Vorname: Sophie

Klasse: 6b

Betreuung: Aline Widmer

Arbeitstitel:

Einführung von Retezapfen in einen menschlichen dermo-epidermalen Hautsubstitut

1. Thematische Beschreibung, Eingrenzung, Leitfrage und Teilfragen

Um was geht es. Was will ich untersuchen / herausfinden?

Ein künstliches Hautsubstitut hat keine Retezapfen (Bild). Zudem ist es fragil und leidet besonders in den ersten 1-2 Wochen nach der Transplantation unter Nährstoffmangel. Durch die Einführung der Retezapfen sollte die Dermo-epidermale Junktionszone stabiler und widerstandsfähiger sein. Gleichzeitig sollte durch die vergrößerte Oberfläche das Hautsubstitut besser mit Nährstoffen versorgt werden.

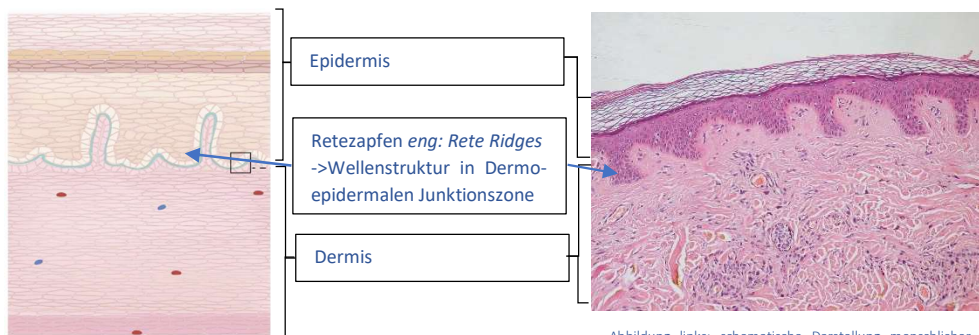


Abbildung links: schematische Darstellung menschlicher Haut

Abbildung rechts: Histologisches Präparat der Kutis

2. Wissensstand, mögliche Literatur/Quellen

Labor, Internet, Bücher

3. Methodisches Vorgehen, Ressourcen

Wie gehe ich vor? Materialien-. Ressourcenbeschaffung?

Hautzellen aus Hautbiopsie isolieren, Zellen kultivieren, Gele herstellen, Paraffinschnitte-> Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Kryoschnitte-> Antikörperfärbung

4. Ergebnis, Produkt

Was soll bei meiner Arbeit herauskommen? Was ist das Endziel der Arbeit?

Das «Produkt», ein im Labor gezüchtetes Hautsubstitut produzieren, hat man bereits vor mir geschafft. Deshalb versuche ich, dass «Produkt» zu «verbessern». Ich habe das Pilotprojekt übernommen, welches zum Ziel hat, die Retezapfen in die Substitute einzuführen. Was dies für Vorteile unter Frage eins beantwortet.

5. Beurteilungskriterien

Auf welche Kriterien (zusätzlich zu den vorgegebenen) soll bei der Beurteilung der Arbeit besonders geachtet werden? (vgl. Beurteilungsformular)

-

6. Zeitplan

In einer Tabelle den groben Ablauf des Zeitplans darstellen inkl. aller Termine für Abgaben. Evtl. auf separatem Dokument.

[Siehe Anhang 1 Protokoll Zeitplan](#)

Der Schüler/die Schülerin ist dazu verpflichtet von den Sitzungen mit der betreuenden Lehrperson innert Wochenfrist ein Protokoll zu schreiben und dieses der Lehrperson zur Durchsicht vorzulegen.

Mit der Unterschrift bestätigen Schüler*in und betreuende Lehrperson, dass sie bis zum Abschluss der Maturitätsarbeit, wie vereinbart, zusammenarbeiten.

Datum

29.3.2022

Schüler/Schülerin

S.von Wartburg

Datum

29.3.2022

Betreuende Lehrperson

A. Widmer

Anhang 9: Redlichkeitserklärung

Name von Wartburg**Vorname** Sophie**Klasse** 6b**Titel der Arbeit:** Einführung von Retezapfen in einen menschlichen dermo-epidermalen Hautsubstitut

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit gemäss dem KUE-Reglement verfasst habe, das heisst im Besonderen:

- Ich habe diese Arbeit selbständig verfasst.
- Alle Hilfsmittel, die ich verwendet habe, sind angegeben.
- Alle wörtlichen und sinngemässen Übernahmen aus anderen Werken sind als solche gekennzeichnet.
- Personen, die einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben (Betreuer/- in ausgenommen), habe ich ebenfalls erwähnt.

Datum:

10.10.2022

Unterschrift: