

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
des Universitätsklinikums Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele



**Einfluss von Spendermerkmalen und Kulturmedien auf die
histomorphologische Qualität von humanen artifiziiellen Vollhautmodellen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Frederik Weil
aus Heilbronn

Würzburg, März 2018

Referent: Prof. Dr. med. Stephan Mielke
Korreferent: Prof. Dr. med. Matthias Goebeler
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2018
Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Haut als menschliches Organ	1
1.1.1	Epidermis.....	2
1.1.2	Dermis	5
1.1.3	Basalmembran.....	5
1.2	Hauterkrankungen	6
1.3	Tissue Engineering von humanen Geweben	8
1.4	Artifizielle organotypische Hautmodelle und ihre Anwendung	11
1.5	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Geräte.....	15
2.1.2	Gebrauchswaren	15
2.1.3	Einmalartikel	16
2.1.4	Reagenzien	17
2.1.5	Antikörper für Immunfluoreszenz	18
2.1.6	Kultivierungsmedien	18
2.2	Ethikvotum	26
2.3	Herstellung organotypischer Vollhautmodelle	27
2.3.1	Zellisolation humaner Zellen und Zellkultur	29
2.3.2	Herstellen eines humanen artifiziellen Vollhautmodells <i>in vitro</i>	31
2.4	Histologische Aufarbeitung des humanen artifiziellen Vollhautmodells	36
2.5	Statistische Methoden	37
3	Ergebnisse	41
3.1	Probensammlung	41
3.2	Einfluss des Kulturmediums auf die Qualität von Vollhautmodellen	42

Inhaltsverzeichnis

3.2.1	Erfolgreiche Herstellung von Vollhautmodellen mit EpiLife [®] -, KGM ² - und KGM ² variant-Medium	43
3.2.2	Einfluss des Kulturmediums auf die Epidermis-Dicke	45
3.2.3	Einfluss des Kulturmediums auf die Dermis-Dicke	52
3.2.4	Einfluss des Kulturmediums auf den epidermalen Differenzierungsgrad	56
3.2.5	Einfluss des Kulturmediums auf die dermo-epidermale Adhärenz	58
3.3	Einfluss der Dermis-Dicke auf die Epidermis-Dicke	61
3.4	Einfluss des Spenderalters auf die Qualität von Vollhautmodellen	63
3.4.1	Einfluss des Spenderalters auf die Epidermis-Dicke	64
3.4.2	Einfluss des Spenderalters auf die Dermis-Dicke	66
3.4.3	Einfluss des Spenderalters auf den epidermalen Differenzierungsgrad	67
3.4.4	Einfluss des Spenderalters auf die dermo-epidermale Verbindungsstärke	69
3.5	Einfluss einer Spender-Medium-Interaktion auf die Qualität von Vollhautmodellen	70
4	Diskussion	75
5	Zusammenfassung	89
6	Anhang	93
6.1	Literaturverzeichnis	93
6.2	Abbildungsverzeichnis	104
6.3	Tabellenverzeichnis	106
6.4	Abkürzungsverzeichnis	107
6.4.1	Abkürzungen	107
6.4.2	Einheiten	108
	Danksagung	109
	Lebenslauf	113

1 Einleitung

1.1 Die Haut als menschliches Organ

Die Haut ist das größte Organ des Menschen (Lopez-Ojeda *and* James 2017). Sie ist aus diversen Geweben schichtförmig zusammengesetzt und bedeckt gleichmäßig den gesamten menschlichen Körper. Damit steht sie in direktem Kontakt zur Außenwelt und muss vielfältige Aufgaben bewältigen (Proksch, Brandner *et al.* 2008). Ihre Aufgaben variieren je nach Lokalisation. So müssen beispielsweise mechanisch beanspruchte Stellen besser geschützt werden und sensible Regionen dürfen mit keiner zu großen Hornschicht überzogen sein. Einerseits stellt die Haut eine Schutzbarriere beispielsweise gegen UV-Strahlung dar, andererseits muss sie selektiv Stoffe wie bakterielle Antigene passieren lassen, damit sich ein intaktes Immunsystem ausbilden kann (Candi, Schmidt *et al.* 2005). Das Immunsystem wird dabei trainiert, eine natürliche Hautflora wird toleriert. Das Mikrobiom der Haut ist dabei maßgeblich an der Entwicklung des Immunsystems beteiligt (Grice *and* Segre 2011). Der Körper wehrt mit einer natürlichen Hautflora und dem menschlichen Immunsystem pathogene Keime ab.

Über ein in der Haut etabliertes Nervensystem werden sensible Informationen der Umwelt aufgenommen und an das Gehirn weitergegeben. Somit fungiert die Haut auch als Kontakt- und Sinnesorgan. Durch Drüsengewebe werden Pheromone, Talg und Schweiß an die Umwelt abgegeben (Lopez-Ojeda *and* James 2017). Die Haut prägt zudem stark unser äußeres Erscheinungsbild und gilt als Repräsentationsorgan eines jeden Einzelnen. Fingerabdrücke, Leberflecken und andere Merkmale verleihen den Menschen Individualität. In der Gesellschaft hat das äußere Erscheinungsbild einen hohen Stellenwert, weshalb auch in der Pharma- und Kosmetikindustrie zunehmend Produkte für die Haut entwickelt werden. In der Kosmetikindustrie ist die Nachfrage an Produkten, mit denen Hautprozesse modifiziert werden können, immens.

Weitere Funktionen der Haut finden sich im Wärme- sowie im Wasserhaushalt. Störungen in der Morphologie können damit zu lebensbedrohlichen Zustände

führen (Visscher *and* Narendran 2014). In der Haut findet zudem die Produktion von Hormonen und Wachstumsfaktoren sowie von Vitamin D, das eine wichtige Rolle im Kalzium- und Knochenstoffwechsel spielt, statt.

Die native menschliche Haut ist aus diversen Schichten, der Cutis und der Subcutis, aufgebaut. Die Cutis wiederum wird in Dermis und Epidermis aufgeteilt. Die zur Außenwelt nächste Schicht wird durch die Epidermis gebildet. Sie ist mit der darunterliegenden Schicht, der Dermis, über eine Basalmembran verbunden. Die Dermis geht fließend in die Subcutis über. Diese besteht hauptsächlich aus lockerem Bindegewebe und Fett und dient der Verankerung der Cutis an tiefer gelegene Strukturen wie Faszien oder Periost.

1.1.1 Epidermis

Die Epidermis hat *in vivo* eine Dicke von ca. 75 bis 600 μm . Als der Außenwelt zugewandtes Epithel besteht die Epidermis aus mehreren Schichten mit größer werdender Schicht-Anzahl bei höherer Belastung, um der mechanischen Schutzfunktion gerecht zu werden. Hautbiopsate von unterschiedlichen Körperstellen zeigen eine unterschiedliche Dicke der Epidermis mit dem größten Längenmaß bei mechanisch beanspruchter Haut. Zu ca. 90 % besteht die Epidermis aus Keratinozyten, zu 10 % aus Merkelzellen, Langerhans-Zellen und Melanozyten (Lopez-Ojeda *and* James 2017). Es finden sich keine Blutgefäße in der Epidermis. Die Zellen der Epidermis werden lediglich über Diffusion ernährt. Keratinozyten bilden das Strukturgerüst, indem sie durch Proliferations- und Differenzierungsvorgänge je nach Körperlokalisierung vier bis fünf Schichten ausbilden (Zhang *and* Michniak-Kohn 2012). Diese Differenzierung geht mit Zellwanderung der Keratinozyten von basal nach apikal einher, welche unter anderem durch *Gap junctions*, tunnelähnliche Zell-zu-Zellverbindungen, koordiniert wird (Kumar *and* Gilula 1996). Die drei basalen Schichten der Epidermis enthalten vitale Keratinozyten, die am meisten apikal gelegene Schicht enthält tote Hornzellen und ist damit das Endziel der Differenzierung. Die Schichten demarkieren sich durch ihre unterschiedliche Morphologie im

Zellverband. Die unterste Schicht enthält als einlagiges Stratum basale die multipotenten Stammzellen (Alonso *and* Fuchs 2003). Sie besteht aus basalen, zylinderförmigen Keratinozyten und bildet zusammen mit der Basalmembran und der papillären Dermis die dermo-epidermale Verbindungszone, welche eine entscheidende Rolle in der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten spielt (Noel-Hudson, Dusser *et al.* 1995). Die dem Stratum basale anliegende Schicht ist das Stratum spinosum. Hier liegen physiologisch zwei bis fünf Lagen polygonaler Zellen übereinander. Den Namen erhielt das Stratum spinosum aufgrund seines typisch stachelzellohnigen Aussehens, welches durch eine artifizielle Schrumpfung von Desmosomen während der Dehydratation bei Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung) entsteht. Ein Desmosom beschreibt eine Zell-zu-Zellverbindung über extrazellulär gelegene Proteine, welche die Zellmembranen zweier gegenüberliegender Zellen eng über intrazellulär weiterführende Zytokeratinfilamente verbindet (Green *and* Jones 1996). Über dem Stratum spinosum findet sich das Stratum granulosum mit circa drei Lagen Keratinozyten sowie intrazellulärer Keratohyalin granula. Keratohyalin granula stellen dabei das lichtmikroskopische Pendant zu kumuliertem Profilaggrin, eine Aggregation von Zytokeratinfilamenten, dar. Profilaggrin wird durch kalziumabhängige Enzyme zu Filaggrinmonomeren gespalten. Die Inkorporation von Filaggrinmonomeren in die lipidreiche Extrazellulärmatrix und der Zerfall des Zellkerns der Keratinozyten führen zur Ausbildung der letzten Schicht, genannt Stratum corneum. Durch die Auflösung des Zellkerns ist die letzte Stufe der Differenzierung des Keratinozyten erreicht. Der Keratinozyt entwickelt sich dabei zum Korneozyten. Zusammen mit der lipid- und ceramidreichen Extrazellulärmatrix bildet sich der *corneocyte lipid envelope* aus, welcher maßgeblich für die Barrierefunktion der Haut verantwortlich ist (Elias, Gruber *et al.* 2014). Die Eigenschaften und Aufgaben der Haut werden also nicht alleine durch das Zellgerüst bewältigt. Vielmehr ist es die extrazelluläre Matrix innerhalb der Epidermis, die einen entscheidenden Beitrag zur Funktion der Haut liefert. Innerhalb der verschiedenen Schichten der Epidermis finden sich neben Unterschieden in der Extrazellulärmatrix auch Unterschiede im intrazellulär gelegenen Zytoskelett einer Zelle. Einen sehr wichtigen Teil im Zytoskelett bilden

Zytokeratine, die zur Gruppe der Intermediärfilamente gehören. Zytokeratin 10 findet sich hauptsächlich in suprabasalen Zellschichten der Epidermis und Zytokeratin 14 in basalen, undifferenzierteren Zellschichten (Kopan *and* Fuchs 1989). Die Expression der jeweiligen Zytokeratine ändert sich dabei mit dem Differenzierungsstadium des Keratinozyten und mit dem Lebensalter des untersuchten Individuums (Van Muijen, Warnaar *et al.* 1987). Die Hornschicht hat je nach Lokalisation auf dem Körper eine sehr variable Anzahl an Schichten. Ein basaler Stammzell-Keratinozyt benötigt bis zur Abschilferung als Hornzelle ca. 2 bis 4 Wochen (Plewig, Jansen *et al.* 1997). Die folgende Abbildung 1-1 zeigt eine schematische Darstellung der Epidermis sowie ein Beispiel eines Querschnitts durch die Epidermis nach H.E.-Färbung.

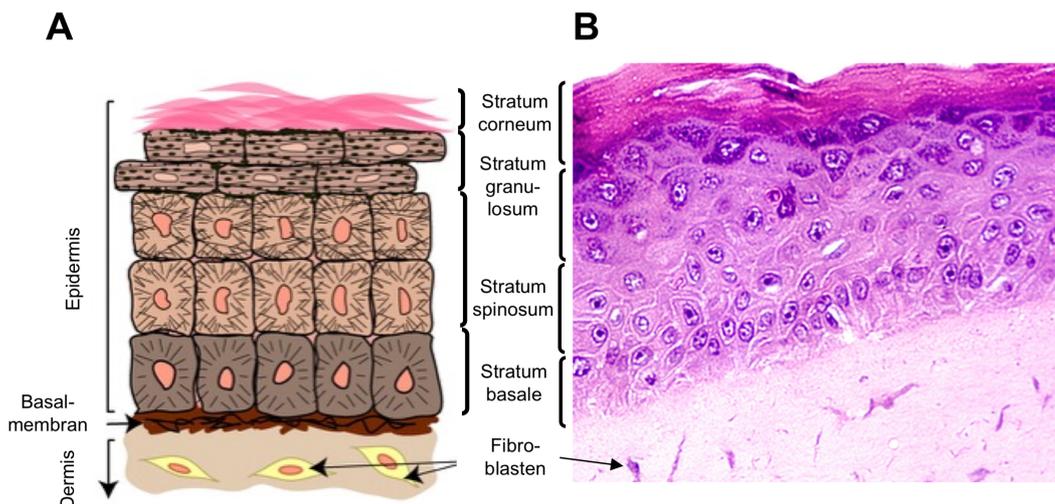


Abbildung 1-1: Aufbau der Epidermis

A zeigt den schematischen Aufbau einer menschlichen Epidermis. In **B** ist das *in vivo*-Pendunt dazu dargestellt (Querschnitt einer H.E.-gefärbten *in vivo* Vollhaut). Beide Darstellungen zeigen die vier Schichten der Epidermis: von apikal nach basal Stratum corneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale. Typisch für die H.E.-Färbung ist die blaue Färbung der Zellkerne und die Rotfärbung des Zytoplasmas einer Zelle.

Abbildung modifiziert wiedergegeben. Quelle: Alonso *and* Fuchs (2003) (schriftliche Genehmigung liegt vor).

1.1.2 Dermis

Die Dermis schließt sich der Epidermis über die dermo-epidermale Verbindungszone an. Sie hat *in vivo* eine Größe von ca. 500 bis 1.500 μm und besteht zum Großteil aus Bindegewebe und Fibroblasten. Innerhalb der Dermis liegen die Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven, Schweißdrüsen und Haarfollikel. Es sind zwei Schichten der Dermis zu unterscheiden. Mit der Epidermis verzahnt ist das Stratum papillare. Es besteht aus lockerem Bindegewebe aus Kollagen I und III sowie aus elastischen Fasern und Fibroblasten. Die Fibroblasten an dieser Stelle haben eine kleine Zellgröße und geringe Granularität mit einem hohen Wachstumspotential (Mine, Fortunel *et al.* 2008). Sie werden als papilläre Fibroblasten bezeichnet und unterscheiden sich von den tiefer gelegenen retikulären Fibroblasten. In der Papille befinden sich viele freie Nervenendigungen, welche unter anderem Schmerz- und Juckreiz weiterleiten (Reinisch *and* Tschachler 2012). Außerdem ist die papilläre Dermis Ort vieler kutaner Entzündungen, sodass Abwehrzellen die postkapillären Venolen der papillären Dermis zur Emigration ins Interstitium nutzen. Die postkapillären Venolen, auch hochendotheliale Venolen genannt, bestehen aus einem besonderen zylinderförmigen Endothel, welches aktiv Lymphzellen emigrieren lässt (Tohya, Urabe *et al.* 2000). Eine Kapillarschlinge versorgt eine Papille. Die unterhalb des Stratum papillare liegende Schicht wird als Stratum reticulare bezeichnet und wird vorwiegend von straffem Bindegewebe aus Kollagen I und elastischen Fasern gebildet. In dieser Schicht finden sich retikuläre Fibroblasten mit einer größeren Zellgröße, einer höheren Granularität und einem geringeren Wachstumspotential als papilläre Fibroblasten. Die retikuläre Dermis verleiht der Haut ihre mechanische Widerstandsfähigkeit mit Dehnbarkeit und Reißfestigkeit.

1.1.3 Basalmembran

Die Basalmembran ist das Bindeglied zwischen Epidermis und Dermis und ist dabei der zentrale Teil der dermo-epidermalen Verbindungszone. Sie verbindet das intrazelluläre Keratingerüst mit der extrazellulären Matrix unter anderem über

Hemidesmosomen. Eine wichtige Rolle dabei spielen Kollagen III, IV und VII sowie Laminin V, Integrine und andere Proteine (u.a. BP 180 und BP 230). Durch eine genügend starke Haftung der Epidermis an der Dermis kann die Haut großen Scherkräften widerstehen. Diese Reißfestigkeit entsteht hauptsächlich durch die Basalmembran innerhalb der dermo-epidermalen Verbindungszone. Die Verbindung der basalen Keratinozyten wird über die Basalmembran hergestellt. Scherkräfte auf die Epidermis werden somit über die Basalmembran auf die papilläre Dermis übertragen. Dabei spielen Hemidesmosomen eine entscheidende Rolle (Green *and* Jones 1996). Hemidesmosomen sind im Gegensatz zu Desmosomen Verbindungen zwischen einer Zelle und dem extrazellulär gelegenen Bindegewebe. Die Basalmembran ist essentiell für den regelhaften Aufbau der Epidermis und hat bei der terminalen Differenzierung der Keratinozyten mit der Ausbildung der epidermalen Schichtung maßgeblichen Einfluss (Salerno, Morelli *et al.* 2016).

1.2 Hauterkrankungen

Die Haut ist der Umwelt zugewandt und damit Umweltfaktoren ausgesetzt, die sich ständig verändern. Luftfeuchtigkeit, Luftdruck und Außentemperatur ändern sich klima- und jahreszeitenabhängig. Die Aufrechterhaltung der Schutzfunktion, die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes, die Wärmeregulation und die sinnliche Wahrnehmung erfordern ein komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Hautbestandteile. Störungen in diesem Zusammenspiel können zu Erkrankungen der Haut führen, die lebensbedrohlich sein können (Wolf *and* Parish 2005). Da es schwierig sein kann, Hautkrankheiten im Verborgenen zu halten, werden Betroffene durch die Gesellschaft außerdem oftmals stigmatisiert und ausgegrenzt. Dies verstärkt den Leidensdruck enorm und führt zu psychiatrischen Komorbiditäten, im Extremfall bis hin zur Suizidalität (Gupta, Pur *et al.* 2017). Eine funktionierende Barrierschicht der Haut ermöglicht einerseits die Toleranz einer Hautflora und andererseits eine selektive Durchlässigkeit von Immunzellen und Umweltstoffen. Bei fehlerhafter Barrierefunktion können pathogene Keime die Haut infizieren und zu einer phlegmonösen Entzündung

oder zu subcutanen Abszessen führen. Fehlfunktionen des Immunsystems oder genetische Veränderungen können zu Erkrankungen wie Psoriasis vulgaris, Vitiligo, Lupus erythematosus oder Pemphigus vulgaris führen. Ein genetisch bedingter fehlerhafter Aufbau einzelner Proteine innerhalb der Extrazellulärmatrix prädisponiert zu bestimmten Hauterkrankungen. Als Beispiel ist der fehlerhafte Aufbau von Filaggrin (*filament aggregating protein*) zu nennen. Der Proteindefekt kann zur Austrocknung der Haut führen und prädisponiert zur Entwicklung eines Ekzems, wie es beim Krankheitsbild der atopischen Dermatitis vorkommen kann (Egawa *and* Kabashima 2016). Genetische Defekte im Filaggrin-Gen können auch schwere Verhornungsstörungen der Haut, wie sie bei der Ichthyosis vulgaris vorkommen, verursachen (McLean 2016).

Krankheiten der Dermis entstehen weniger durch Autoantikörper, als durch genetische Veränderungen der Fibroblasten. Beim komplexen Krankheitsbild der Sklerodermie beispielsweise kann unter anderem die Herabregulation der Aquaporin-Expression der dermalen Fibroblasten zur verminderten Haut-Hydratation und damit zu einer vermehrten Hauttrockenheit führen (Yousefi, Mahmoudi *et al.* 2017). Aquaporine spielen eine wichtige Rolle im Wasserhaushalt der Haut und in anderen Organen. Innerhalb der Dermis kann über Aquaporine die Haut-Hydratation stattfinden.

Als weiteres Beispiel für Hauterkrankungen sind Tumore der Haut und ihrer Anhangsgebilde zu nennen. Der häufigste maligne Tumor des Menschen ist das Basalzellkarzinom mit jährlich steigender Inzidenz (Goldberg 1996). Das maligne Melanom der Haut nimmt aufgrund seiner hohen Mortalität ebenfalls einen wichtigen Stellenwert ein.

Innerhalb der Haut können außerdem (Auto-)Immunreaktionen zu Hauterkrankungen führen. So liegen beispielsweise beim bullösen Pemphigoid Autoantikörper gegen hemidesmosomale Antigene vor. Die Adhärenz der Epidermis zur Dermis wird durch Destruktion strukturbildender Proteine der Basalmembran gestört (Hammers *and* Stanley 2016). Subepidermale Blasenbildung ist die Folge. Krankhafte Epidermisablösungen können auch Folge von angeborenen Gendefekten sein. Bei der Epidermolysis bullosa simplex

beispielsweise kommt es auf Grund von Gendefekten strukturbildender Proteine innerhalb der Haut, beispielsweise des Zytokeratin 14, nach kleinsten Traumata zur Epidermisablösung mit Ausbildung von Blasen (Pfundner, Sadowski *et al.* 2005).

Immunreaktionen, die die Haut schädigen, können auch erst sekundär nach Therapiemaßnahmen auftreten. So kann durch medizinische Therapieverfahren wie nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT), bei der ein fremdes (*allogenes*) Immunsystem transplantiert wird, eine *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) verursacht werden. Die GvHD beschreibt eine akute oder chronische Abstoßungsreaktion durch immunkompetente *allogene* Zellen gegen den Wirt. Die akute GvHD ist nach dem Rezidiv die zweithäufigste Todesursache nach HSCT (Nassereddine, Rafei *et al.* 2017). Sie tritt überwiegend an der Leber, im Gastrointestinaltrakt und in der Haut in verschiedenen Schweregraden auf. Bei der GvHD greifen spezifische *allogene* immunkompetente Spenderzellen Epitope des Empfängers an, die regelhaft auf den Grundgerüstzellen zu finden sind. Die Folgen sind inflammatorische Prozesse mit Zelluntergängen, bei der kutanen Form Ablösungen der verschiedenen Hautschichten voneinander und bei chronischen Verläufen sklerotische bzw. fibrotische Umbauten oder Lichenifizierung der Haut mit Destruktion des Unterhautfettgewebes (Vasconcelos, Vieira *et al.* 2013). Diese Immunsystemreaktionen gegen in der Haut befindliche Epitope können auch durch Autoimmunprozesse zustande kommen (Chen, Kim *et al.* 2012).

1.3 Tissue Engineering von humanen Geweben

Der Begriff des „Tissue Engineerings“ umfasst die künstliche Herstellung von komplexem biologischem Gewebe mittels Zellgewinnung, Zellkultivierung und Gewebeaufbau. Dabei finden der Prozess der Gewebeherstellung sowie die Zellkultivierung *in vitro* unter definierten Bedingungen statt. Im Vergleich hierzu existieren Gewebemodelle, die nach Explantationen *in vitro* kultiviert werden (Sviland and Dickinson 1999). Das Gewebe dieser Modelle wird jedoch nicht *in*

in vitro hergestellt, sondern lediglich durch Biopsie oder Explantation vom zu untersuchenden Individuum entnommen.

Abbildung 1-2 zeigt schematisch vereinfacht den *in vitro* Herstellungsprozess eines dreidimensionalen Gewebemodells am Beispiel einer Hautbiopsie bestehend aus menschlichen Primärzellen mit anschließender zweckgebundener Weiterverarbeitungsmöglichkeit.

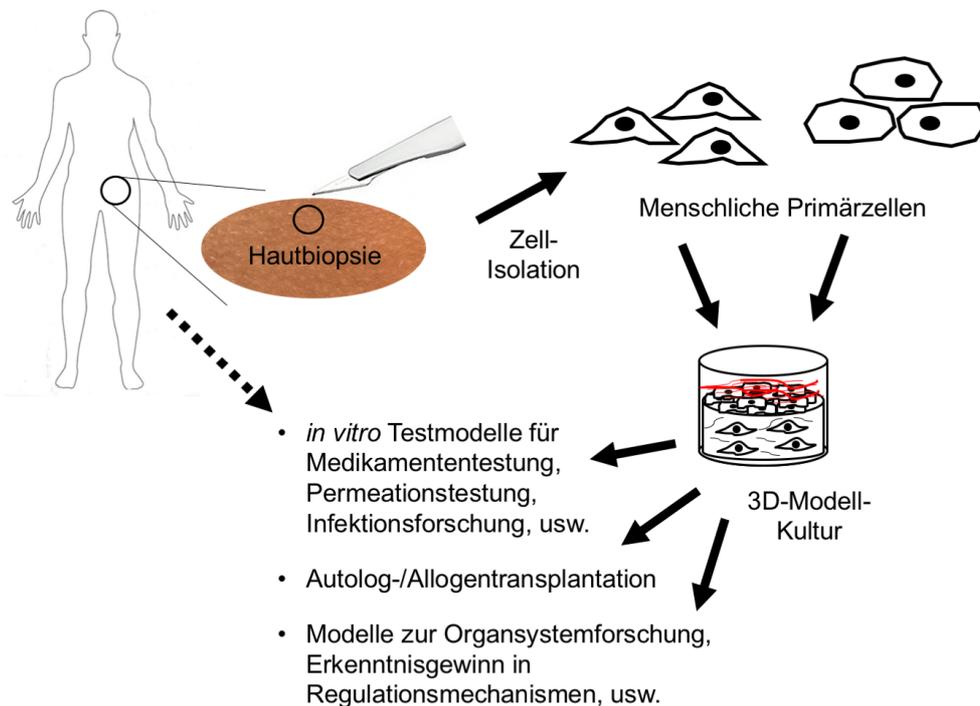


Abbildung 1-2: Tissue Engineering am Beispiel der Hautmodellgenerierung

Die Abbildung zeigt schematisch dargestellt die Gewinnung von zwei verschiedenen Zellarten aus der menschlichen Haut mittels einer Skalpellgeführten Biopsie mit folgendem Aufbau eines 3D-Modells, welches in einem Insert kultiviert wird. Das Modell dient nach Fertigstellung als Testmatrix für andere Fragestellungen, ist selbst Forschungsobjekt oder wird therapeutisch zur Hauttransplantation verwendet.

In vitro hergestellte Gewebemodelle werden in verschiedenen wissenschaftlichen und medizinischen Bereichen eingesetzt (Groeber, Holeiter *et al.* 2011). Im Bereich der regenerativen Medizin ist das primäre Ziel, defektes

Gewebe im Menschen zu ersetzen. In der Wissenschaft dagegen werden dreidimensionale Systeme als *ex vivo* Testsystem verwendet. Grundlage hierfür ist die Kultivierung humaner bzw. tierischer Zellen *ex vivo* mit dem Ziel, das dreidimensionale *in vivo* Gewebe nachzubauen. Das entstandene 3D-Modell kann als Testmatrix zur Verfügung gestellt werden oder es ist selbst Untersuchungsobjekt, um physiologische und biochemische Prozesse *ex vivo* zu untersuchen. Der im Dreidimensionalen entstehende allseitige Zellkontakt erlaubt den Zellen interzelluläre Kommunikation ähnlich der *in vivo* Situation (Pampaloni, Reynaud *et al.* 2007, Edmondson, Broglie *et al.* 2014).

Die beiden meist beachteten Gewebe im Feld des Tissue Engineerings sind Haut und Knorpel (Williams 2004). Beide Gewebe sind besonders geeignet, da sowohl Knorpel als auch das Grundgerüst der Epidermis der Haut nur aus einer einzigen Zelllinie aufgebaut werden. Beide Gewebe ernähren sich über Diffusion und sind selbst nicht durchblutet. Dadurch fällt es leicht, die *in vivo* Situation nachzustellen, da aufwendige Perfusionsmodelle entfallen können. Die Grundlage für die *in vitro* Gewebeherstellung bilden multipotente Zellen, die aus biologischem Gewebe isoliert oder selektiert werden (Brouard *and* Barrandon 2002, Alonso *and* Fuchs 2003, Brouard *and* Barrandon 2003, Gambardella *and* Barrandon 2003). Haut als Pionier-Gewebe im Bereich des Tissue Engineerings stellt dabei eine einfach zu erwerbende Zellquelle dar. So können aus überflüssiger Haut nach Operationen multipotente Hautzellen durch wenige Prozesse gewonnen werden. Über Zellkultivierung und Applikation von beispielsweise Hormonen kann Proliferation und Differenzierung initiiert werden, sodass sich das Gewebe *in vitro* ähnlich der *in vivo*-Beschaffenheit aufbaut.

Für die Gewebeherstellung können sowohl Primärzellen als auch Zelllinien verwendet werden. Der Vorteil der Zelllinien gegenüber der Primärzellen ist deren Verfügbarkeit und die im Gegensatz zu Primärzellen bestehende Anspruchslosigkeit gegenüber Umweltfaktoren. Sie zeigen sich als äußerst widerstandsfähig und unempfindlich. Ihre Teilungsfähigkeit ist nahezu unerschöpflich. Primärzellen werden von verschiedenen Spendern gewonnen, womit man eine große Spendervariabilität erhält. Das Gewebe, aus dem die

Primärzellen gewonnen werden, fällt jedoch meist nach einer medizinisch indizierten Operation an, sodass eventuell krankhaft veränderte Zellen isoliert werden und damit eine minderwertige Qualität der Zellen in Kauf genommen werden muss. Nach einer Operation wird das Gewebe mikroskopisch auf Pathologien untersucht, sodass es einer Forschungseinrichtung selten noch zur Verfügung gestellt werden kann. Eine Ausnahme stellt die ästhetische Chirurgie dar, wo Gewebe meistens nicht weiter untersucht wird. Der Vorteil der Primärzellen gegenüber Zelllinien besteht darin, dass Primärzellen native Zellen sind, die direkt *ex vivo* weiterverarbeitet werden und nicht längere Zeit der physiologischen Situation *in vivo* entzogen waren, sodass bei Primärzellen keine genetischen Aberrationen zu erwarten sind. Primärzellen bilden die physiologische Situation exakter ab. Sie stellen sich jedoch im Vergleich zu Zelllinien häufig als schwierig zu kultivierende Zellen dar.

1.4 Artificielle organotypische Hautmodelle und ihre Anwendung

Hauterkrankungen wie unter 1.2 beschrieben und der damit einhergehende Leidensdruck der Betroffenen motivieren in der medizinischen Forschung Modelle zu entwickeln, mit denen eine Erforschung der Erkrankungsursache sowie der Pathogenese und im Weiteren die Analyse und Entwicklung von Therapien möglich sind. Mit Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts erfuhren Tiermodelle große Beachtung zum Studium physiologischer Prozesse. Bei der Generierung experimenteller Tiermodelle wurde jedoch der genetische Unterschied zum Menschen als limitierender Faktor beschrieben (Ericsson, Crim *et al.* 2013). Auf Grund dieser Limitierung und aus ethischen und ökonomischen Gründen gibt es ein Bestreben, auf Tiermodelle in der Forschung zu verzichten (Mertsching, Weimer *et al.* 2008).

Schon 1975 wurde die Isolation und Kultivierung von Keratinozyten aus menschlicher Haut durch Rheinwald und Green beschrieben (Rheinwald *and* Green 1975). Seitdem wurde die Kultivierung der Keratinozyten optimiert und der Aufbau komplexer dreidimensionaler Gewebemodelle aus multipotenten Keratinozyten möglich. Innerhalb der letzten dreißig Jahre wurden verschiedene

artifizielle organotypische Hautmodelle etabliert (Ponec 2002, Zhang *and* Michniak-Kohn 2012). Ein großer Forschungsbereich stellt die Kosmetikindustrie mit Permeations- oder Hautirritationsuntersuchungen für Salben und Cremes an Hautmodellen aber auch die Pharmaindustrie für Wirkstoffentwicklung und Resorptionsversuche dar (Bacqueville, Douki *et al.* 2015). Es sind in der Literatur verschiedene Modelle für Hautkrankheiten, deren Entstehung und Behandlungsmöglichkeiten beschrieben (El Ghalbzouri, Siamari *et al.* 2008). Viele Studien an Hautmodellen untersuchen die Wirkung neuer Stoffe, die molekularen Vorgänge der Wundheilung sowie die Entstehung von Hautkrebs oder die Interaktion von wirtsfremden Zellen mit dem Wirt selbst im Forschungsbereich der Infektionsbiologie (Mertsching, Weimer *et al.* 2008). *In vitro* gezüchtete Haut findet auch therapeutische Anwendung, beispielsweise bei Brandverletzungen (Vacanti *and* Langer 1999, Stock *and* Vacanti 2001). Zu vielen Hauterkrankungen, die in Kapitel 1.2 beschrieben sind, wurden Hautmodelle entwickelt, um die Pathophysiologie besser verstehen zu können oder Therapiemöglichkeiten auszuprobieren und zu untersuchen (Mertsching, Weimer *et al.* 2008).

Durch die Vielzahl der Anwendungsgebiete haben sich bis heute unterschiedliche Protokolle zur *in vitro* Herstellung eines humanen artifiziellen Hautmodells etabliert. Dabei variieren die Hautmodelle in Aussehen und Funktionalität. Permeationsmodelle bestehen häufig nur aus einer Epidermis ohne einen dermalen Teil (Gabbanini, Lucchi *et al.* 2009). Hautmodelle der Melanomforschung bestehen aus mehreren Zellarten mit unter anderem maligne entarteten Melanomzellen (Vorsmann, Groeber *et al.* 2013). Verschiedene Hautmodelle unterscheiden sich also je nach spezifischer Fragestellung in ihrem Aufbau und auch in ihrer Komplexität. Nichtsdestotrotz finden sich Schwierigkeiten in der Herstellung der Hautmodelle. Als schwieriger und limitierender Faktor in der Kultivierung von Hautmodellen wurden unter anderem Keratinozyten beschrieben. Keratinozyten haben einerseits strenge Ernährungsanforderungen und können durch andere Zelllinien wie Fibroblasten überwachsen werden (Tenchini, Ranzati *et al.* 1992). Andererseits können jedoch optimale Wachstums- und Differenzierungsbedingungen für Keratinozyten durch

Änderung des Kulturmediums entstehen (Poumay, Dupont *et al.* 2004, Song, Izumi *et al.* 2004, Marcelo, Peramo *et al.* 2012, Lemper, De Paepe *et al.* 2014). Außerdem besteht eine von dem verwendeten Zellkulturmedium abhängige Zellvitalität von Keratinozyten (Tenchini, Ranzati *et al.* 1992).

Neben *in vitro* hergestellten Modellen finden sich Post-Explantationsmodelle, die nach Explantation eines *in vivo* befindlichen Gewebes *in vitro* kultiviert werden. Im Bereich der Hämato-Onkologie beispielsweise sind Gewebemodelle aus explantierter Haut als GvHD-Prädiktionsmodelle und GvHD-Untersuchungsmodelle beschrieben (Sviland *and* Dickinson 1999, Dickinson, Wang *et al.* 2002). Der Vorteil eines *in vitro* hergestellten Hautmodells gegenüber eines explantierten *ex vivo* Hautmodells zeigt sich jedoch darin, dass ein *in vitro* hergestelltes Modell nach den eigenen Vorstellungen aufgebaut werden kann. Die native physiologische Haut kann dementsprechend an die spezifische Fragestellung angepasst *in vitro* neu aufgebaut werden. Dadurch können das Aussehen des Hautmodells, seine Struktur und seine Beschaffenheit an den zu untersuchenden Forschungsbereich angepasst werden, ohne dass der *in vivo* Charakter verloren geht. Somit kommt dem Hautmodell mit seiner unterschiedlichen Nutzbarkeit eine Schlüsselrolle für *in vivo* Studien zuteil.

1.5 Zielsetzung

Dreidimensionale *in vitro* Vollhautmodelle aus Primärzellen sind morpho- und physiologisch vergleichbar mit menschlicher *in vivo* Haut, sodass sie regelmäßig in der Forschung eingesetzt werden und somit eine echte Alternative zu Tiermodellen darstellen können.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, Einflussfaktoren auf die Reproduzierbarkeit und die Qualität von humanen artifiziellen *in vitro* Vollhautmodellen zu erarbeiten, um deren Einsatz in der Forschung zu optimieren. Die Arbeitsgruppe von Prof. Mielke beschäftigt sich vor allem mit transplantationsrelevanten Fragestellungen. Somit sollten die Erkenntnisse dieser Arbeit dem Einsatz dieser Vollhautmodelle in der Erforschung der Abstoßungsreaktion (GvHD) dienen.

Bei der Herstellung von Vollhautmodellen finden sich regelmäßig große Qualitätsunterschiede in Qualität und Reproduzierbarkeit. In der Literatur sind verschiedene Protokolle beschrieben, die die Proliferation und Differenzierung von Kerationzyten durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen verbessern helfen sollen. Bis dato wurde allerdings noch nicht systematisch untersucht, welchen Einfluss Spenderfaktoren im Einklang mit diesen Kultivierungsprotokollen auf die Qualität und Reproduzierbarkeit von Hautmodellen haben. Für diese komplexe Analyse wurden zahlreiche Vollhautmodelle von verschiedenen juvenilen Spendern in mehreren Replikaten generiert. Ferner wurden Gütekriterien definiert, die für den histomorphologischen Vergleich des Vollhautmodells mit der physiologischen *in vivo* Haut relevant erschienen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

CO2-Brutschrank „INCO 108“ / „INCO 246“	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop „BZ-9000“	Keyence Deutschland (Neu-Isenburg, Deutschland)
Inverses Lichtmikroskop „DM IL LED“	Leica Microsystems CMS GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Lichtmikroskop „Primo Star“	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Mikrozentrifuge „Heraeus Fresco 17“	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
Minizentrifuge „Sprout“	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Sicherheitswerkbank „BDK-SK 1800“	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Sicherheitswerkbank „Heraeus HERAsafe“	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
Zellanalysator „Vi-CELL XR“	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Zentrifuge „Heraeus Multifuge 1S“	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)

2.1.2 Gebrauchswaren

Adapter für Handdispenserspitzen 25 ml / 50 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Hämozytometer Zählkammer „Neubauer Improved“	HBG Henneberg-Sander GmbH (Gießen-Lützellinden, Deutschland)
Handstückzähler „economy“	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg, Deutschland)
Instrumentenschale 205 x 125 x 34 mm	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg, Deutschland)
Kryobox für Kulturröhrchen 5 x 5 Steckplätze	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg, Deutschland)
Kryoeinfrierbox Mr. Frosty™, 18 Steckplätze	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)

Material und Methoden

Messzylinder 100 ml / 1000 ml	Scherf Präzision Europa GmbH (Meiningen-Dreißigacker, Deutschland)
Mikroliterpipette „Research“ 0,5–10/10–100/100–1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Standard-Rack 5 x 16 Steckplätze	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg, Deutschland)
Systembox mit Gittereinsatz 8 x 8 Steckplätze	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg, Deutschland)

2.1.3 Einmalartikel

Deckglas für Hämozytometer 20 x 26 x 0,4 mm	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg, Deutschland)
Einwegskalpell „rationed“ Klingengröße 22	megro GmbH & Co. KG (Wesel, Deutschland)
Handdispenserspitzen Combitips plus 0,5/1/2,5/5/10/25/50 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Inserts mit Polycarbonatmembran Nunc Cell Culture Inserts	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Kryoröhrchen „CryoGen“ 2 ml	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg, Deutschland)
Kulturröhrchen 13 ml	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg, Deutschland)
Lagerflasche 500 ml	Corning Inc. (Corning, New York, USA)
Mikrotiterplatte mit Rundboden „Nunclon Surface“ 96 Vertiefungen	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Pasteurpipette aus Polyethylen 1/3 ml	Biosigma Srl (Cantarana di Cona, Italien)
Pasteurpipette aus Glas 150/230 mm	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim am Main, Deutschland)
Pipettenspitze „TipOne“ 10/100/1000 µl	StarLab GmbH (Ahrensburg, Deutschland)
Pipettenspitze „Optifit“ 300 µl	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy (Helsinki, Finnland)
Serologische Pipette „CELLSTAR“ 2/5/10/25/50 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Spritzenvorsatzfilter „Filtropur S“ Porengr. 0,20 µm/0,45 µm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Vakuumfiltrationsaufsatz Porengröße 0,45 µm, Volumen 150 ml	Nalge Nunc International Co. (Rochester, New York, USA)

Material und Methoden

Vi-CELL Sample Vial 4 ml	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Zellkulturflasche „CELLSTAR“ 50 ml / 250 ml / 550 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturplatte „Multidish“ 6- / 12- / 24-Well	Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Zellsieb Porengröße 70 µm	SPL Life Sciences Inc. (Pocheon-si, Südkorea)
Zentrifugenröhrchen „CELLSTAR“ konisch, 15 ml / 50 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

2.1.4 Reagenzien

Collagenase Type IV 1 g	Gibco™ Lifetechnologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO) 100 ml, ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)
Dispase 5 g	Gibco™ Lifetechnologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose, 500 ml	Gibco™ Lifetechnologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), 500 ml, +/- Magnesium/Chlorid	Gibco™ Lifetechnologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
EpiLife® Medium 500 ml	Gibco™ Lifetechnologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Fetales bovines Serum (FBS) 500 ml	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)
Gelneutralisationslösung (GNL) aus DMEM 2x (93 %), 3 M Hepes (3 %), FBS (3 %), ChondroitinSulfat-Lösung (1 %)	zur Verfügung gestellt vom Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universität Würzburg, Eigenher- stellung
Kollagen aus Rattenschwanzkollagen Typ I in 0,1 % Es- sigsäure	zur Verfügung gestellt vom Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universität Würzburg, Eigenher- stellung
Keratinocyte Growth Medium 2 (=KGM ²) 500 ml	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
Paraformaldehyd 25 g, 95 %	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)
Penicillin-Streptomycin-Glutamine 100 x, 100 ml	Gibco™ Lifetechnologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Material und Methoden

Trypanblau „Trypan Blue Stain (0,4 %)“ 100 ml	Gibco™ Lifetechnologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin/EDTA Solution 100 ml	Gibco™ Lifetechnologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Vi-CELL Reagenzpack 4 x 220 ml	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)

2.1.5 Antikörper für Immunfluoreszenz

Primäre Antikörper:

- *monoclonal* mouse anti-human cytokeratin 10 – clone DE-K10, Dako, Glostrup, Denmark, 1:100
- *monoclonal* mouse anti-human cytokeratin 14 – clone SPM263, Abcam, Cambridge, UK, 1:100
- *polyclonal* rabbit anti-filaggrin – HPA030189, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 1:100

Sekundäre Antikörper:

- *polyclonal donkey anti-rabbit IgG*, A-21206 Alexa Fluor® 488 *conjugate* or A-31572 Alexa Fluor® 555 *conjugate* – Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, 1:400
- *polyclonal donkey anti-mouse IgG*, A-31570 Alexa Fluor® 555 *conjugate* or A10038 Alexa Fluor® 680 *conjugate* – Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA, 1:400

2.1.6 Kultivierungsmedien

Es wurden für die Kultivierung der Vollhautmodelle drei verschiedene Medium-Protokolle verwendet. Als Basis-Medium dienten KGM², KGM²variant und EpiLife®. Je nach Kultivierungsphase wurden den Basis-Medien verschiedene Inhaltsstoffe in teils verschiedenen Dosierungen beigemischt. Abbildung 2-1, Abbildung 2-2 und Abbildung 2-3 zeigen in Form von Balkendiagrammen die Konzentrationen der verschiedenen Hormone und von Kalzium-Chlorid (CaCl₂)

während der Zellkultivierungsphase nach Zellisolation aus der menschlichen Haut, während der Submers-Kultivierung und während der Grenzflächen-Kultivierung des Vollhautmodells. In Tabelle 2.1-1, Tabelle 2.1-2 und Tabelle 2.1-3 sind die Inhaltsstoffe der einzelnen Medien aufgelistet. Abbildung 2-4 demonstriert die Abwesenheit von fetalem Kälberserum (FCS) in EpiLife® und zeigt den Konzentrationsverlauf von FCS im KGM²- und KGM²variant-Medium.

2.1.6.1 KGM²-Medium

Tabelle 2.1-1: Medium-Zusätze KGM²

Zusatz	Unit	Menge		
		Zell-Kultivierung	Submers-Kultivierung	Grenzflächen-Kultivierung
Kalzium-Chlorid	µM	60	60	1920
<i>Bovine Pituitary Extract</i>	µl/ml	4	4	0
<i>Hydrocortisone</i>	µg/ml	0,33	0,33	0,33
<i>Epinephrine</i>	µg/ml	0,39	0,39	0,39
<i>Epidermal Growth Factor</i>	ng/ml	0,125	0,125	0
<i>Human Insulin</i>	µg/ml	5	5	5
<i>Human Transferrin</i>	µg/ml	10	10	10

2.1.6.2 KGM²variant-Medium

Tabelle 2.1-2: Medium-Zusätze KGM²variant

Zusatz	Unit	Menge		
		Zell- Kultivierung	Submers- Kultivierung	Grenzflächen- Kultivierung
Kalzium-Chlorid	µM	60	60	1920
<i>Bovine Pituitary Extract</i>	µl/ml	4	4	4
<i>Hydrocortisone</i>	µg/ml	0,33	0,33	0,33
<i>Epinephrine</i>	µg/ml	0,39	0,39	0,39
<i>Epidermal Growth Factor</i>	ng/ml	0,125	0,125	0,125
<i>Human Insulin</i>	µg/ml	5	5	5
<i>Human Transferrin</i>	µg/ml	10	10	10

2.1.6.3 EpiLife® Medium

Tabelle 2.1-3: Medium-Zusätze EpiLife®

Zusatz	Unit	Menge		
		Zell- Kultivierung	Submers- Kultivierung	Grenzflächen- Kultivierung
Kalzium-Chlorid	µM	60	1500	1500
<i>Bovine Pituitary Extract</i>	µl/ml	2	2	2
<i>Hydrocortisone</i>	µg/ml	0,18	0,18	0,18
<i>Epinephrine</i>	µg/ml	0	0	0
<i>Epidermal Growth Factor</i>	ng/ml	0,18	0,18	0,18
<i>Insulin like growth factor</i>	µg/ml	1	1	1
<i>Human Transferrin</i>	µg/ml	5	5	5
Vitamin C	µg/ml	0	0	50

2.1.6.4 Kulturmedienunterschiede

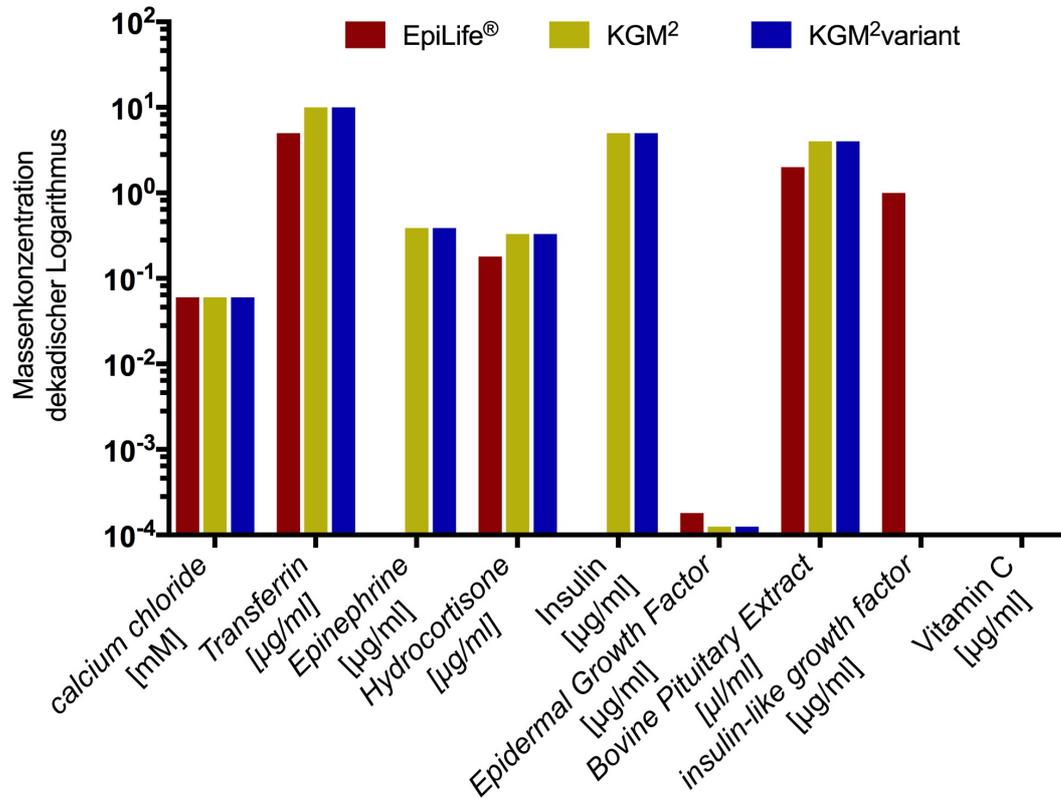


Abbildung 2-1: Medium-Inhaltsstoffe während Zellkultur

Die Abbildung illustriert die jeweilige Konzentration der Hormone und von CaCl₂ während der Zellkultivierungsphase nach Zellisolation aus der Haut. Die Kalziumkonzentration ist bei allen Medien während dieser ersten Kulturphase gleich. Bei den Hormonkonzentrationen gibt es geringe Unterschiede. Auffällig ist die Hormonkonzentration von *insulin-like growth factor*, welches einzig in EpiLife®-Medium vorhanden ist, wohingegen *Epinephrine* und *Insulin* ausschließlich in KGM²- und KGM²variant-Medium sind.

Material und Methoden

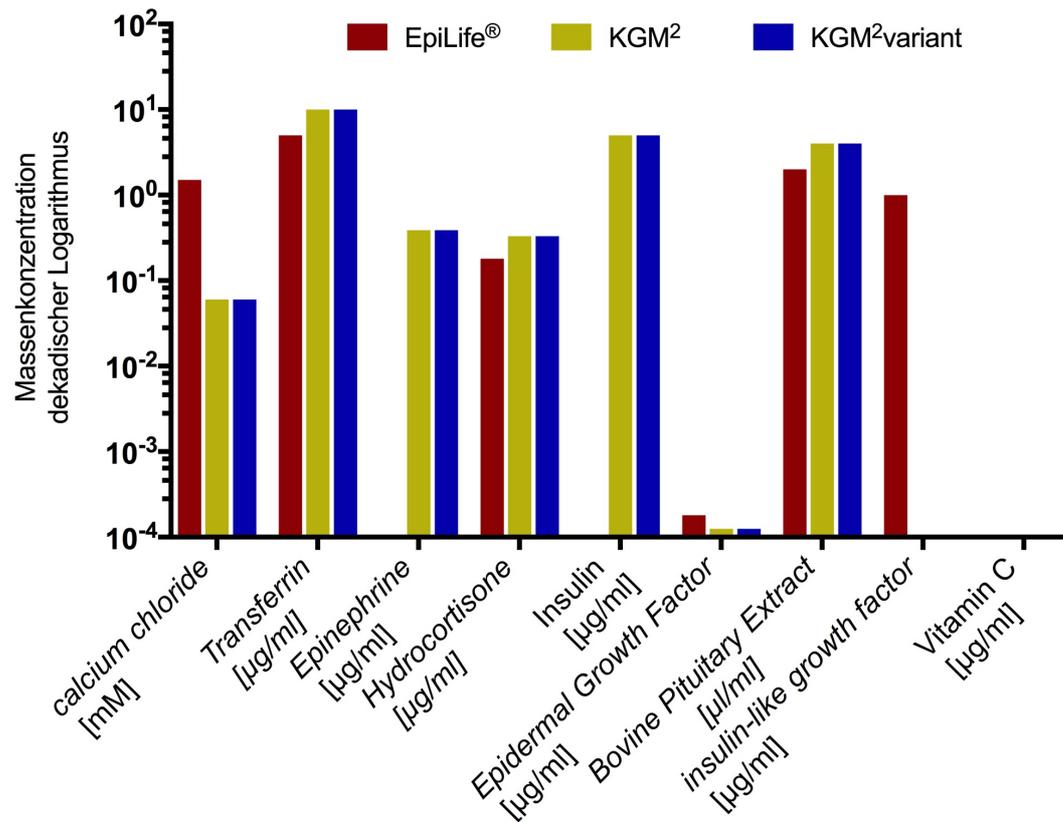


Abbildung 2-2: Medium-Inhaltsstoffe während Submerskultur

Die Abbildung vergleicht die jeweilige Menge der Inhaltsstoffe in den drei Kultivierungsmedien während der Submerskultivierungs-Phase. Auffällig ist, dass EpiLife® während der Submerskultivierung eine 25fach höhere Kalziumkonzentration enthält, als die beiden anderen Kultivierungsmedien KGM² und KGM²variant.

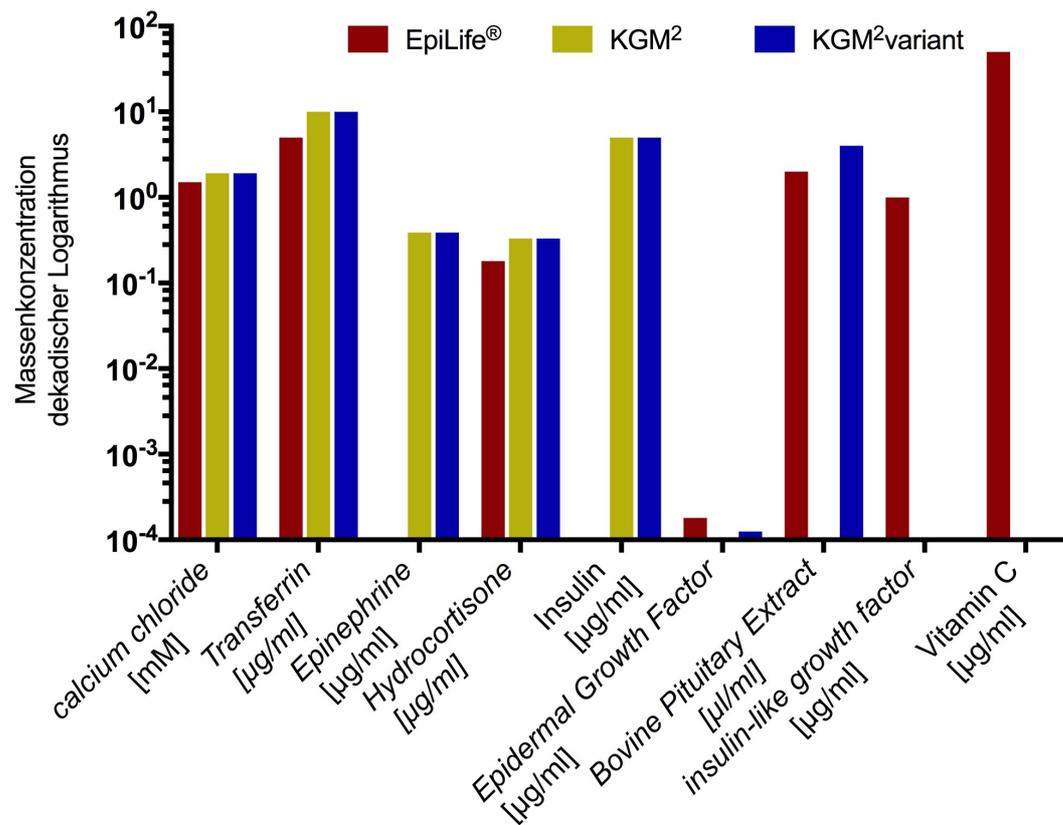


Abbildung 2-3: Medium-Inhaltsstoffe während Grenzflächenkultur

Im Diagramm dargestellt sind die Hormone und Elektrolyte in verschiedenen Mengen innerhalb der drei verwendeten Kultivierungsmedien in der Phase der Grenzflächenkultur. Erkennbar ist eine Erhöhung der Kalziumkonzentration innerhalb des KGM²- und KGM²variant-Protokolls auf 1,92 mM bei Grenzflächenkultivierung, während die Kalziumkonzentration im EpiLife[®]-Protokoll bei 1,5 mM unverändert zur Submerskultur bleibt. Verglichen mit den beiden anderen Kultivierungsphasen Zellkultur und Submerskultur trat während der Grenzflächenkultur erstmalig ein Unterschied zwischen KGM² und KGM²variant auf. Bei KGM² fanden sich im Vergleich zur Submerskultur *epidermal growth factor* und *bovine pituitary extract* nicht mehr, wohingegen diese Hormone bei KGM²variant in unveränderter Konzentration zur Submerskultur vorhanden waren. EpiLife[®] beinhaltet in dieser Phase als einziges Kulturmedium Vitamin C.

KGM² und KGM²variant unterschieden sich in der Hormon- und Kalziumkonzentration lediglich während der Grenzflächenkultur. Während der Submerskultivierungs-Phase waren alle Konzentrationen identisch. KGM²variant-Medium enthielt in allen drei Kultivierungsphasen *Epidermal Growth Factor* und *Bovine Pituitary Extract*, wohingegen KGM²-Medium lediglich

innerhalb der Zellkultivierungs- und Submerskultivierungs-Phase beide Hormone enthielt.

Es ist eine starke Erhöhung der Kalziumkonzentration beim Wechsel von Submers- zur Grenzflächenkultur innerhalb der KGM²- und KGM²variant-Protokolle zu erkennen. Zu Beginn der Grenzflächenkultur war die Kalziumkonzentration beim KGM²- und KGM²-variant-Protokoll 32fach höher als während der Submerskultur, wohingegen die Kalziumkonzentration beim EpiLife[®]-Protokoll sowohl innerhalb der Submerskultur, als auch beim Wechsel zur Grenzflächenkultur mit 1,5 mM gleichbleibend hoch war. Innerhalb des EpiLife[®]-Protokolls gab es beim Wechsel der Zellkulturphase in die Submerskultur-Phase einen Kalziumkonzentrationsanstieg von 0,06 mM auf 1,5 mM.

EpiLife[®] wurde während der Grenzflächenkultivierungs-Phase im Gegensatz zu den anderen beiden Medien Vitamin C hinzugefügt.

Ein weiterer Unterschied zwischen dem EpiLife[®]-Protokoll und den beiden anderen Protokollen KGM² und KGM²variant bestand in der Konzentration von fetalem Kälberserum (FCS) während des Kultivierungsprotokolls. Bei KGM² und KGM²variant wurde nach der Primärisolation der Fibroblasten und Keratinozyten während der Zellkultivierungs-Phase 10 % fetales Kälberserum beigemischt. In der ersten Phase der Hautmodell-Kultivierung, welche die Submerskultivierungs-Phase darstellte, wurde die FCS-Konzentration stetig reduziert, sodass beim Umsetzen in die Grenzflächen-Kultivierung kein FCS mehr beigemischt wurde. EpiLife[®]-Medium enthielt dagegen kein FCS. Wobei innerhalb des EpiLife[®]-Protokolls einmalig für 24h FCS bei der Herstellung des Dermisäquivalentes verwendet wurde. Hierbei wurde jedoch kein EpiLife[®]-Medium verwendet, sondern DMEM (vgl. Abbildung 2-6).

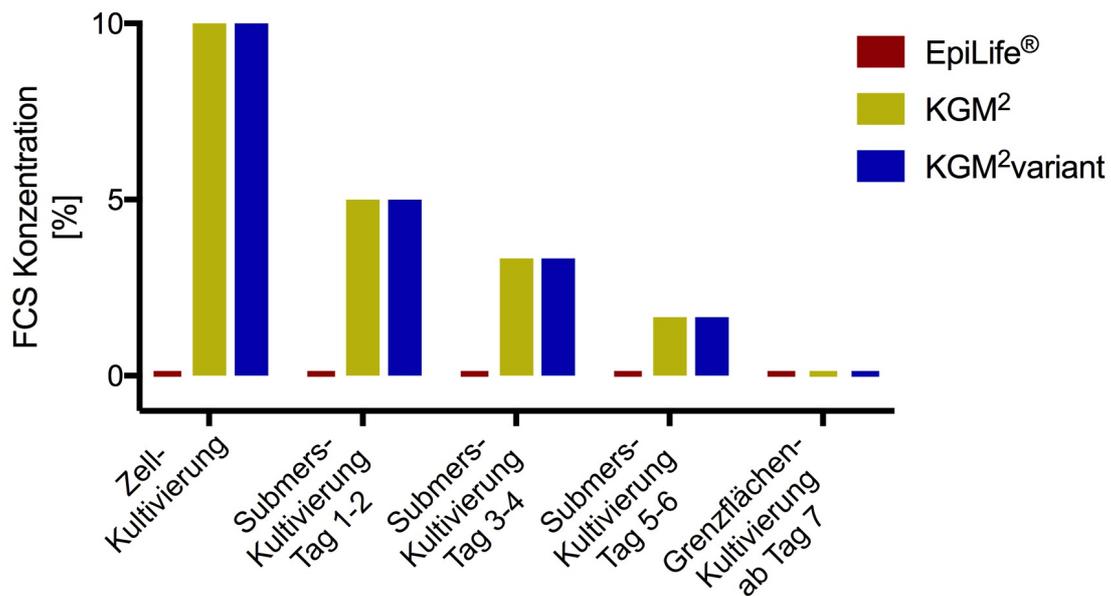


Abbildung 2-4: Vergleich der fetalen Kälberserum-Konzentration

Es finden sich die Konzentrationen des fetalen Kälberserums (FCS) prozentual im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Die gelbe Fläche beschreibt die Konzentration von FCS im KGM²-Medium, die blaue Fläche die im KGM²variant-Medium und die rote Fläche die im EpiLife[®]-Medium. Während der Submerskultivierung wurde innerhalb der KGM²- und KGM²variant-Protokolle die FCS-Konzentration zwischen Tag 1 und Tag 7 kontinuierlich reduziert. Im EpiLife[®]-Protokoll kam FCS lediglich bei Herstellung des Dermisäquivalentes vor. Es wurde hier für 24h mit DMEM + 10 % FCS kultiviert (fehlt in der Abbildung). Das EpiLife[®]-Medium selbst enthielt kein FCS (Konzentration stets bei 0 %). Während der Grenzflächen-Kultivierung fehlte FCS in allen drei Medien-Protokollen.

2.2 Ethikvotum

Zelluläre Grundlage für die aufzubauenden Hautmodelle bildeten Präputien nach Zirkumzisionen, die durch einen urologischen oder kinderchirurgischen Facharzt indiziert und durchgeführt wurden. Die Weiterverarbeitung des Materials wurde nach schriftlichem Einverständnis der Erziehungsberechtigten vorgenommen. In der vorgelegten Arbeit wurden humane Fibroblasten und Keratinozyten aus Vorhaut von Kindern unter 10 Jahren isoliert. Das geplante Forschungsprojekt wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg genehmigt, ohne dass sich Bedenken gegen die Durchführung des Forschungsprojektes ergaben (Aktenzeichen 2/12). In dem

Ethikantrag 2/12 fand das bestehende Dach-Ethikvotum mit dem Aktenzeichen 182/10 Berücksichtigung.

2.3 Herstellung organotypischer Vollhautmodelle

Das in der vorgelegten Arbeit verwendete *in vitro* hergestellte humane artifizielle Vollhautmodell bestand aus einer Epidermis, die Keratinozyten und Extrazellulärmatrix enthielt, und einer Dermis, die Fibroblasten und Extrazellulärmatrix enthielt. Zwischen der Epidermis und der Dermis lag die Basalmembran. Die Generierung des Vollhautmodells begann mit der Isolation der Zellarten aus dem explantierten humanen Gewebe. Der Vorgang der Isolierung wurde nach bekannten Protokollen durchgeführt (Mertsching, Schanz *et al.* 2009, Pudlas, Koch *et al.* 2011). Nach Isolierung wurden die Zellen in Zellkultur gehalten und zum Aufbau eines artifiziellen Vollhautmodells verwendet. Die Hautmodelle wurden nach protokollgerechter Fertigstellung histologisch aufgearbeitet und analysiert. Abbildung 2-5 zeigt den Prozess der Herstellung eines humanen artifiziellen Vollhautmodells.

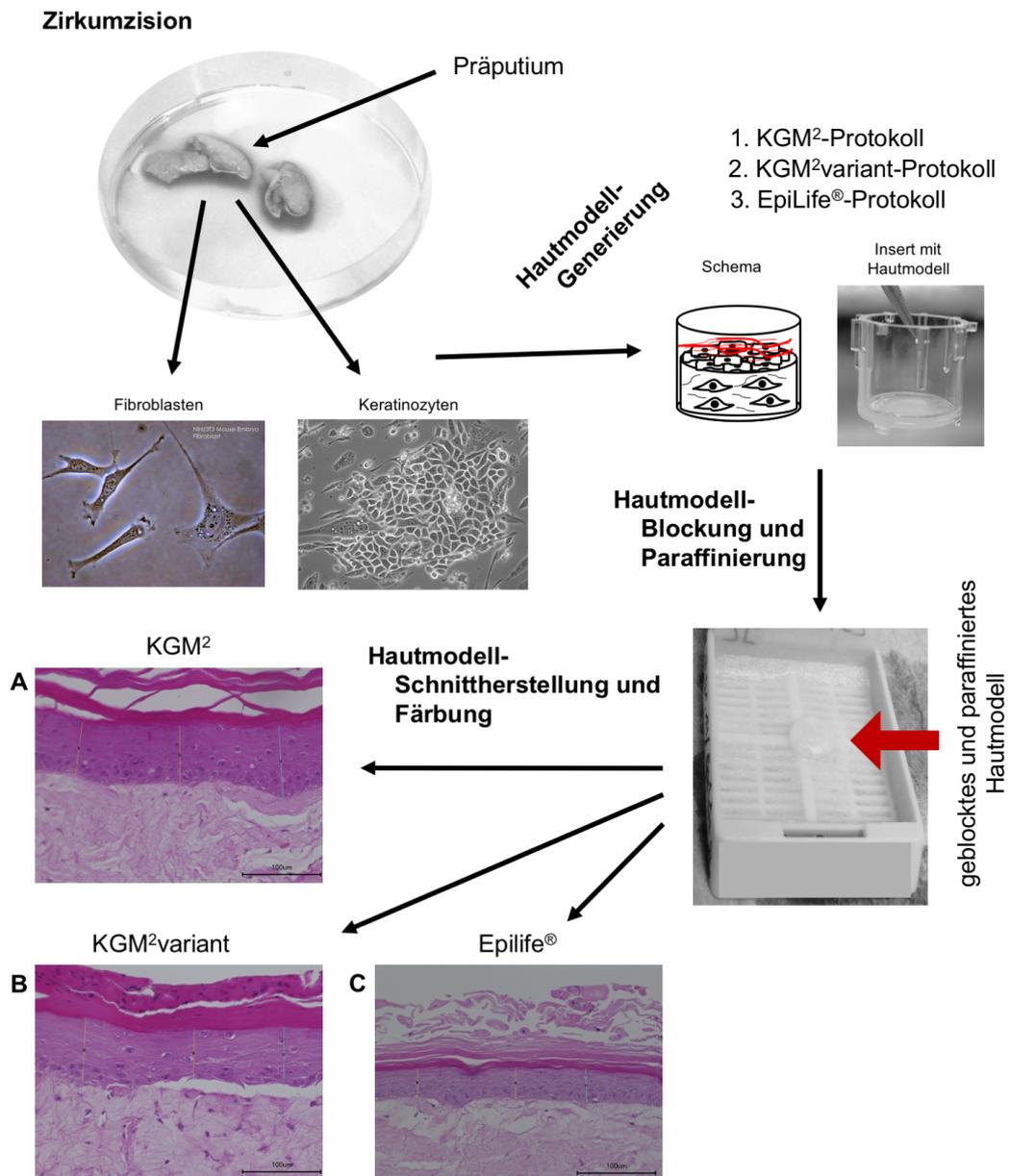


Abbildung 2-5: Schema zur Herstellung eines humanen artifizierten Vollhautmodells

Im ersten Schritt erfolgte die Zellisolation von humanen Keratinozyten und Fibroblasten aus juvenilen Vorhäuten mit anschließender Zellkultivierung. Aus diesen Zellen wurden Vollhautmodelle je nach Protokoll (KGM², KGM²variant oder EpiLife[®]) hergestellt. Nach vorgegebener Kultivierungszeit wurde das Vollhautmodell mit Paraformaldehyd fixiert („geblockt“) und zur Färbereibereitung entwässert und paraffiniert. **A**, **B** und **C** zeigen jeweils Vollhautmodellquerschnitte nach Färbung mit H.E.. Zu sehen sind drei repräsentative Vollhautmodellquerschnitte, 40-fach vergrößert.

Bild Keratinozyten kopiert von:

<https://beyonddish.files.wordpress.com/2013/11/keratinocytes-in-culture.jpg>

(Abrufdatum 03.09.2017, Genehmigung liegt über „*Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License*“ vor.)

Bild Fibroblasten kopiert von:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d7/Fibroblast.jpg> (Abrufdatum 15.09.2017, Genehmigung liegt über „*Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 2.5*“ vor).

2.3.1 Zellisolation humaner Zellen und Zellkultur

Zelluläre Grundlage für die aufzubauenden Vollhautmodelle bildeten Präputien nach Zirkumzisionen. Die Präputien wurden in einer PBS⁻, 1 % Penicillin-Lösung transportiert und am selben oder darauffolgenden Tag nach der Operation weiterverarbeitet. Die Isolierung und Anzucht der dermalen Fibroblasten und Keratinozyten folgte nach mehrfachem Waschen des Präputiums in sterilem PBS⁻. Nach dem Waschvorgang wurde das Material von überschüssigem Gewebe und Fett befreit, in 2 mm² große Stücke zerkleinert und über Nacht in 2 U/ml Dispase bei 4 °C eingelegt. Nach 16 bis 18 Stunden konnte mit Hilfe einer Pinzette die epidermale von der dermalen Komponente abgezogen werden. Erst im folgenden Prozess hat sich die Isolation der jeweiligen Zellreihe voneinander unterschieden.

Der gewonnene dermale Anteil des Präputiums wurde abermals zerkleinert und für 45 Minuten in 500 U/ml Kollagenase Typ 4 im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, wasserdampfgesättigt) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation (1200 rpm für 5 min.) vorsichtig abgesaugt. Nach Aufnahme des Pellet folgten zwei Waschvorgänge mit jeweils Re-Suspension in DMEM + 10 % FCS und mit jeweils Zentrifugation (1200 rpm für 5 min.) und Absaugen des Mediumüberstandes. Das nun gewaschene dermale Material wurde in 2 ml DMEM + 10 % FCS aufgenommen und in eine unbeschichtete 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Nach frühestens 2 Tagen Inkubation im wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre wurde vorsichtig 2 ml DMEM mit 10 % FCS zugegeben, ohne die adhärennten dermalen Stückchen von der Flaschenwand abzulösen. Die Fibroblasten proliferierten und wuchsen dabei aus den zerkleinerten dermalen Strukturen auf die Kulturflaschenoberfläche. Nach weiteren 2 Tagen folgte das Absaugen des

Material und Methoden

Mediums mit anschließend Spülung der adhären Kultur mit PBS⁻ sowie erneuter Hinzugabe von 10-15 ml DMEM mit 10 % FCS. Alle 2-3 Tage fand ein Medienwechsel statt. Bei 80-90 % Konfluenz wurden die Fibroblasten erstmalig passagiert, indem diese nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS⁻ mit 0,05 % Trypsin inkubiert und abgeklopft wurden. Die Trypsinaktivität wurde nach 3 Minuten durch Zugabe von FCS gestoppt. Anschließend wurden die Zellen aufgenommen und zentrifugiert (1200 rpm für 5 min.), in DMEM mit 10 % FCS aufgenommen und auf zwei neue Zellkulturflaschen (175 cm²) aufgeteilt. Die Fibroblasten wurden dem Studiendesign entsprechend in Passage 2 in -80°C mit DMEM + 40 % FCS + 1 % PenStrep + 10 % DMSO in einer Zellkonzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml kryokonserviert. Nach 3-4 Tagen fand die Überführung in -180°C flüssigen Stickstoff statt. Aufgetaut wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C. Das nur angetaute Pellet wurde in DMEM mit 10 % FCS aufgenommen und zentrifugiert (1200 rpm für 5 min.). Im Anschluss wurde die Zellzahl im Pellet mit Hilfe des Zählautomaten bestimmt.

Der gewonnene epidermale Anteil des Präputiums wurde in kleine Teile zerteilt und mit 0,05 % Trypsin/EDTA für 5 Minuten im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, wasserdampfgesättigt) inkubiert. Die Enzymaktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von FCS gestoppt. Anschließend folgte nach mehrfacher Re-Suspension der Zelllösung, jeweils mit Aufnahme der Zellen in KGM²-Medium mit 10 % FCS und 1 % PenStrep, die Isolation durch ein Sieb mit 70 µm großen Poren, sodass bis dahin weiterhin bestehende Gewebefetzen abgetrennt werden konnten. Die nun isolierten und aufgefangenen Keratinozyten wurden mehrmals mit PBS⁻ gewaschen und in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² in 175 cm² Zellkultur-Flaschen in EpiLife[®]-Medium mit HKGS Kit sowie 1 % PenStrep kultiviert. Bei 80-90 % Konfluenz wurden die Keratinozyten in Passage 1 eingefroren. Zuvor folgte die Ablösung der Keratinozyten von der Flaschenwand mittels Trypsin und Abstoppen mit FCS nach wenigen Minuten. Die aufgenommene Zelllösung wurde zentrifugiert (1200 rpm, 5 min.) und in EpiLife[®]-Medium mit 1 % PenStrep resuspendiert. Nach Herstellen einer Zellkonzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml in

EpiLife® mit 1 % PenStrep und 10 % DMSO wurde bei -80 °C mit dem „Mr. Frosty“ kryokonserviert. nach 3-4 Tagen wurden die Zellröhrchen in -180 °C flüssigen Stickstoff überführt. Es fand hierbei protokollunabhängig ein Einfrieren in EpiLife®-Medium statt, wohingegen je nach weiterverwendetem Medium-Protokoll in KGM²- bzw. KGM²variant- oder EpiLife®-Medium aufgetaut wurde. Das Auftauen der Zellen erfolgte stets zügig im vorgewärmten Wasserbad. Die Zellen wurden in das Kulturmedium gegeben (protokollabhängig KGM², KGM²variant oder EpiLife®), zentrifugiert und in Kulturflaschen ausgesät oder direkt für den Aufbau eines Vollhautmodells verwendet.

2.3.2 Herstellen eines humanen artifiziellen Vollhautmodells *in vitro*

Humane Fibroblasten wurden in 10% DMEM und 1% PenStrep-Lösung in einer Dichte von maximal 6×10^3 Zellen/cm² ausgesät. Keratinozyten vom selben Spender wurden in einer Dichte von 6×10^3 Zellen/cm² erstens in EpiLife® und zweitens in KGM²- bzw. KGM²variant-Medium kultiviert. Das Kulturmedium wurde bestimmt durch das verwendete Protokoll, sowie nach der Kultivierungs-Phase mit Unterscheidung zwischen Zellkultivierung, Submerskultivierung und Grenzflächenkultivierung (Medium-Inhaltsstoffe siehe Abbildung 2-1, Abbildung 2-2 und Abbildung 2-3). Fibroblasten der zweiten bis zur fünften Passage und Keratinozyten der ersten oder zweiten Passage wurden verwendet.

Die dermale Komponente wurde an Tag 1 hergestellt. Es wurden 5×10^4 Fibroblasten in kalter Gelneutralisationslösung (GNL) aufgenommen und mit Kollagenlösung resuspendiert, sodass ein geliertes Kollagengel entstand. Hierbei galt es besonders darauf zu achten, dass keine Lufteinschlüsse im Kollagengel entstanden. Die GNL induzierte in der Kollagenlösung die Vernetzung der Kollagenmoleküle. Nach Resuspension entstand eine homogene Verteilung der Fibroblasten im Kollagengel. Die Herstellung der Kollagengele erfolgte in einem Mischungsverhältnis von 2:3 (2 Teile Kollagenlösung und 1 Teil GNL) auf Eis. Die Kollagengele wurden in *Nunc Cell Culture Inserts* in 24 Well-Platten gegeben und anschließend im Brutschrank (37°C und 5 % CO₂, wasserdampfgesättigt) initial

für 20 Minuten inkubiert, sodass die Gelierung stattfinden konnte. Im Weiteren wird das Kollagengel als Dermisäquivalent bezeichnet.

Nach 20 Minuten Inkubation im Brutschrank wurden die Dermisäquivalente mit DMEM-Medium mit 10 % FCS für 24h submers gesetzt. Nach 24h (+/- 2h) wurde das Medium abgesaugt und jedes Dermisäquivalent mit 25 µl Fibronectin-Gebrauchslösung überschichtet. Dies diente der Ausrichtung und Adhäsion der nun folgenden Epidermis. Die Inkubation des Dermisäquivalentes mit der Fibronectin-Schicht folgte ohne Kultivierungsmedium. Beim Herstellen des Epidermisäquivalentes bestand abhängig vom Protokoll ein Unterschied im verwendeten Kultivierungsmedium.

2.3.2.1 Protokoll KGM²

Nach 30-minütiger Inkubation mit Fibronectin im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, wasserdampfgesättigt) wurden die Gele apikal mit 5×10^5 Keratinozyten/cm² benetzt. Die Keratinozyten waren vom selben Spender wie die Fibroblasten. Sie waren in 200 µl KGM²-Lösung der Submerskultivierungs-Phase mit 5 % FCS gelöst. Nach 2h Inkubation im Brutschrank wurden die Inserts mit KGM²-Medium der Submerskultivierungs-Phase (+ 5 % FCS) submers gesetzt. Nun folgte innerhalb eines siebentägigen Zeitraums eine FCS-absteigende Mediumreihe in Submers-Kultivierung. Alle zwei Tage wurde die FCS-Konzentration von zu Beginn 5 % auf am Ende 0 % reduziert. Nach siebentägiger Submerskultivierung folgte die Übersetzung der Inserts in eine Sechs-Well-Platte, sodass nun von der Submerskultur-Phase auf die Grenzflächenkultur-Phase gewechselt wurde. Während des Überführens wurde die Epidermis dabei einmalig mit einem Spatel von der Insert-Wand vorsichtig gelöst. Das Vollhautmodell wurde fortan durch eine Membran in den Nunc-Inserts ausschließlich von unten kommend mit Nährstoffen versorgt. Die Fläche des Hautgels grenzte apikal an Luft. Es folgte hierbei der Wechsel auf KGM²-Grenzflächen-Medium und es wurde über eine Dauer von 14 Tagen mit 2- bis 3-tägigem Mediumwechsel kultiviert. Die Dauer

der Submerskultivierungs-Phase betrug 7 Tage und die Dauer der Grenzflächenkultivierungs-Phase betrug 14 Tage.

2.3.2.2 Protokoll KGM²variant

Protokoll KGM²variant unterschied sich von KGM² einzig in der Medienzusammensetzung der Grenzflächenkultivierungs-Phase. Es enthielt zusätzlich zum Grenzflächen-Medium des KGM²-Protokoll *epidermal growth factor* und Hypophysenhormone. Die Grenzflächenkultivierung folgte ebenso wie beim KGM²-Protokoll über 14 Tage mit 2- bis 3-tägigem Mediumwechsel mit dem Grenzflächen-Kultivierungsmedium nach KGM²variant-Protokoll. Die Epidermis wurde einmalig kurz nach Überführen in die Grenzflächenkultur-Phase mit einem Spatel von der Insert-Wand vorsichtig gelöst. Die Dauer der Submerskultivierungs-Phase betrug 7 Tage und die Dauer der Grenzflächenkultivierungs-Phase betrug 14 Tage.

2.3.2.3 Protokoll EpiLife[®]

Das Protokoll EpiLife[®] unterschied sich von Protokoll KGM² bzw. KGM²variant ab dem Zeitpunkt der Herstellung des Epidermisäquivalentes an Tag 2. Tag 1 mit Herstellung des Dermisäquivalentes und Kultivierung desselbigen für 24h mit DMEM 10 % FCS wurde wie bei den Protokollen nach KGM² und KGM²variant durchgeführt.

Die Dermisäquivalente wurden nach Absaugen des Mediums an Tag 2 mit Fibronectin benetzt und 30 Minuten im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, wasserdampfgesättigt) inkubiert. Im Anschluss wurden die Gele apikal mit 5x10⁵ Keratinozyten/cm² benetzt. Die Keratinozyten waren wiederum vom selben Spender wie die Fibroblasten. Sie waren in 200 µl EpiLife[®]-Medium der Submerskultivierungs-Phase gelöst. Nach Aufbringen der Keratinozyten fand eine zweistündige Inkubation im Brutschrank statt. Dabei war das Hautmodell nicht von Kulturmedium umgeben. Im Weiteren wurde für 24h mit EpiLife[®]-Medium submers kultiviert. An Tag 3 folgte das Überführen der Kultur in die

Material und Methoden

Grenzflächen-Kultivierung mit EpiLife®-Medium der Grenzflächenkultivierungs-Phase. Hierbei war darauf zu achten, dass die Grenzfläche mit Luft in Berührung kommt und die Vollhautmodelle lediglich über die am Insert basal angebrachte Membran passiv ernährt wurden. Das Hautmodell wurde dabei einmalig kurz nach Überführen in die Grenzflächenkultur-Phase mit einem Spatel von der Insert-Wand gelöst. Das EpiLife®-Medium der Grenzflächenkultivierungs-Phase wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Die Dauer der Submerskultivierungs-Phase betrug 1 Tag und die Dauer der Grenzflächenkultivierungs-Phase betrug 14 Tage.

Die Abbildung 2-6 bildet ein Schema der verschiedenen Vollhautmodell-Generierungsprotokolle ab.

Material und Methoden

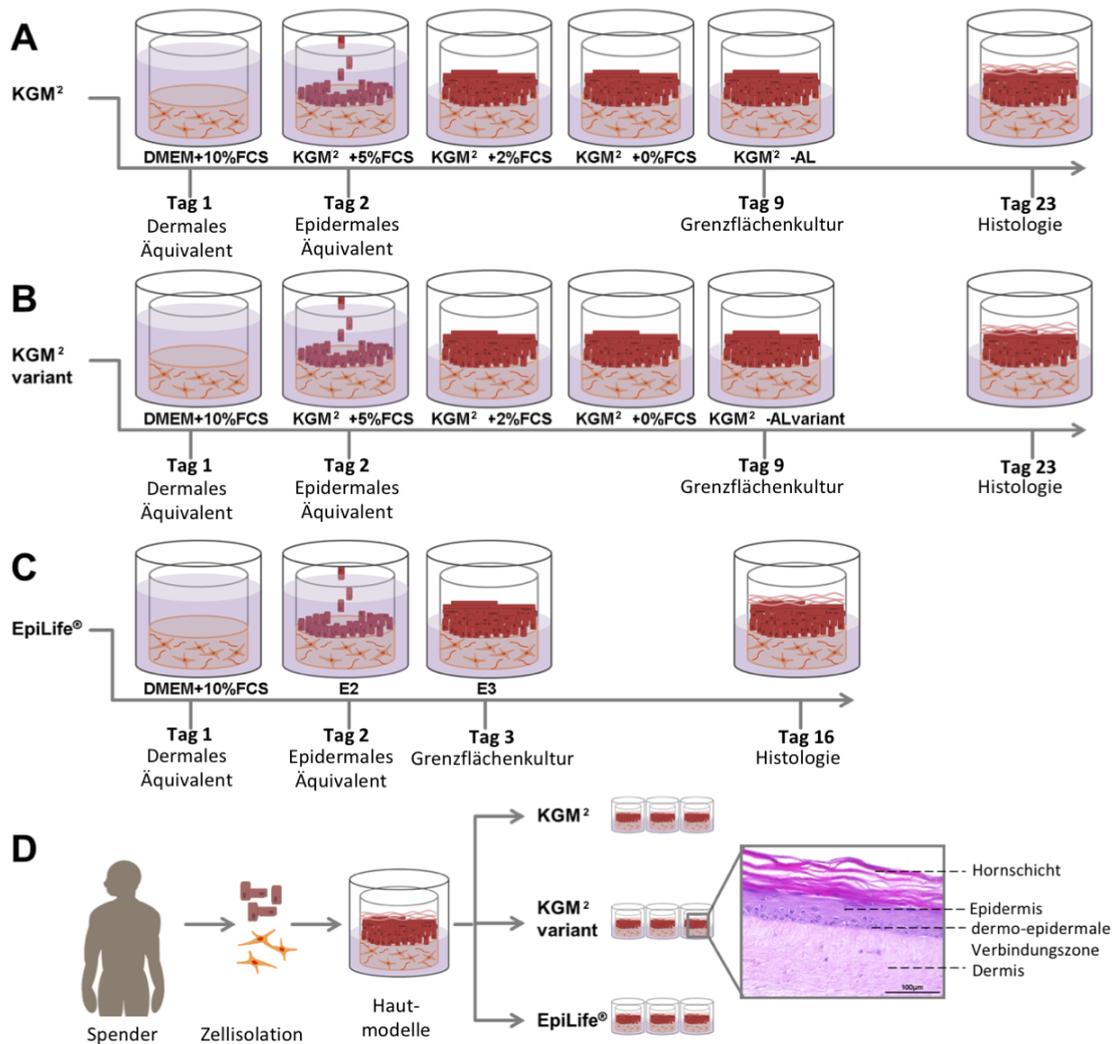


Abbildung 2-6: Chronologie der mediumabhängigen Hautgenerierung

A, **B** und **C** zeigen die zeitliche Abfolge der Protokollschritte aller drei untersuchten Protokolle mit Erstellung des Dermisäquivalentes, Erstellung des Epidermisäquivalentes und Überführen des Vollhautmodells in die Grenzflächenkultur, sowie Abstoppen der Modellkultivierung. **D** veranschaulicht die wesentlichen Schritte zur Generierung von Vollhautmodellen mit den drei verschiedenen Protokollen. Letztendlich wurde ein Hautmodellquerschnitt hergestellt und nach H.E.-Färbung mikroskopisch untersucht. Dargestellt ist ein für alle Medium-Protokolle repräsentativer Querschnitt nach H.E.-Färbung, Skala 100 µm.

Abbildung kopiert und ins Deutsche übersetzt wiedergegeben. Quelle: Lange, Weil *et al.* (2016) (schriftliche Genehmigung liegt vor, geteilte Erstautorenschaft zwischen Lange und Weil).

2.4 Histologische Aufarbeitung des humanen artifiziellen Vollhautmodells

Für die histologische Aufarbeitung wurden alle Vollhautmodelle nach abgeschlossener Kultivierung in 4 % Formaldehyd-Lösung für 2-4h fixiert. Nach Fixierung folgte eine aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung der Modelle mit am Ende Einlegen der Modelle in heißes Paraffin im Einbettautomaten. Anschließend folgte die Quer-Zerteilung des paraffinierten Hautgels in zwei Teile und die Einbettung in Paraffinblöcke, sodass beide Querschnittflächen des Vollhautmodells im Paraffinblock nach unten gerichtet waren. Es wurden 4 µm dicke Querschnitte der Paraffinblöcke hergestellt und auf Objektträger überführt. Es folgte die Färbung der Hautquerschnitte mit Hämatoxylin und Eosin nach üblichem Standard.

Zum Vergleich der Vollhautmodellstruktur mit der Struktur der *in vivo* Haut wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dabei wurden 24 Vollhautmodellquerschnitte von 8 stichprobenartig ausgewählten Spendern nach Kultur mit jeweils EpiLife[®], KGM² und KGM²variant einer Immunfluoreszenz-Färbung unterzogen. Hierfür wurden die Gewebeschnitte über Nacht bei 4°C mit dem Primär-Antikörper (Primär-AK) nach Entparaffinierung inkubiert. Es wurden monoklonale Maus-AK gegen humanes Zytokeratin-10 (*clone* DE-K10, Dako, Glostrup, Denmark), monoklonale Maus-AK gegen humanes Zytokeratin-14 (*clone* SPM263, Abcam, Cambridge, UK) und polyklonale Hasen-AK gegen humanes Filaggrin (HPA030189, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in jeweils 1:100 Verdünnung verwendet. Für die Detektion wurden als Sekundär-AK (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) polyklonale Esel-AK gegen Hasen-IgG (A-31572 Alexa Fluor[®] 555 *conjugate* oder A-21206 Alexa Fluor[®] 488 *conjugate*) und polyklonale Esel-AK gegen Maus IgG (A-31570 Alexa Fluor[®] 555 *conjugate* oder A10038 Alexa Fluor[®] 680 *conjugate*) in 1:400 Verdünnung verwendet. Nach 60-minütiger Einwirkzeit wurden die Gewebeschnitte nach einem Waschvorgang mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eingebettet und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.

2.5 Statistische Methoden

In der vorgelegten Studie wurden 16 verschiedene Spender von Keratinozyten und Fibroblasten verwendet. Es wurden pro Spender 3 Vollhautmodelle für 3 verschiedene Medienprotokolle aufgebaut, sodass insgesamt 144 Vollhautmodelle erstellt wurden. Die Medienprotokolle waren erstens ein lang etabliertes Medium namens KGM²-Medium, zweitens eine Variation des genannten namens KGM²variant-Medium und drittens EpiLife[®]-Medium, ein weiteres in der Keratinozytenkultivierung etabliertes Medium.

Für den Vergleich der 144 Vollhautmodelle wurden objektive Qualitätskriterien definiert. Die Qualitätskriterien beinhalteten die Dicke der Epidermis, gemessen in Mikrometer, die Dicke der Dermis, ebenfalls gemessen in Mikrometer, die Anzahl der Schichten der Epidermis, die Abwesenheit von Zellkernen im Stratum corneum der Epidermis – beurteilt über Alternativmerkmale im Sinne einer dichotomen Nominalskala (1=ja, Zellkern ist abwesend, 2=nein, Zellkern ist vorhanden), sowie die Anhaftung der Epidermis an der Dermis, dargestellt in Form einer Ordinalskala (Level 3=komplett anhaftend, Level 2=teilweise abgelöst, Level 1=teilweise anhaftend, Level 0=komplett abgelöst). Tabelle 2.5-1 gibt einen Überblick über die verwendeten Qualitätsmerkmale. Zu beachten gilt, dass eine hohe Korrelation zwischen der Epidermis-Dicke und der Zellschichten-Anzahl in der Epidermis (Pearson's Korrelations-Koeffizient 0,913) bestand. Daher wurde in folgenden Analysen die Schichtenanzahl nicht weiter berücksichtigt, sondern stellvertretend die Epidermis-Dicke verwendet.

Tabelle 2.5-1: Fünf Qualitätskriterien zur qualitativen Bewertung eines humanen artifiziiellen Vollhautmodells

Qualitätskriterium	Einheit	Bewertung
Epidermis-Dicke	µm	Mittelwert der Dicke – an drei verschiedenen Lokalisationen je Querschnitt gemessen (Stratum basale bis einschließlich Stratum granulosum)
Dermis-Dicke	µm	Mittelwert der Dicke – an drei verschiedenen Lokalisationen je Querschnitt gemessen
Zellschichten-Anzahl	n	Mittelwert der Zellschichten-Anzahl – an drei verschiedenen Lokalisationen je Querschnitt gezählt
Dermo-epidermale Anhaftung	Grad	3 =komplett anhaftend 2 = teilweise abgelöst 1 = mehrheitlich abgelöst 0 = komplett abgelöst
Abwesenheit von Zellkernen in der Hornschicht	Grad	1 = ja (Keine Zellkerne in der Hornhaut) 2 = nein (Zellkerne in der Hornhaut)

Tabelle 2.5-1 ist wörtlich aus Lange, Weil *et al.* 2016 zitiert und ins Deutsche übersetzt (Schriftliche Genehmigung liegt vor).

Insgesamt wurden alle 144 erstellten Vollhautmodelle dem Bewertungsschema von Tabelle 2.5-1 unterzogen. Die Dermis- und Epidermis-Dicken wurden an drei Lokalisationen pro Hautquerschnitt mit Hilfe der Bilderanalyse-Software *ImageJ* (US *National Institute of Health*, Bethesda, MD, USA) gemessen, wobei zum

Vergleich die Mittelwerte der drei Messpunkte herangezogen wurden. Die Epidermis-Dicke wurde ohne Stratum corneum gemessen. Parallel zur Längenmessung wurden die Zellschichten innerhalb der Epidermis an der Messstelle ausgezählt.

Die gesammelten Epidermis- und Dermis-Dicken wurden in Punkt-/Streudiagrammen einerseits nach Spender gruppiert und andererseits nach Medium gruppiert aufgetragen.

Um den Einfluss des verwendeten Mediums und des Spenderalters zu untersuchen, wurden *Generalized Estimating Equations* (GEE) vorgenommen. GEE sind Generalisierungen von Regressionsmodellen, die Beziehungen zwischen einer abhängigen und einer oder mehreren unabhängigen Variablen untersuchen. Die Messungen der Epidermis- und Dermis-Dicken lagen als intervallskalierte Daten vor. Da die Längenmaße der Epidermis-Dicke nicht normalverteilt waren, wurden sie durch Anwendung des natürlichen Logarithmus transformiert, um die Werteverteilung einer Normalverteilung anzunähern. Lineare Regressionsmodelle mit dem jeweiligen Kulturmedium oder dem Spenderalter als Einflussvariable und der Epidermis- beziehungsweise der Dermis-Dicke als Zielvariable wurden durchgeführt, um den Einfluss des verwendeten Kulturmedium auf die Dicke der Epidermis und der Dermis zu analysieren. Bei Erhebung der Daten zur Epithelanhaftung mit Abstufung in „komplett anhaftend“, „teilweise abgelöst“, „mehrheitlich abgelöst“ und „komplett abgelöst“ wurden ordinalskalierte Daten generiert, sodass in einem ordinalen Regressionsmodell die *Odds Ratio* der Epithelanhaftung je nach verwendetem Kulturmedium bzw. Spenderalter berechnet wurde. Die Daten der „Abwesenheit von Zellkernen in der Hornschicht“ präsentierten sich als binominale Daten. In einem binominal logistischen Regressionsmodell wurde der Einfluss des verwendeten Kulturmediums bzw. des Spenderalters auf die Zellkerne innerhalb der Hornschicht berechnet und als *Odds Ratio* dargestellt. Zeigte sich in den univariaten Regressionsmodellen ein signifikanter Einfluss der Einflussvariablen auf die Zielvariable ($p < 0.05$), so wurden multivariable Analysen durchgeführt.

Hier wurden für jede Zielvariable die Einflussvariablen einbezogen, die in der univariaten Regression einen signifikanten Einfluss hatten.

Neben GEE wurde eine statistische Analyse mittels *General Linear Model* (GLM) mit dem Medium als *Fixed Factor* und dem Spender als *Random Factor* durchgeführt. Dabei konnten ein Spendereffekt und ein Interaktionseffekt zwischen dem verwendeten Kulturmedium und dem jeweiligen Spender untersucht werden.

Die statistischen Berechnungen der Daten wurden durch cand. med. Christoph Riegler unter Anleitung von Prof. Götz Gelbrich, stellvertretender Leiter des Lehrstuhls für klinische Epidemiologie und Biometrie, durchgeführt. Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS, Version 22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) durchgeführt. Die Schaubilder und Graphen wurden mit Hilfe von SPSS, Powerpoint 2016, Excel 2016 oder GraphPad Prism version 7.0c Software *for Mac* (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) visualisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Probensammlung

In dem Zeitraum vom 19.04.2013 bis 26.02.2016 wurden insgesamt 61 Hautspender rekrutiert. Es wurde deren entnommene Vorhaut nach einer durch einen urologischen oder kinderchirurgischen Kollegen durchgeführten Zirkumzision zur Zellisolation von Keratinozyten und Fibroblasten verwendet. Es handelte sich ausschließlich um männliche Spender mit einem Alter von 1 bis 10 Jahren. 5 Vorhäute aller 61 mussten auf Grund einer bakteriellen Kontaminierung verworfen werden. Bei 5 Vorhäuten von den 56 verbliebenen konnten nur die Keratinozyten isoliert werden, die Fibroblasten wurden entweder bei zu geringer Zellzahl oder bei sekundärer Kontamination verworfen. Von den verbliebenen 51 Spendervorhäuten wurden dem Studiendesign entsprechend 16 Spender in einem Alter von 2 bis 10 Jahren ausgewählt und aus diesen wurden Keratinozyten und Fibroblasten zur Herstellung von Vollhautmodellen isoliert. Die in der Studie verwendeten Spendervorhäute wurden zwischen dem 28.10.2013 und dem 28.02.2014 gewonnen. Die Altersverteilung der 16 verwendeten Spender ist unter Abbildung 3-1 grafisch dargestellt.

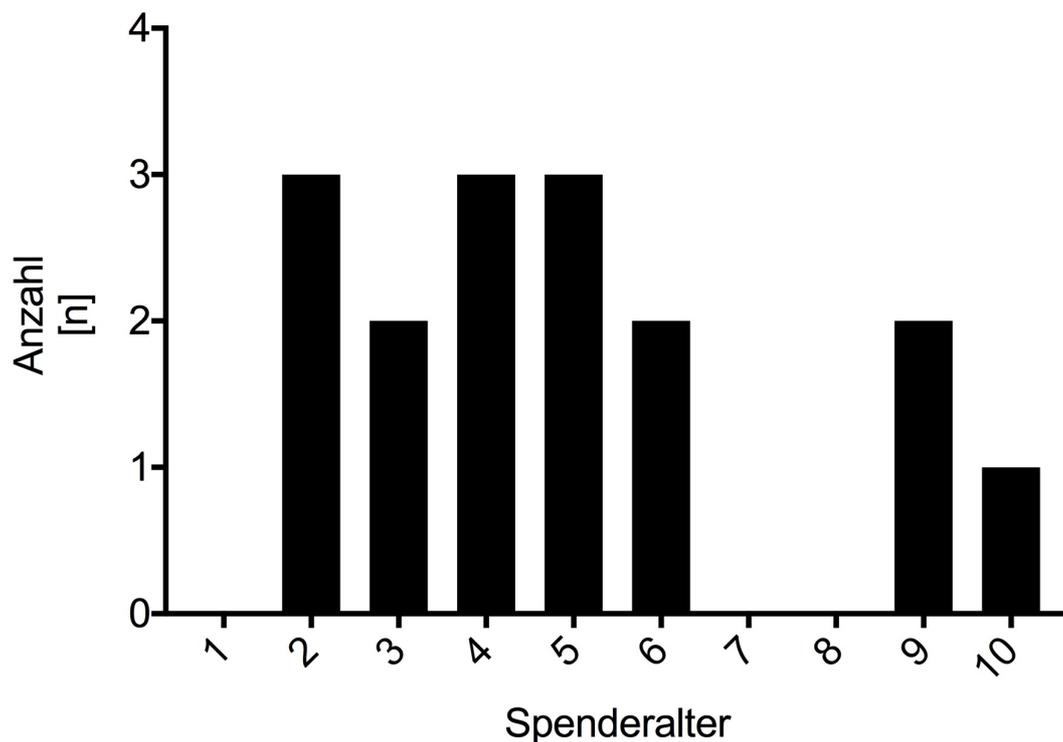


Abbildung 3-1: Altersverteilung der verwendeten Vorhautspender

Die Anzahl der Spender ist dem jeweiligen Spenderalter gegenübergestellt. Das höchste Spenderalter betrug 10 Jahre. Es wurde kein Spender, der jünger als 2 Jahre und der 7 oder 8 Jahre alt war, in die Studie eingeschlossen. Insgesamt wurden 16 Spender untersucht.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach Lange, Weil *et al.* (2016). Schriftliche Genehmigung liegt vor.

3.2 Einfluss des Kulturmediums auf die Qualität von Vollhautmodellen

Bei der Herstellung humaner artifizierender Vollhautmodelle finden sich regelmäßig Unterschiede in der Qualität der Vollhautmodelle. Es konnte bei der Herstellung mehrerer humaner artifizierender Vollhautmodelle mit KGM²-Medium, ein in der Kultivierung von Keratinozyten etabliertes Medium, eine Variabilität des histomorphologischen Bildes zwischen den Vollhautmodellen festgestellt werden. Teilweise bildete sich eine sehr dünne Epidermis mit fehlenden physiologischen Schichten aus. Manche Vollhautmodelle zeigten eine komplett abgelöste Epidermis von der Dermis. Andere Modelle zeigten Hinweise auf eine

unvollständige Differenzierung in der Hornschicht der Epidermis. Auch war die Größe der Dermis zwischen verschiedenen Vollhautmodellen unterschiedlich dick. Es wurden daraufhin mit EpiLife[®], ebenfalls ein etabliertes Kulturmedium für Keratinozyten, und KGM²variant, einer Abwandlung von KGM², zwei weitere Kultivierungsmedien benutzt, um den Einfluss des verwendeten Kulturmediums auf die Vollhautmodellqualität zu analysieren.

Insgesamt wurden mit diesen drei Kultivierungsmedien 144 Vollhautmodelle von 16 verschiedenen Spendern hergestellt. Von jedem Spender wurde mit jedem der drei Medien ein Vollhautmodell in dreifacher Ausführung hergestellt, sodass pro Medium 48 Vollhautmodelle generiert wurden. Die Qualität der Vollhautmodelle wurde nach unter Tabelle 2.5-1 beschriebener Bewertungsmappe beurteilt. Die Qualitätskriterien waren: Epidermis-Dicke, Zellschichten-Anzahl der Epidermis, Dermis-Dicke, dermo-epidermale Anhaftung und das Vorhandensein von Zellkernen in der Hornschicht. Die Bewertung wurde an allen Vollhautmodellquerschnitten nach H.E.-Färbung vorgenommen.

3.2.1 Erfolgreiche Herstellung von Vollhautmodellen mit EpiLife[®]-, KGM²- und KGM²variant-Medium

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass aus den isolierten Keratinozyten und Fibroblasten der 16 ausgewählten Spender Vollhautmodelle mit allen drei beschriebenen Kultivierungsprotokollen (KGM², KGM²variant und EpiLife[®]) hergestellt werden konnten. Von allen Vollhautmodellquerschnitten wurden H.E.-Färbungen und von einer repräsentativen Untergruppe wurden zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen gegen typische epidermale Antigene durchgeführt. Abbildung 3-2 zeigt repräsentative histologische Querschnitte von humanen artifizialen Vollhautmodellen. Im Vergleich dazu ist ein repräsentativer Querschnitt durch die native menschliche Haut abgebildet.

Ergebnisse

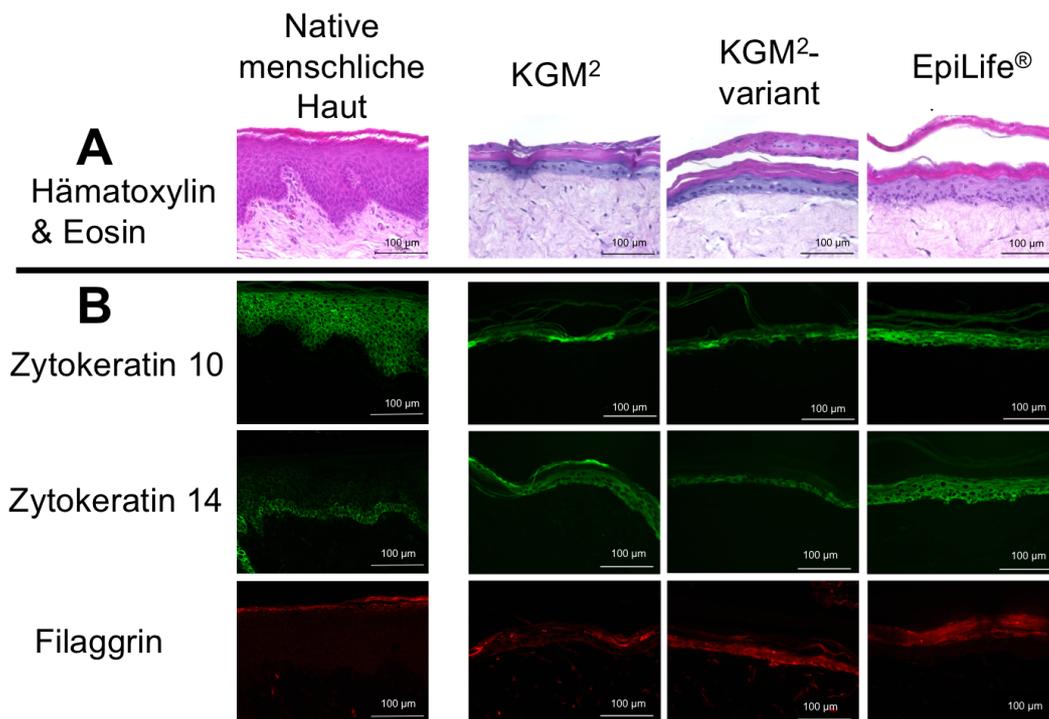


Abbildung 3-2: Gegenüberstellung nativer menschlicher Haut zu humanen artifiziellen Vollhautmodellen

Dargestellt sind repräsentative Querschnitte von nativer Haut und humanen artifiziellen Vollhautmodellen nach Kultivierung mit KGM²-Medium, KGM²variant-Medium oder EpiLife[®]-Medium. **A:** Dargestellt sind Querschnitte nach H.E.-Färbung. Die physiologische Struktur einer *in vivo* Haut wird sowohl nach Kultur mit KGM², KGM²variant oder EpiLife[®] erreicht. Lediglich in der Dicke der Epidermis und in der papillären Form der Dermis unterscheiden sich die Querschnitte nach H.E.-Färbung. **B:** Dargestellt sind Querschnitte nach Immunfluoreszenz-Färbung gegen Zytokeratin 10 (grün), Zytokeratin 14 (grün) und Filaggrin (rot). Verglichen mit der *in vivo* Haut finden sich die genannten Filamente Zytokeratin 10 und 14, sowie Filaggrin in derselben Verteilung nach *in vitro* Kultivierung mit allen drei Kultivierungsmedien wieder. Skala 100 μ m.

Abbildung modifiziert wiedergegeben. Quelle: Lange, Weil *et al.* (2016) (schriftliche Genehmigung liegt vor).

In der H.E.-gefärbten Haut erkennt man eine der physiologischen Haut ähnliche Architektur und Struktur. Im Vergleich zur nativen Haut fehlen den Vollhautmodellen die papillären Ausstülpungen der Dermis mit Verzahnung der Epidermis. Auch stellt sich die epidermale Dicke geringer dar. Der dermale Teil kann vom epidermalen Teil klar abgegrenzt werden. Außerdem gliedert sich bei allen drei Medien-Protokollen die Epidermis in mehrere Schichten auf, wie sie in

der nativen Haut vorhanden sind. Somit war die Rekonstruktion der artifiziellen Vollhautmodelle mit jedem verwendeten Medium erfolgreich, wobei eine der physiologischen menschlichen Haut gleiche Schichtung mit Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum erreicht werden konnte. Deutlich wird die Ähnlichkeit zur *in vivo* Haut auch in der Immunfluoreszenz-Färbung. Es wurden Zytokeratin 10-, 14- und Filaggrin-Epitope angefärbt. Die Verteilung dieser Epitope innerhalb der Epidermis entsprach der physiologischen Verteilung in der menschlichen Haut.

3.2.2 Einfluss des Kulturmediums auf die Epidermis-Dicke

Eines der gewählten Beurteilungsparameter einer Hautmodellqualität war die Epidermis-Dicke. Die Dicke einer Epidermis sagt primär noch nicht vorher, ob eine Schichtung vorhanden ist und ob jede Schicht vorkommt und falls ja, ob die Struktur der *in vivo* Haut gleicht. Die Dicke der Epidermis, mit Ausbildung aller verschiedenen Schichten, wurde für jedes der erstellten Vollhautmodelle nach H.E.-Färbung gemessen. Die Zellgröße der Keratinozyten variierte von Schicht zu Schicht und lag bis zum Stratum corneum bei ca. 8 bis 16 μm . In den Vollhautmodell-Vergleichen wurde die Dicke der Epidermis exklusive des Stratum corneum gemessen. Abbildung 3-3 zeigt beispielhafte Querschnitte von Vollhautmodellen mit sehr dicker und sehr dünner Epidermis mit jeweils drei Messstellen im Vollhautmodellquerschnitt.

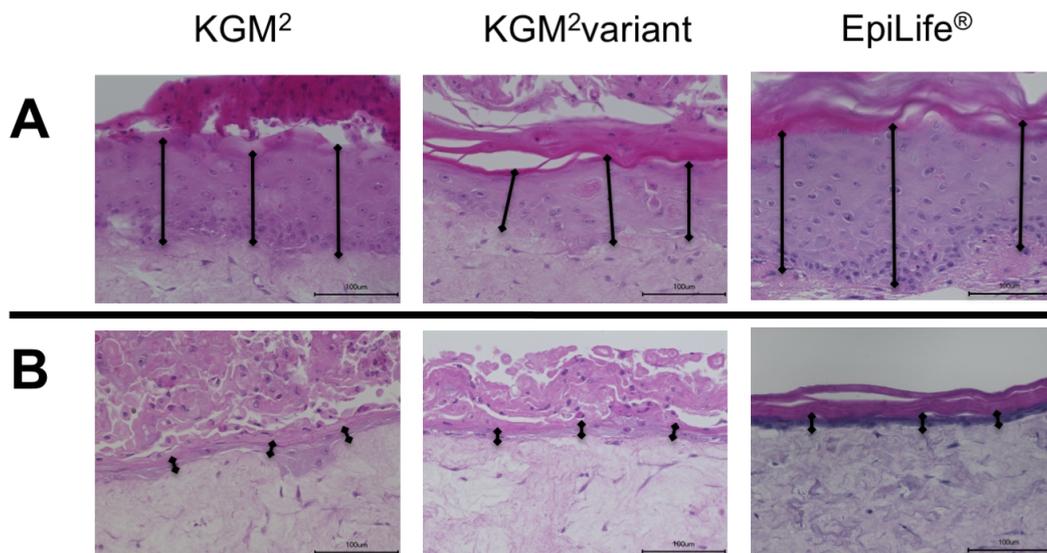


Abbildung 3-3: Beispielhafte Messungen der Epidermis-Dicke

Unter **A** und **B** sind jeweils drei Vollhautmodelle, welche mit den drei verschiedenen Medien KGM², KGM²variant und EpiLife[®] kultiviert wurden, dargestellt. Bei jedem Hautquerschnitt wurden drei Längenmessungen an repräsentativen Stellen vorgenommen. **A** bildet vor allem sehr große epidermale Anteile ab. **B** zeigt Vollhautmodelle mit einer sehr dünnen Epidermis. Bei allen epidermalen Messungen wurde das Stratum corneum nicht berücksichtigt. Die Messskala war jeweils 100 µm lang. Alle Querschnitte wurden nach H.E.-Färbung mikroskopiert.

Die Spannweite aller untersuchten Epidermis-Dicken ist unabhängig vom Kulturmedium zwischen 9,7 µm und 159,6 µm groß. In der Literatur wird *in vivo* eine Epidermis-Dicke exklusive der Hornschicht von ca. 50 bis 80 µm beschrieben (Sandby-Moller, Poulsen *et al.* 2003). Es lässt sich bei einer Epidermis-Dicke von 9,7 µm und einer Zellgröße von ca. 8 µm rückschließen, dass diese Epidermis höchstens aus einer Schicht bestehen kann. Wie unter Kapitel 2.5 beschrieben, gibt es eine Pearson's Korrelation von ca. 91 % zwischen in Mikrometer gemessener Epidermis-Dicke und gezählter Epidermis-Schichten. Eine dünne Epidermis besteht folglich aus weniger Schichten als eine dickere Epidermis. Bei physiologischerseits vier verschiedenen Epidermis-Schichten ist eine Mindestanzahl von vier Schichten notwendig, um der Struktur der *in vivo* Haut zu ähneln. Eine dünne Epidermis weicht also nicht nur quantitativ

Ergebnisse

in der Größe, sondern auch qualitativ in der Struktur von einer *in vivo* Epidermis ab. Eine dünnere Epidermis-Dicke geht folglich mit einem Qualitätsverlust einher. Umgekehrt verlangt eine dickere Epidermis höhere Proliferationsraten und Zellproduktivität und gilt daher als qualitativ hochwertiger da vitaler. Abbildung 3-4 zeigt die Verteilung der Mittelwerte von drei gemessenen Stellen innerhalb der Epidermis aller 144 Vollhautmodelle, aufgetragen auf den jeweiligen Zellspender.

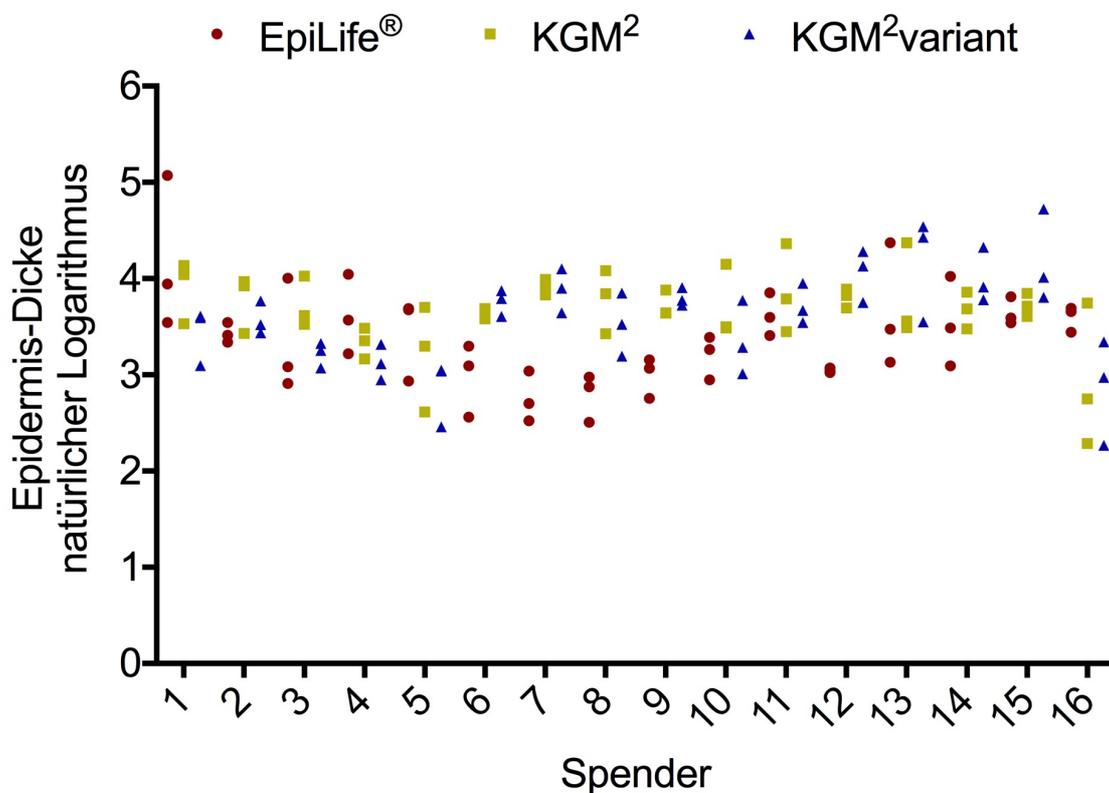


Abbildung 3-4: Dicke der Epidermis in 144 Vollhautmodellen

Auf der X-Achse sind die Spender nummeriert von 1 bis 16 aufgetragen. Pro Spender wurden 9 Vollhautmodelle untersucht, 3 Vollhautmodelle je Mediumprotokoll, sodass insgesamt 144 Vollhautmodelle untersucht wurden. Die gemessenen Epidermis-Dicken in EpiLife® sind rot dargestellt, KGM² gelb und KGM²variant blau. Die auf der Y-Achse aufgetragene Epidermis-Dicke wurde in Anlehnung an die statistische Analyse, durch Anwendung des natürlichen Logarithmus zur Generierung einer Normalverteilung, transformiert.

Abbildung modifiziert wiedergegeben. Quelle: Lange, Weil *et al.* (2016) (schriftliche Genehmigung liegt vor).

Ergebnisse

Wird nur die Epidermis-Dicken nach EpiLife®-Kultur betrachtet, so zeigen sich Spender 1, 4, 5 und 16 als die Vollhautmodelle mit der durchschnittlich dicksten Epidermis im Vergleich zu den Modellen, die mit einem der beiden anderen Medien kultiviert wurden. Unter KGM²variant-Kultivierung fanden sich bei den Spendern 6, 9, 12, 13, 14 und 15 durchschnittlich größere Epidermis-Dicken als unter EpiLife®- oder KGM²-Kultivierung. Die Epidermis war im Vergleich mit den beiden anderen Medien bei Spender 2, 3, 7, 8, 10 und 11 mit KGM²-Medium durchschnittlich am dicksten. Zusammengefasst fanden sich bei Verwendung von EpiLife® Epidermis-Dicken im Bereich von 12,3 µm bis 159,6 µm, bei KGM²variant Dicken von 9,7 µm bis 112,4 µm und bei KGM² Epidermis-Dicken von 9,9 µm bis 79,2 µm. Zu berücksichtigen gilt allerdings, dass nur vier Vollhautmodelle, also 3 % aller Epidermis-Dicken über 80 µm groß waren. Abgesehen von diesen Ausreißern lagen alle anderen Epidermis-Dicken zwischen knapp 10 µm und 80 µm Dicke, ähnlich der physiologischen Epidermis-Dicke.

Es fällt in der deskriptiven Statistik auf, dass innerhalb eines Spenders die Epidermis-Dicken verschiedener Hautmodelle trotz unterschiedlichem Medium eng beieinanderlagen. Die Epidermis-Dicken unterschieden sich stärker von Spender zu Spender als innerhalb eines Spenders nach Kultivierung mit verschiedenen Medien. Ebenso erkennbar ist eine geringe Dickendifferenz der Vollhautmodelle innerhalb einer Mediengruppe. Die Differenzen der Epidermis-Dicken zwischen verschiedenen Spendern oder verschiedenen Kultivierungsmedien dagegen waren größer.

Der Median der Epidermis-Dicken bei EpiLife®-Kultur lag bei 28,9 µm, bei KGM²-Kultur bei 37,6 µm und bei KGM²variant-Kultur bei 39,9 µm. Abbildung 3-5 gibt einen Überblick über die Epidermis-Dicken der 144 Vollhautmodelle in Abhängigkeit vom verwendeten Medium. Die Abbildung zeigt einen Größenvorteil nach Kultivierung mit KGM²variant, sowie eine im Median dünnere Epidermis nach EpiLife®-Kultivierung. Wird die Verteilung der gemessenen

Ergebnisse

Epidermis-Dicken in Abbildung 3-5 genauer betrachtet, fällt auf, dass bei allen drei Kulturmedien keine Normalverteilung vorlag.

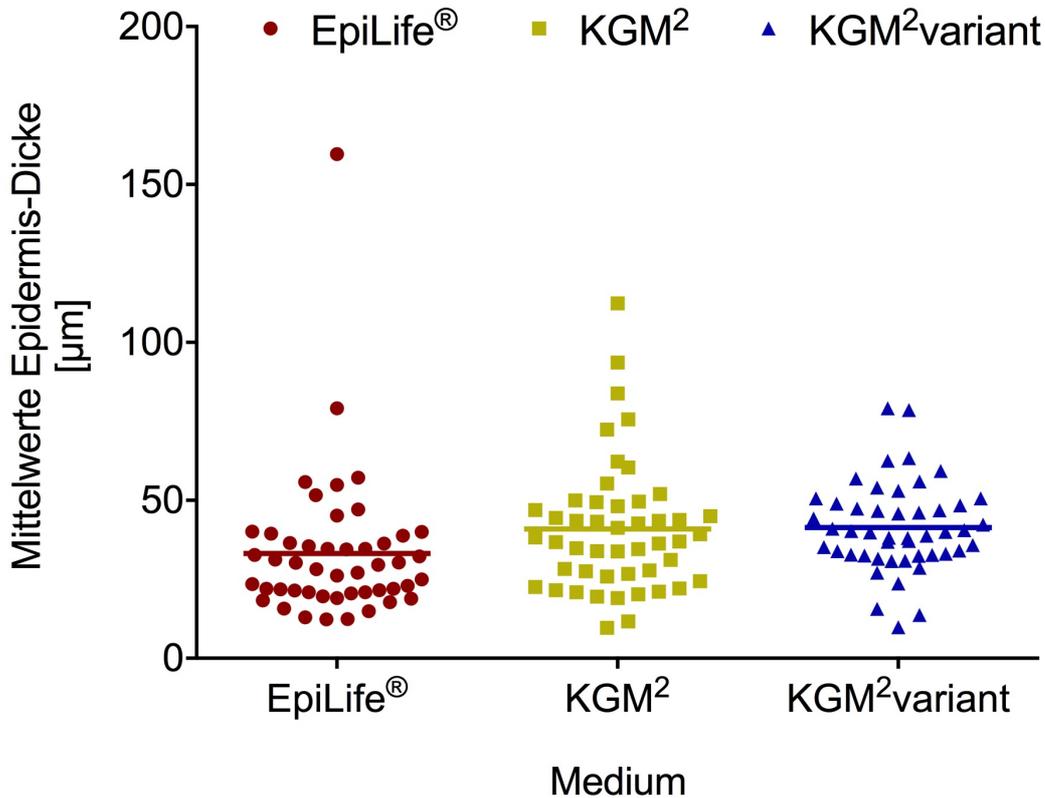


Abbildung 3-5: Dicke der Epidermis in 144 Vollhautmodellen im Zusammenhang mit EpiLife®, KGM² und KGM²variant

Dargestellt ist der Median der Epidermis-Dicke von 144 Vollhautmodellen in Abhängigkeit vom verwendeten Kulturmedium (horizontale Linie). Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aller drei Messpunkte in der Epidermis in einem Vollhautmodellquerschnitt pro Spender und Medium. Der Median aller gemessenen Epidermis-Dicken ist bei EpiLife®-Medium am kleinsten und bei KGM²variant am größten.

Abbildung modifiziert wiedergegeben. Quelle: Lange, Weil *et al.* (2016) (schriftliche Genehmigung liegt vor).

Zur Demonstration einer sehr dicken und einer sehr dünnen Epidermis zeigt Abbildung 3-6 exemplarisch zwei Hautmodellquerschnitte nach histologischer Aufarbeitung und H.E.-Färbung. Dargestellt sind die dickste Epidermis nach

Ergebnisse

Kultivierung mit EpiLife® (Spender 1) und die dünnste Epidermis nach Kultivierung mit KGM² (Spender 16).

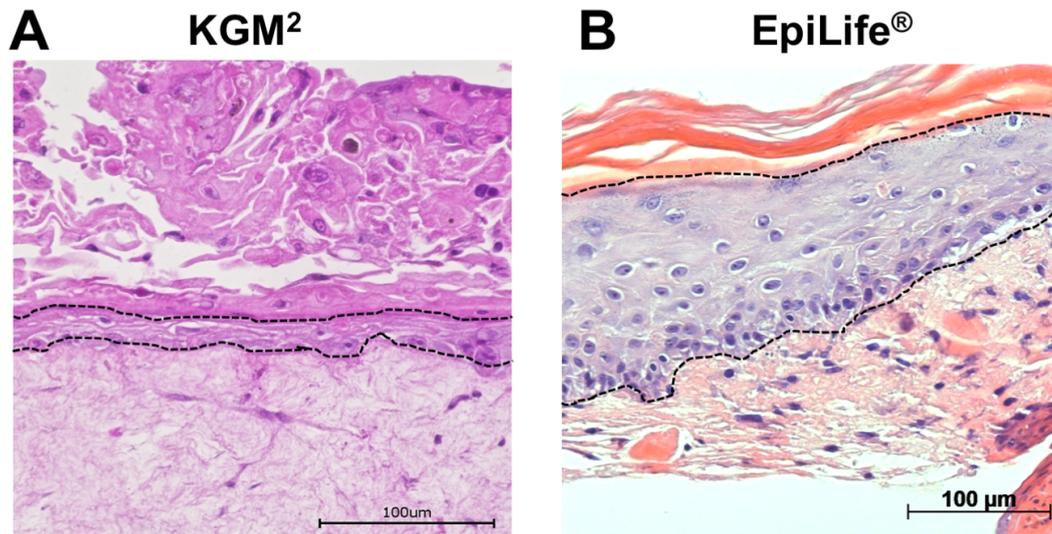


Abbildung 3-6: Vergleich von Vollhautmodellen mit kleiner und großer Epidermis-Dicke

Dargestellt sind Querschnitte von zwei Vollhautmodellen von verschiedenen Spendern. Der für die Messung der Epidermis herangezogene Bereich ist durch schwarze gestrichelte Linien markiert. **A** zeigt die dünnste gemessene Epidermis, die zum Hautmodell von Spender 16 nach KGM²-Kultivierung gehörte. Die gemessene Dicke lag bei knapp 10 µm. **B** zeigt die dickste gemessene Epidermis, die im Hautmodell von Spender 1 nach EpiLife®-Kultivierung auftrat. Die Dicke betrug knapp 160 µm. Bei beiden Querschnitten wurde H.E.-Färbung durchgeführt. Die Skala beträgt 100 µm.

An diesen Beispielbildern ist erkennbar, dass in einer sehr dünnen Epidermis nicht alle relevanten Schichten ausgebildet wurden, wohingegen in der 160 µm dicken Epidermis alle physiologischen Schichten vorhanden waren (Abbildung 3-6B). Das Stratum spinosum und das Stratum granulosum fehlten bei der dünnen Epidermis (Abbildung 3-6A). Bei **B** außerdem zu sehen ist die physiologische Zylinderform der Zellen des Stratum basale, die sich bei **A** mit der dünnen Epidermis nicht darstellte. In **A** sind Zellkerne in der Hornschicht zu erkennen. In der Abbildung **B** ist das Stratum corneum komplett frei von Zellkernen.

Zusätzlich zur deskriptiven Statistik wurde durch eine univariate Analyse des Zusammenhangs zwischen verwendetem Kulturmedium und der Epidermis-Dicke durchgeführt. Abbildung 3-7 stellt die univariate Analyse des Einflusses des verwendeten Mediums auf die Epidermis-Dicke in Form einer *Forest-Plots* dar. KGM² stellte in dieser Analyse das Referenzmedium dar.

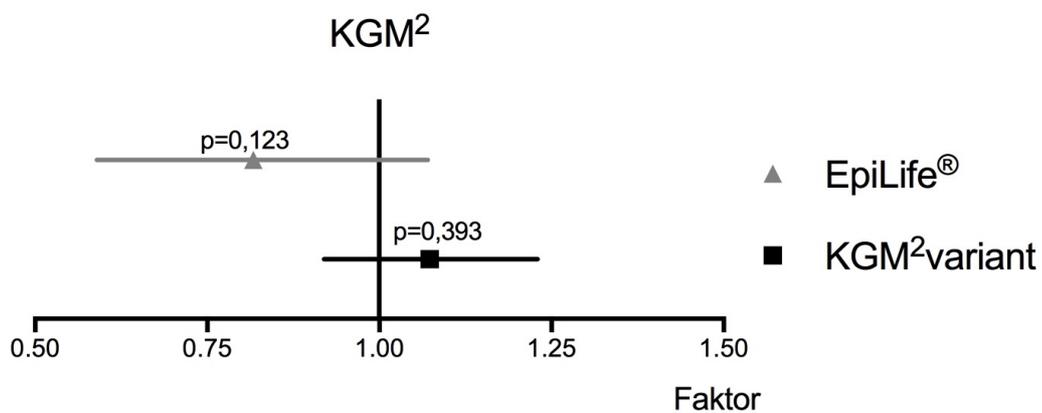


Abbildung 3-7: Univariate Analyse des Einflusses des Mediums auf die Epidermis-Dicke.

Auf der X-Achse ist der errechnete Faktor aufgetragen, um den die Epidermis-Dicke, bezogen auf das Referenzmedium, nach Kultur mit EpiLife[®] oder KGM²variant größer oder kleiner war. KGM² stellte das Referenzmedium dar. Der errechnete Wert ist als Dreieck (EpiLife[®]) bzw. Viereck (KGM²variant) mit einer horizontalen Linie als Darstellung des 95 % Konfidenzintervalls dargestellt. Bei KGM² als Referenzmedium fand sich im Vergleich der Epidermis-Dicken kein signifikanter Unterschied zur Kultur mit EpiLife[®] ($p=0,123$) oder KGM²variant ($p=0,393$).

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach Lange, Weil *et al.* (2016). (Schriftliche Genehmigung liegt vor.)

Es zeigte sich ein Trend in Richtung dickerer Epidermis nach KGM²variant Kultivierung im Vergleich zur Kultur mit KGM². Nach Kultivierung mit KGM²variant wurde eine 1,07fach ($p=0,393$, 95 %-CI 0.92 – 1.23) dickere Epidermis-Dicke im Vergleich zu KGM² erreicht. Nach EpiLife[®]-Kultivierung dagegen zeigte sich ein

Trend mit dem Faktor 0,79 ($p=0,123$, 95 %-CI 0.59 – 1.07) in Richtung dünnerer Epidermis im Vergleich zur Kultivierung mit dem Referenzmedium KGM².

3.2.3 Einfluss des Kulturmediums auf die Dermis-Dicke

Neben der Epidermis wurde auch die Dicke der Dermis aller erstellten Vollhautmodelle als Bewertungskriterium untersucht. Innerhalb der Dermis finden sich unter anderem Blutgefäße, über die die Epidermis *in vivo* passiv über Diffusion ernährt wird. Durch ihre Morphologie und Struktur dient die Dermis außerdem der Festigkeit der Haut gegenüber Zug- und Scherkräften. Sie ist wesentlich bei der Ausbildung einer Basalmembran beteiligt. In den hergestellten Vollhautmodellen bestand die Dermis ausschließlich aus Fibroblasten und aus Extrazellulärmatrix. Im Hautmodell kann die Dermis für andere Zellen oder Stoffe, welche gezielt untersucht werden sollen, als Trägersystem dienen. Dies erfordert eine gewisse Größe der Dermis. Eine größere Dermis bietet für Signalstoffe ein größeres Reservoir. Physiologisch variiert die Dicke der Dermis zwischen 500 bis 1.500 μm . Abbildung 3-8 zeigt die gemessenen Dermis-Dicken von allen Vollhautmodellen. Wie bei der Untersuchung der Epidermis-Dicken wurden insgesamt 144 Vollhautmodell von 16 verschiedenen Spendern untersucht, wobei von jedem Spender 9 Hautmodelle hergestellt wurden, von denen 3 jeweils mit EpiLife[®]-, mit KGM²- oder mit KGM²variant-Medium kultiviert wurden. In Abbildung 3-8 aufgetragen sind die Mittelwerte dreier Längenmesspunkte an je einem Vollhautmodellquerschnitt.

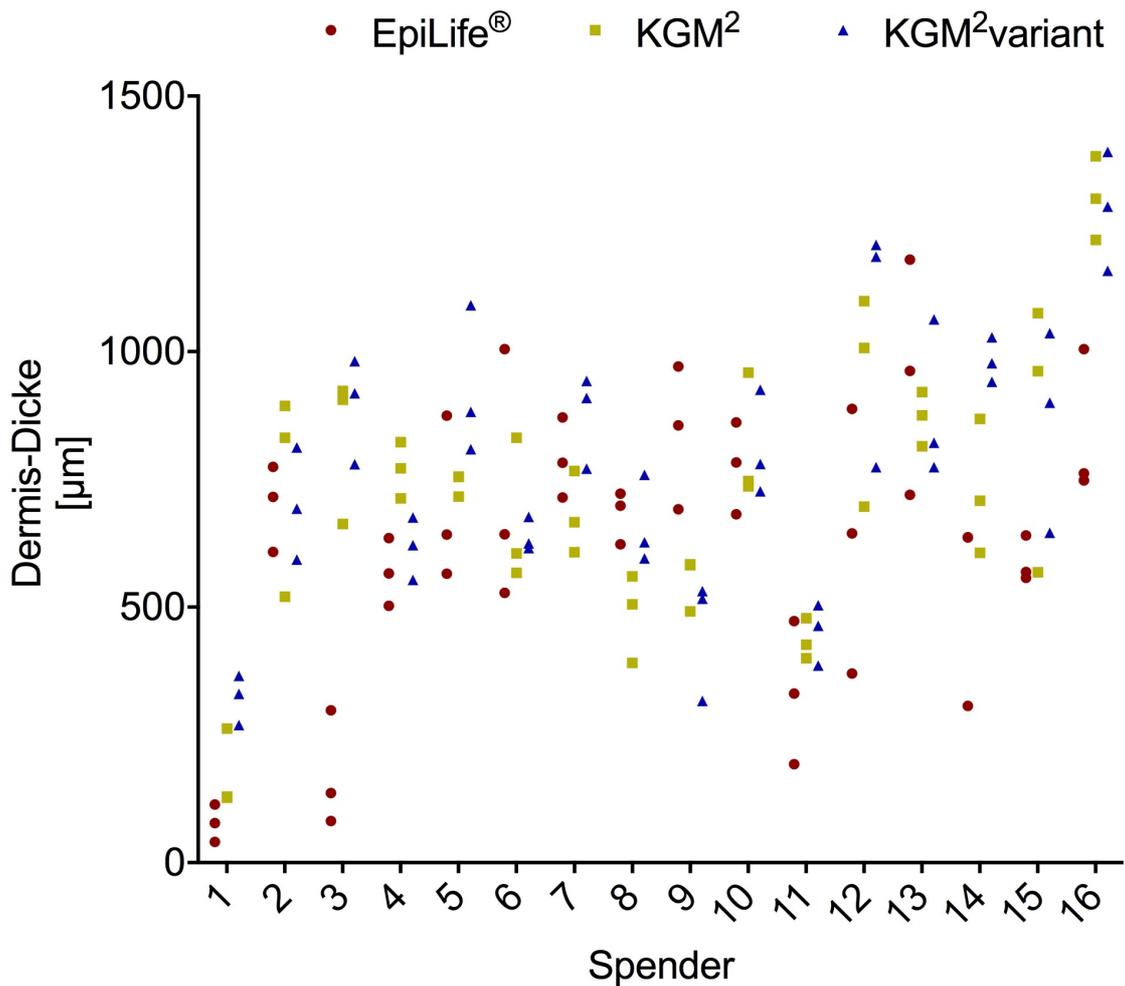


Abbildung 3-8: Dicke der Dermis in 144 Vollhautmodellen

Dargestellt sind die Dermis-Dicken aller 144 Vollhautmodelle. Pro Spenderhautmodell wurden drei Messwerte, jeweils als Mittelwert dreier Messstellen innerhalb der Dermis eines Vollhautmodells, erhoben, sodass im Diagramm pro Spender und Medium drei Werte aufgetragen sind. Rot dargestellt sind die Dermis-Dicken für EpiLife®, gelb für KGM² und blau für KGM²variant.

Abbildung modifiziert wiedergegeben. Quelle: Lange, Weil *et al.* (2016) (schriftliche Genehmigung liegt vor).

Bei den Vollhautmodellen der Spender 1, 3, 5, 7, 11, 12 und 14 war die Dermis in der Kultur mit KGM²variant am größten gewachsen. Die Dermis der Vollhautmodelle der Spender 2, 4, 10, 15 und 16 proliferierte am stärksten im Beisein von KGM². EpiLife® generierte bei den Vollhautmodellen der Spender 6, 8, 9 und 13 die größte Dermis.

Ergebnisse

Die dickste Dermis fand sich mit 1.390,7 μm bei einem Vollhautmodell, welches mit KGM²variant-Medium kultiviert wurde. Die dünnste Dermis war 40,7 μm groß und entstand nach EpiLife[®]-Kultivierung. Insgesamt fanden sich Dermis-Dicken nach EpiLife[®]-Kultivierung von 40,7 μm bis 1.080,1 μm , nach KGM²-Kultivierung fanden sich Dicken von 127 μm bis 1.382,3 μm und nach KGM²variant-Kultivierung fanden sich Dermis-Dicken von 269,5 μm bis 1.390,7 μm . Werden die Verteilungen der Dermis-Dicken pro Spender betrachtet, liegen die Dermis-Dicken der Hautmodelle stets nah beieinander. Die Dermis-Dicken unterschieden sich stärker von Spender zu Spender als innerhalb eines Spenders nach Kultivierung mit verschiedenen Medien. Ebenso erkennbar ist eine geringere Dickendifferenz der Vollhautmodelle innerhalb einer Mediengruppe, wohingegen die Differenzen der Dermis-Dicken zwischen verschiedenen Spendern oder verschiedenen Kultivierungsmedien größer waren.

In Abbildung 3-9 werden die gemessenen Dermis-Dicken aller Vollhautmodelle aufgeteilt auf die drei verwendeten Kulturmedien gegenübergestellt. Die Abbildung zeigt einen Größenvorteil nach Kultivierung mit KGM²variant. Aufgeteilt auf die drei verwendeten Kultivierungsmedien zeigt sich außerdem eine heterogene Verteilung der gemessenen Dermis-Dicken in Form einer Gauß-Verteilung.

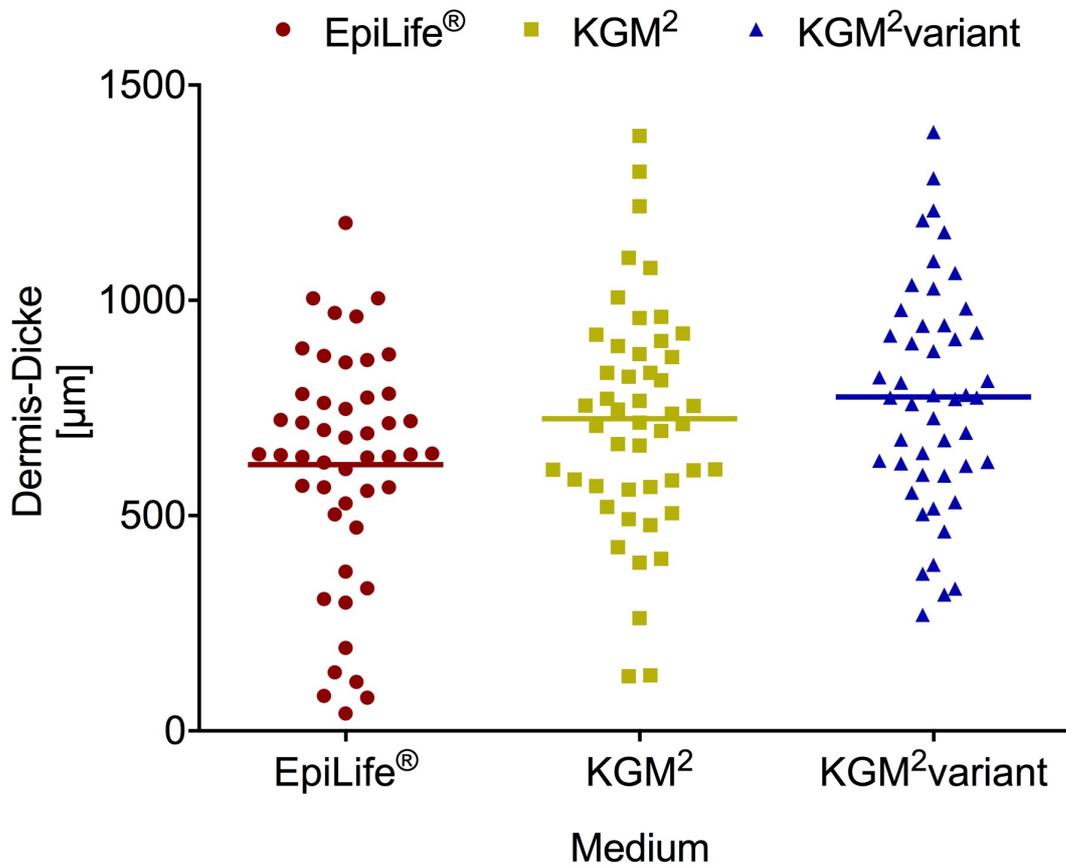


Abbildung 3-9: Dicke der Dermis in 144 Vollhautmodellen im Zusammenhang mit EpiLife®, KGM² und KGM²variant

Der Median der Dermis-Dicken von 144 Vollhautmodellen in Abhängigkeit vom verwendeten Kulturmedium ist als horizontale Linie aufgetragen. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aller drei Messpunkte in der Dermis in einem Vollhautmodellquerschnitt pro Spender und Medium. Der Median aller gemessenen Dermis-Dicken ist bei EpiLife®-Medium am kleinsten und bei KGM²variant am größten.

Abbildung modifiziert wiedergegeben. Quelle: Lange, Weil *et al.* (2016) (schriftliche Genehmigung liegt vor).

Zusätzlich zur deskriptiven Statistik wurde eine univariate Analyse angestellt. Abbildung 3-10 zeigt die dabei berechneten Differenzen der Dermis-Dicken zwischen den Vollhautmodellen, abhängig vom verwendeten Kulturmedium, in Form eines *Forest-Plots*. KGM² wurde als Referenzmedium verwendet. Es zeigte sich ein Trend hin zur 106,4 µm kleineren Dermis ($p=0,070$, 95 %-CI 221.6 – 8.7),

Ergebnisse

wenn als Kulturmedium EpiLife® statt KGM² verwendet wurde. Unter Kultivierung mit KGM²variant dagegen wurde die Dermis durchschnittlich um 50,8 µm dicker im Vergleich zu KGM² als Referenzmedium (p=0,072, 95 %-CI -4.6 – 106.1). Die Dicken-Unterschiede zeigten sich jeweils *borderline*-signifikant.

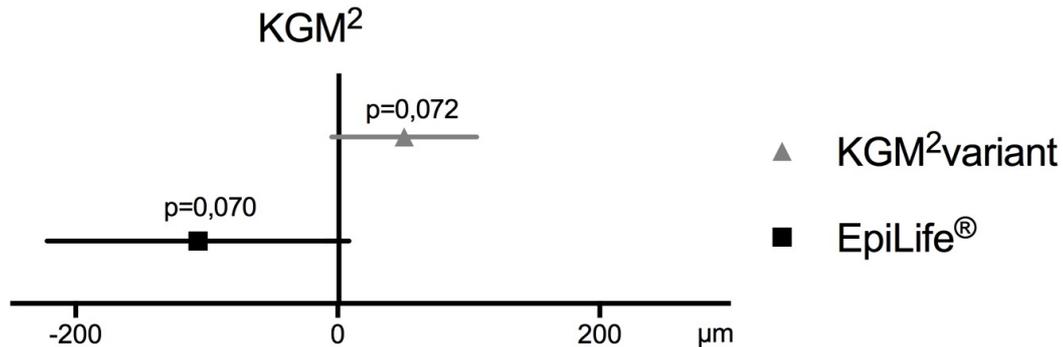


Abbildung 3-10: Univariate Analyse des Einflusses des Mediums auf die Dermis-Dicke

Als Dreieck bzw. Viereck dargestellt sind die in einer univariaten Analyse berechneten Differenzen der Dermis-Dicken nach KGM²variant- (+50,8 µm) bzw. EpiLife®-Kultivierung (-106.4 µm) im Vergleich zur Kultivierung mit KGM², sowie die jeweiligen 95 % Konfidenzintervalle als horizontale Linie. Es findet sich ein *borderline*-signifikanter Unterschied der Dermis-Dicken in Bezug auf das verwendete Kultivierungsmedium.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach Lange, Weil *et al.* (2016). Schriftliche Genehmigung liegt vor.

3.2.4 Einfluss des Kulturmediums auf den epidermalen Differenzierungsgrad

Ein weiteres Kriterium zur Qualitätsmessung der humanen artifizierten Vollhautmodelle bestand in der Abwesenheit von Zellkernen in der Hornschicht. Die Epidermis wird durch basale multipotente Keratinozyten ständig neu gebildet und damit regelmäßig erneuert. Dabei verändern die Keratinozyten von basalen zu apikalen Schichten durch Differenzierung ihre Morphologie. Am apikalen Ende steht die Hornschicht, welche nach Nukleolyse keine Zellkerne mehr besitzt. Sind hier noch Zellkerne zu finden, spricht man von einer Parakeratose (siehe 1.1.1).

Ergebnisse

In der vorgelegten Studie wurden alle 144 hergestellten Hautmodelle nach Abwesenheit von Zellkernen im Stratum corneum der Epidermis bewertet. Es wurden binäre Daten, in Form von Abwesenheit von Zellkernen (= 1) und Anwesenheit von Zellkernen (= 2) in der Hornschicht der Epidermis, gesammelt. In Abbildung 3-11 sind alle Hautmodelle nach dieser binären Verteilung aufgetragen.

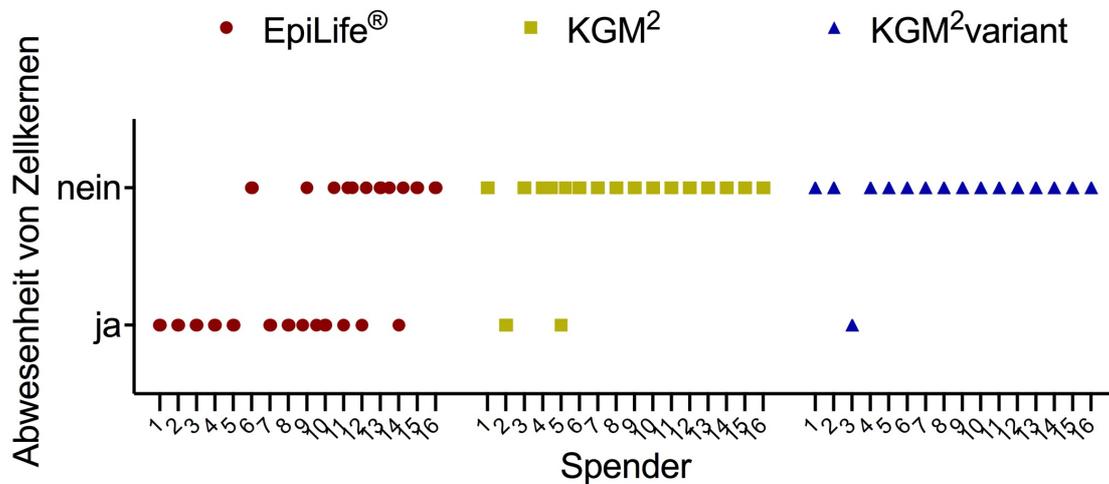


Abbildung 3-11: Abwesenheit von Zellkernen in der Hornschicht in Abhängigkeit vom Medium

Dargestellt sind die Datenpunkte für die Bewertung der Abwesenheit von Zellkernen im Stratum corneum der Epidermis in 144 Hautmodellen in Abhängigkeit vom verwendeten Kulturmedium (rot=EpiLife[®]-Medium, gelb=KGM²-Medium, blau=KGM²variant-Medium). In insgesamt 36 Hautmodellen waren keine Zellkerne in der Hornschicht vorhanden, während in insgesamt 108 Hautmodellen Zellkerne im Stratum corneum der Epidermis gefunden wurden.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach Lange, Weil *et al.* (2016). (Schriftliche Genehmigung liegt vor.)

Nach EpiLife[®] Kultivierung wurden in insgesamt 29 Vollhautmodellen keine Zellkerne innerhalb des Stratum corneum der Epidermis festgestellt, was 60 % aller mit EpiLife[®] hergestellten Vollhautmodelle ausmachte. Im Gegensatz dazu präsentierten sich nach KGM² oder KGM²variant-Kultivierung 44 (KGM²) bzw. 45 (KGM²variant) Vollhautmodelle mit Zellkernen innerhalb der Hornschicht der

Ergebnisse

Epidermis, was jeweils ca. 99 % aller mit dem KGM²- oder KGM²variant-Medium hergestellten Vollhautmodelle ausmachte.

In einer univariaten Analyse konnte gezeigt werden, dass durch die Kultivierung mit EpiLife[®]-Medium im Vergleich zu KGM² signifikant mehr Vollhautmodelle generiert werden konnten, welche keine Zellkerne in der Hornschicht aufwiesen (OR 16,80, $p < 0,001$, 95%-CI 3.35 – 84.24). Wurde KGM²variant als Kulturmedium verwendet, wurden in etwa gleich häufig bis tendenziell weniger häufig keine Zellkerne in der Hornschicht gefunden, als nach Kultur mit KGM² (OR 0,73, $p = 0,823$, 95%-CI 0.05 – 11.18). Abbildung 3-12 bildet die univariate Analyse ab.

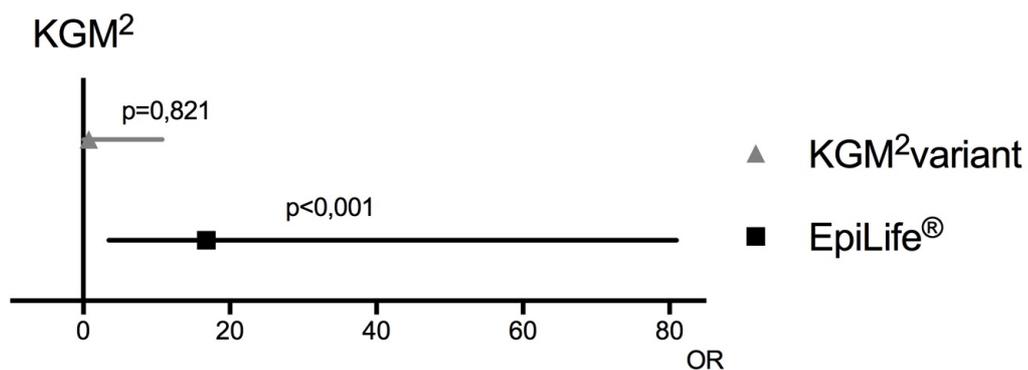


Abbildung 3-12: Univariate Analyse der Odds Ratio bei Abwesenheit von Zellkernen innerhalb des Stratum corneum

Dargestellt ist die Odds Ratio (OR) bei Abwesenheit der Zellkerne innerhalb der Hornschicht nach Kultivierung mit KGM²variant (Dreieck) und nach Kultivierung mit EpiLife[®] (Viereck), aufgetragen mit dem jeweiligen 95 % Konfidenzintervall als horizontale Linie. Unter EpiLife[®] finden sich signifikant die meisten Vollhautmodelle ohne Zellkerne in der Hornschicht ($p < 0,001$).

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach Lange, Weil *et al.* (2016). (Schriftliche Genehmigung liegt vor.)

3.2.5 Einfluss des Kulturmediums auf die dermo-epidermale Adhärenz

Ein weiteres Qualitätsmerkmal der organotypischen Vollhautmodelle stellte die Adhärenz der Epidermis an die Dermis dar. Die Intaktheit einer dermo-epidermalen Verbindung mit komplett anhaftender Epidermis an der Dermis ist

Ergebnisse

physiologisch. Ausschließlich im krankhaften Zustand der *in vivo* Haut finden sich Epidermolysen (Vergleiche Kapitel 1.2). Im Vergleich zur *in vivo* Haut zeigte sich in vielen hergestellten Vollhautmodellen eine teils kurz- oder langstreckige Ablösung der Epidermis von der Dermis. Die Festigkeit dieser Adhärenz wird unter anderem durch die Basalmembran hergestellt (Vergleiche 1.1.3). Die Stärke dieser Adhärenz wurde über vier Abstufungen beschrieben: Epidermis komplett anhaftend, teilweise abgelöst, mehrheitlich abgelöst und komplett abgelöst. Abbildung 3-13 zeigt die dermo-epidermale Verbindungsstärke aller erstellten Vollhautmodelle, aufgeteilt nach dem verwendeten Medium. Dabei zeigt sich eine sehr heterogene Verteilung der verschiedenen Grade, ohne dass ein Medium mit vorwiegend komplett anhaftender Epidermis an der Dermis herausstach.

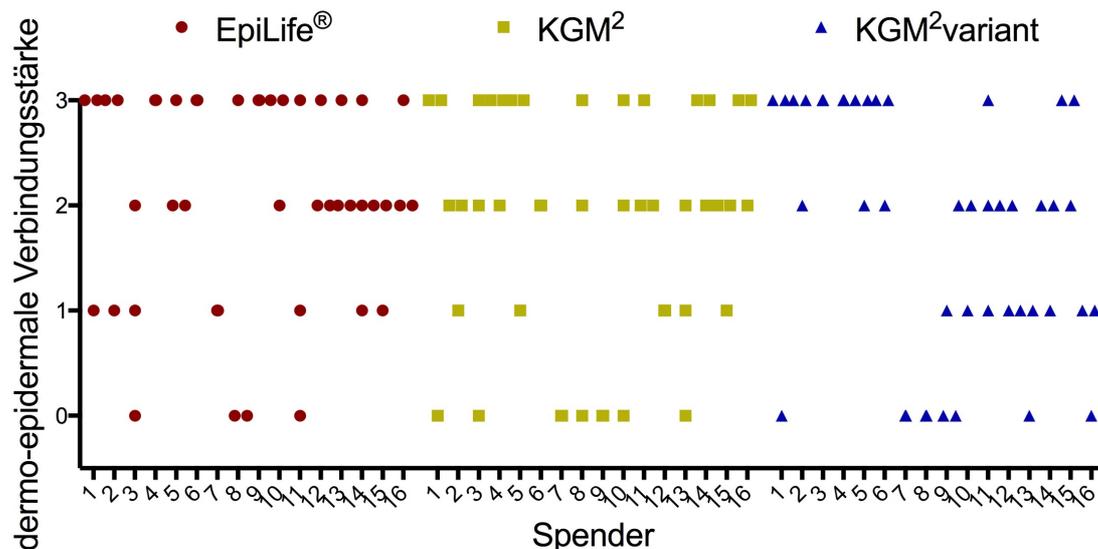


Abbildung 3-13: Dermo-epidermale Verbindungsstärke in 144 Vollhautmodellen

Auf der Y-Achse aufgetragen sind die vier Grade der dermo-epidermalen Verbindungsstärke: 0=Epidermis komplett abgelöst, 1=Epidermis mehrheitlich abgelöst, 2=Epidermis teilweise abgelöst und 3=Epidermis komplett anhaftend. Insgesamt sind die beurteilten Grade von 48 mit EpiLife®-Medium hergestellten Hautmodellen (=rot), 48 mit KGM²-Medium hergestellten Hautmodellen (=gelb) und 48 mit KGM²variant-Medium hergestellten Hautmodellen (=blau) abgebildet.

Ergebnisse

Auf der X-Achse sind nach Medium verteilt jeweils die 16 Hautspender aufgetragen.

Abbildung 3-14 zeigt Grad II und III der dermo-epidermalen Verbindung, prozentual verteilt nach dem verwendeten Medium.

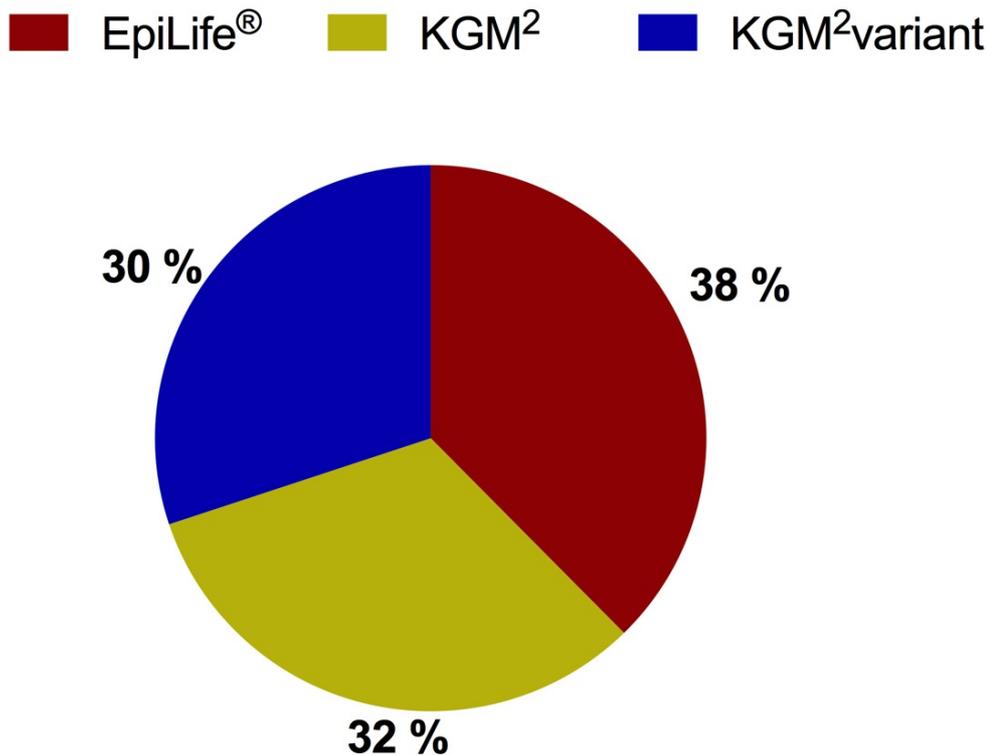


Abbildung 3-14: Dermo-epidermale Verbindungsstärke Grad II und III je nach Medium

Dargestellt ist der Anteil aller dermo-epidermalen Verbindungsstärken Grad II und III je nach verwendetem Kultivierungsmedium. Der höchste Anteil mit 38 % aller Grad II und III gemessenen dermo-epidermalen Adhäsionen wurde nach EpiLife®-Kultivierung gesehen. Es konnte kein signifikanter Einfluss des Mediums auf die dermo-epidermale Verbindungsstärke errechnet werden.

Abbildung 3-15 zeigt die univariate Analyse des Einflusses des Mediums auf die epidermale Adhärenz an die Dermis. Es zeigte sich ein Trend in Richtung höherer Festigkeit der dermo-epidermalen Verbindung im EpiLife®-Protokoll. Es fanden sich weniger von der Dermis abgelöste epidermale Anteile in Schnittbildern nach

Ergebnisse

Kultivierung mit EpiLife® als nach Kultivierung mit KGM²-Medium als Referenz (OR: 2,0, p=0,094). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen KGM² und EpiLife® in Bezug auf die dermo-epidermale Adhärenz.

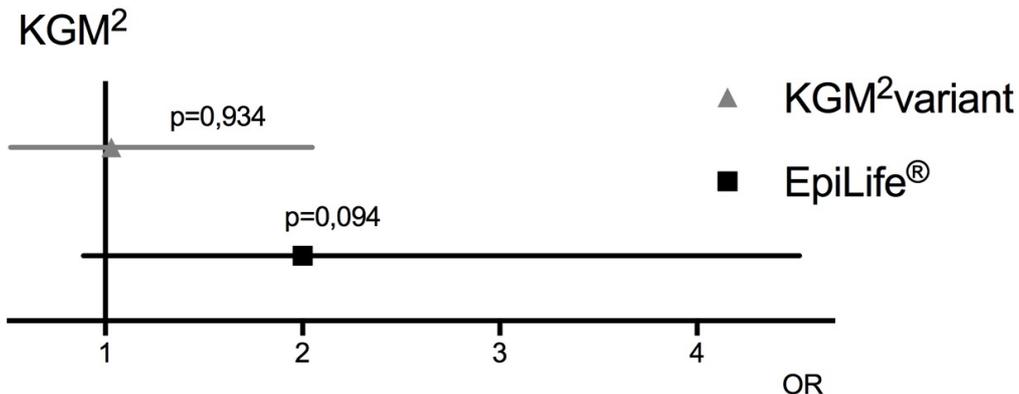


Abbildung 3-15: Univariate Analyse der Odds Ratio bei der dermo-epidermalen Adhärenz

Abgebildet ist die nach einer univariaten Analyse berechnete Odds Ratio (OR) der dermo-epidermalen Verbindungsstärke nach KGM²variant- (Dreieck) bzw. EpiLife®-Kultur (Viereck) im Vergleich zur KGM²-Kultur. Unter EpiLife®-Kultivierung scheint sich eine festere Verbindung der Epidermis zur Dermis auszubilden (p=0,094, OR=2,0). Dieser Trend ist in der univariaten Analyse nicht signifikant.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach Lange, Weil *et al.* (2016). (Schriftliche Genehmigung liegt vor.)

3.3 Einfluss der Dermis-Dicke auf die Epidermis-Dicke

Neben univariaten Analysen des Einflusses des verwendeten Kultivierungsmediums auf die Vollhautmodell-Qualitätskriterien wurden multivariable Analysen angestellt. Bei der multivariablen Analyse des Einflusses des Mediums auf die Epidermis-Dicke wurden „Dermis-Dicke“ und „Abwesenheit von Zellkernen in der Hornschicht“ als einflussnehmende Kovariablen definiert. Dabei konnte ein reziproker Einfluss der Dermis-Dicke auf die Epidermis-Dicke gezeigt werden. Die Epidermis wurde um den Faktor 0,94 kleiner, bei jeden 100 µm, die die Dermis im Vollhautmodell dicker war (p=0,001). In Abbildung 3-16

Ergebnisse

sind sechs repräsentative Vollhautmodelle abgebildet, die den Zusammenhang einer dünnen Epidermis bei dickerer Dermis demonstrieren.

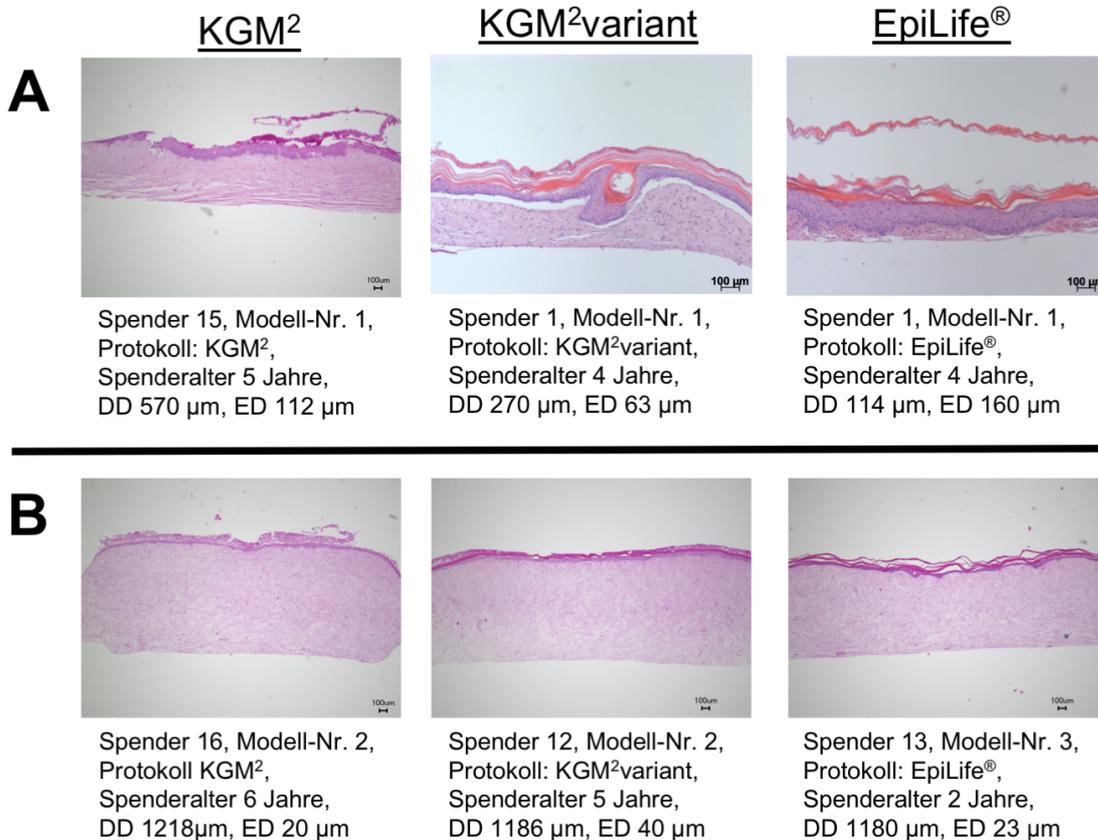


Abbildung 3-16: Einfluss der Dermis- auf die Epidermis-Dicke.

Zu sehen sind repräsentative histologische Querschnitte von Vollhautmodellen nach Kultivierung mit KGM², KGM²variant und EpiLife[®]. **A** zeigt drei Vollhautmodelle mit einer relativ zu den Vollhautmodellen unter **B** dickeren Epidermis (Epidermis-Dicken von 112 µm, 63 µm und 160 µm). Die Dermis-Dicken waren bei 570 µm, 270 µm und 114 µm. **B** zeigt drei Vollhautmodelle mit einer relativ zu den Vollhautmodellen unter **A** dünneren Epidermis (Epidermis-Dicken von 20 µm, 40 µm und 23 µm). Die Dermis-Dicken waren im Gegensatz zu den Vollhautmodellen unter **A** bis zu 10fach dicker. H.E.-Färbung. Skala 100 µm.

In Abbildung 3-17 ist der Zusammenhang einer dünneren Epidermis bei dicker werdender Dermis grafisch dargestellt.

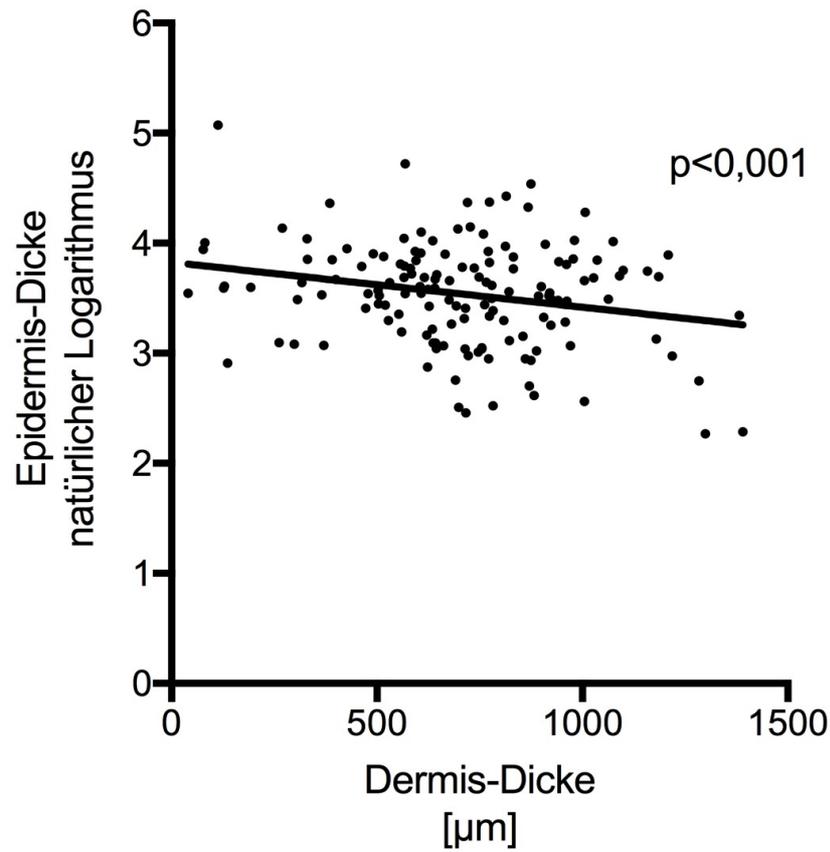


Abbildung 3-17: Zusammenhang zwischen der Dicke der Dermis und der Epidermis

Im Diagramm ist für jedes der 144 Vollhautmodelle die gemessene Epidermis-Dicke (Transformiert auf den natürlichen Logarithmus) auf der Y-Achse auf die gemessene Dermis-Dicke auf der X-Achse aufgetragen. Es lässt sich ein Abwärtstrend mit dünner werdender Epidermis bei dicker werdender Dermis ablesen ($p < 0,001$).

3.4 Einfluss des Spenderalters auf die Qualität von Vollhautmodellen

In Kapitel 3.2 wurde gezeigt, dass es einen Einfluss des verwendeten Mediums auf die Vollhautmodellqualität gab. Bei Betrachtung der gemessenen Epidermis- und Dermis-Dicken fiel auf, dass es vor allem Größenunterschiede zwischen verschiedenen Spendern gab, wohingegen Hautmodelle vom selben Spender mit unterschiedlichen Medien geringer ausfielen. Es wurden mittels GEE von Regressionsanalysen zusätzlich zur Untersuchung des Mediumeinflusses

univariate Analysen angestellt, um einen Einfluss des Alters der Vorhautspender zu untersuchen. Dem Studiendesign entsprechend wurden ausschließlich juvenile Vorhautspender als Keratinozyten- und Fibroblastenspende zugelassen. Das mittlere Alter der Spender betrug 4,5 Jahre. Abbildung 3-1 zeigt die Verteilung der Altersklassen. Für die Analyse des Einflusses des Alters auf die Qualität der Vollhautmodelle wurden alle 144 Vollhautmodelle den erstellten Bewertungskriterien von Tabelle 2.5-1 unterzogen. Wie bei der Analyse des Medium-Einflusses auf die Vollhautmodellqualität beschrieben, setzten sich die 144 hergestellten Vollhautmodelle aus 48 Vollhautmodellen je Kulturmedien (EpiLife[®], KGM² und KGM²variant) zusammen. Von den 16 Spendern wurden Vollhautmodelle für jedes Medium in dreifacher Menge erstellt.

3.4.1 Einfluss des Spenderalters auf die Epidermis-Dicke

Eine univariate Analyse des Alters-Einflusses auf die Epidermis-Dicke ergab eine signifikante Reduktion der Dicke um 5 % mit jedem Jahr, welches ein Spender älter wurde (Faktor 0,95, $p=0,001$). Abbildung 3-18 stellt den Zusammenhang des Spenderalters mit den gemessenen Epidermis-Dicken dar.

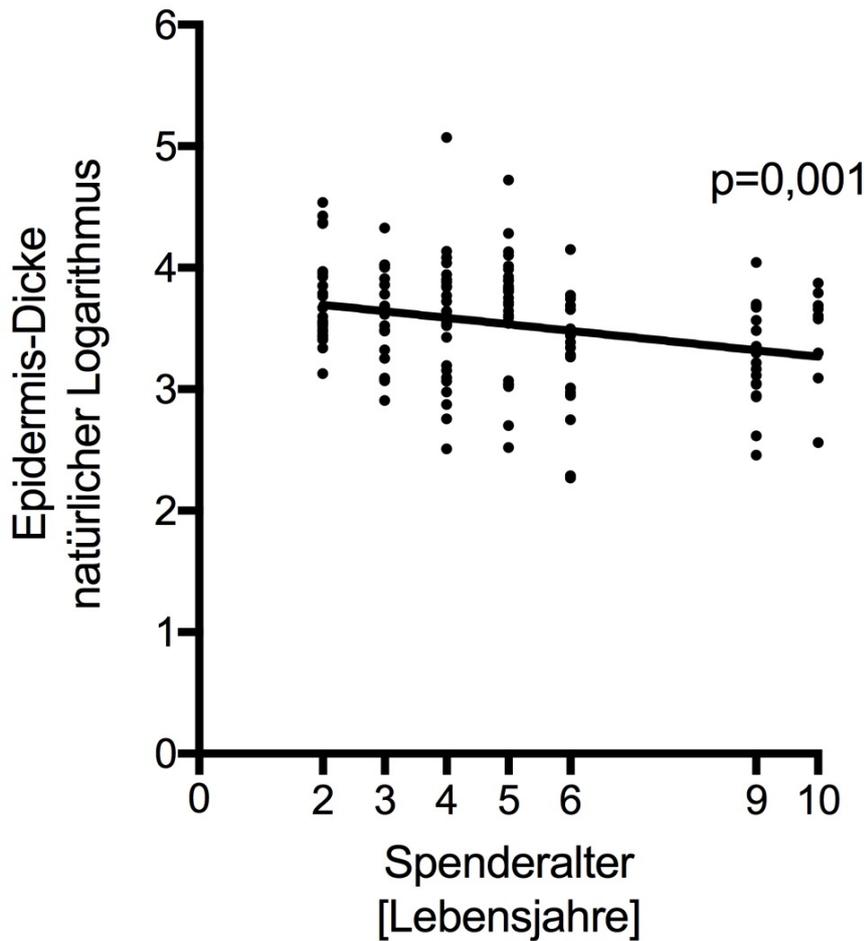


Abbildung 3-18: Einfluss des Spenderalters auf Epidermis-Dicke

Die Datenpunkte zeigen die Epidermis-Dicken aller 144 Vollhautmodelle bezogen auf das Spenderalter. Die schwarze Linie demonstriert die reziproke Abhängigkeit zwischen Epidermis-Dicke und älterem Spender. Die Epidermis-Dicke nahm mit steigendem Spenderalter signifikant ($p=0,001$) ab.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach Lange, Weil *et al.* (2016). (Schriftliche Genehmigung liegt vor.)

Diese reziproke Abhängigkeit der Epidermis-Dicke vom Spenderalter wurde in einer multivariablen Analyse mit den drei verwendeten Kulturmedien als Kovariablen untersucht und bestätigt. Der p -Wert blieb mit 0,001 signifikant (Faktor 0,95, 95 % CI 0,92 – 0,98).

3.4.2 Einfluss des Spenderalters auf die Dermis-Dicke

Eine univariate Analyse des Spenderalters auf die Dermis-Dicke zeigte keinen signifikanten Zusammenhang. Es konnte lediglich ein Trend bei steigendem Spenderalter hin zu einer dickeren Dermis beschrieben werden (Differenz: +15,9 μm , $p=0,29$, 95 % CI -13,4 – 45,2 μm). Abbildung 3-19 demonstriert diesen Zusammenhang.

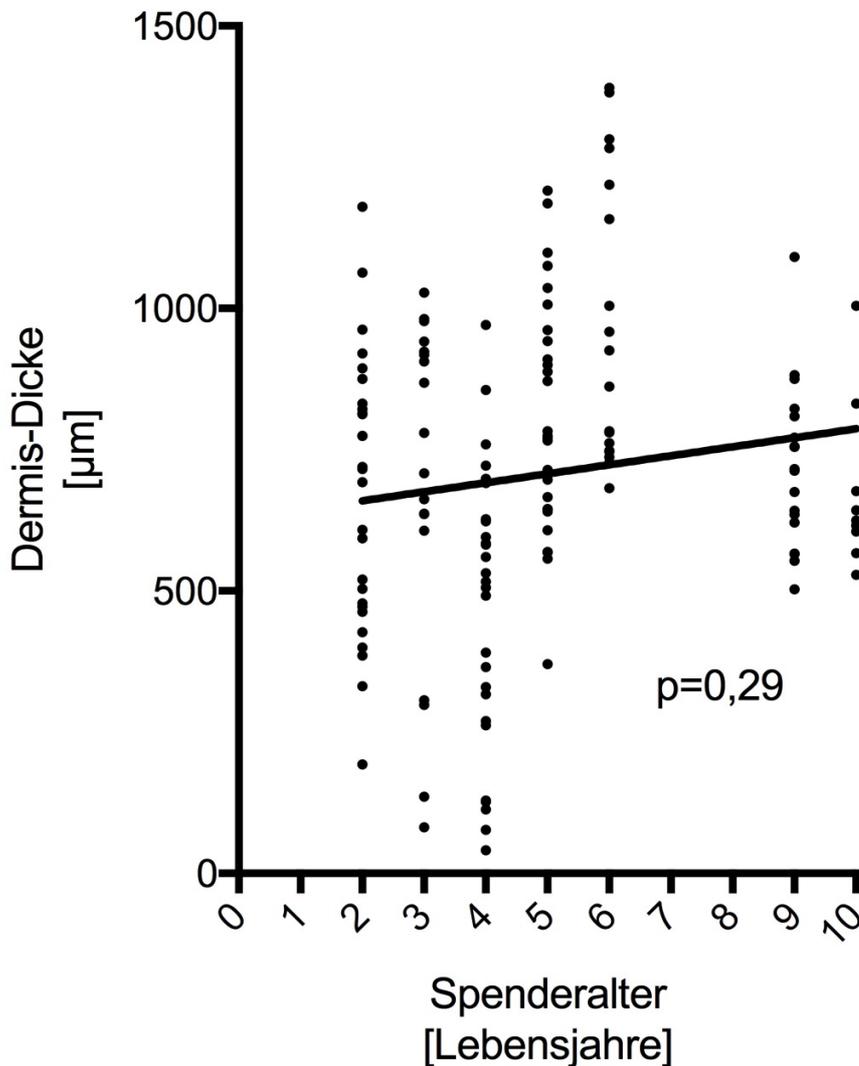


Abbildung 3-19: Einfluss des Spenderalters auf die Dermis-Dicke

Die Datenpunkte zeigen die gemessenen Dermis-Dicken aller 144 erstellten Vollhautmodelle, aufgetragen auf das jeweilige Spenderalter. Die gerade schwarze Linie bildet dabei einen Trend ab mit leichter Steigung im Sinne einer

größeren Dermis-Dicke bei steigendem Spenderalter. Die univariate Analyse konnte keine Signifikanz beschreiben, sodass kein Einfluss des Spenderalters auf die Dermis-Dicke besteht ($p=0,29$).

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach Lange, Weil *et al.* (2016). (Schriftliche Genehmigung liegt vor.)

3.4.3 Einfluss des Spenderalters auf den epidermalen Differenzierungsgrad

In Anlehnung an den Einfluss des Mediums auf den epidermalen Differenzierungsgrad wurde in einer univariaten Analysen der Einfluss des Spenderalters auf die Abwesenheit von Zellkernen innerhalb des Stratum corneum der Epidermis untersucht. Es konnte kein signifikanter Einfluss errechnet werden. ($p=0,64$). Die prozentuale Verteilung aller Vollhautmodell mit einer ausdifferenzierten Epidermis in Abhängigkeit vom Spenderalter ist in Abbildung 3-20 abgebildet.

Ergebnisse

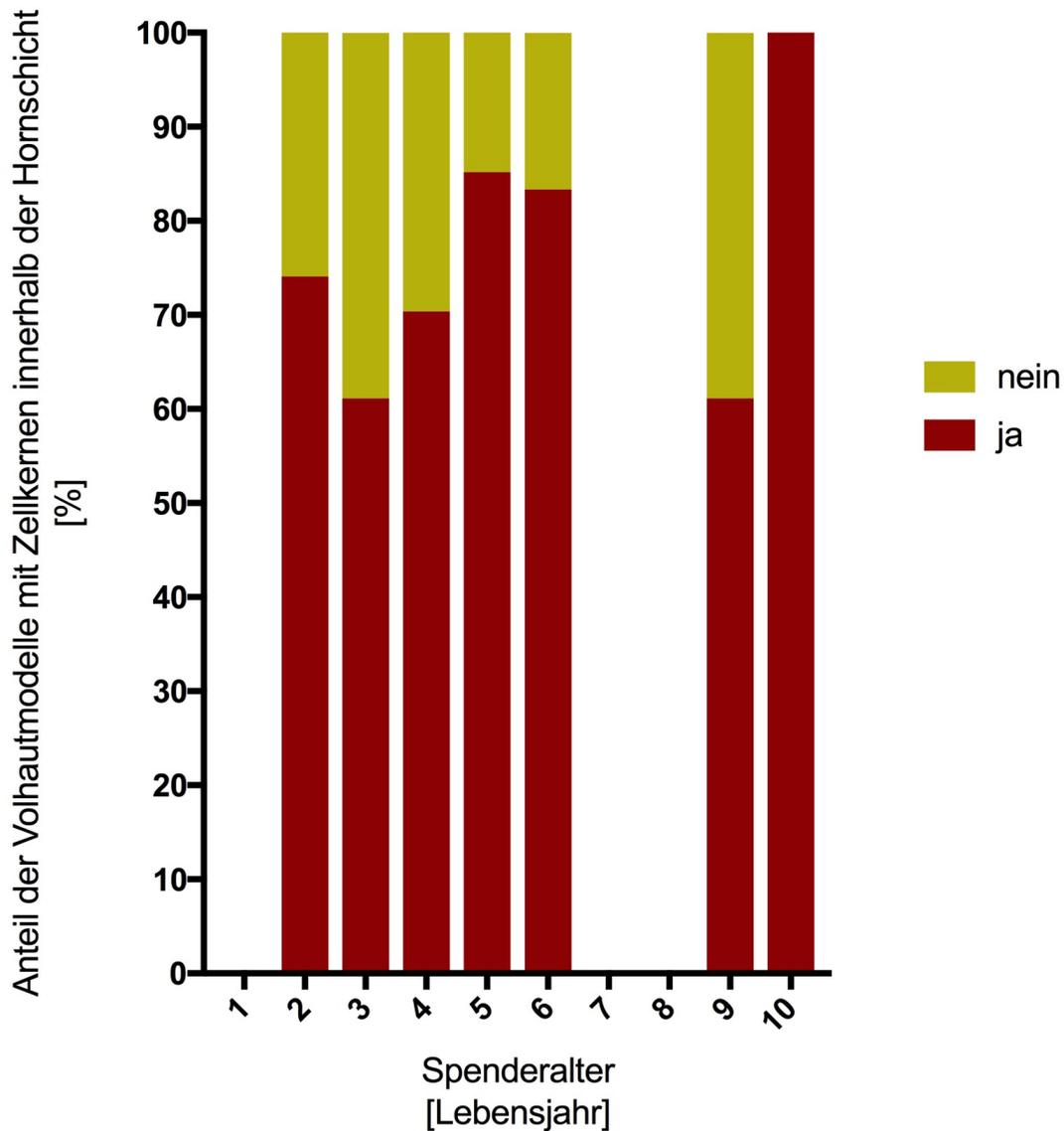


Abbildung 3-20: Einfluss des Spenderalters auf die Ausdifferenzierung

Dargestellt ist der prozentuale Anteil aller Vollhautmodelle mit Zellkernen innerhalb der Hornschicht der Epidermis (ja=rot) oder ohne Zellkerne innerhalb der Hornschicht (nein=gelb), aufgetragen auf das jeweilige Spenderalter.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach Lange, Weil *et al.* (2016). (Schriftliche Genehmigung liegt vor.)

Bezogen auf das Lebensalter wurde bei drei- und neunjährigen Spendern mit durchschnittlich jeweils 36,4 % der höchste Anteil aller Vollhautmodelle mit einer ausdifferenzierten Epidermis ohne Zellkerne in der Hornschicht beschrieben. Bei

Vollhautmodellen von zehnjährigen Spendern wurden zu 100 % Zellkerne in der Hornschicht festgestellt.

3.4.4 Einfluss des Spenderalters auf die dermo-epidermale Verbindungsstärke

Des Weiteren konnte ein signifikanter Einfluss des Alters auf die dermo-epidermale Adhärenz nachgewiesen werden. Das Kreisdiagramm in Abbildung 3-21 zeigt die prozentuale Verteilung aller dermo-epidermalen Verbindungsstärken Grad 2 und 3 abhängig vom Spenderalter (Grad 2=teilweise abgelöste Epidermis, Grad 3=vollständig anhaftende Epidermis). Es zeichnete sich eine stärker werdende Verbindung der Epidermis zur Dermis bei steigendem Spenderalter ab. So hatten 20 % aller generierten Vollhautmodelle von Spendern im Alter von 10 Jahren eine zweit- oder drittgradige dermo-epidermale Anhaftung, wohingegen Vollhautmodelle von Spendern im Alter von 2 Jahren nur 13 % zweit- oder drittgradige Epitheladhärenz aufzeigten.

Eine univariate Analyse zeigte eine signifikant steigende OR von 1,21 für eine bessere Epithelanhaftung mit jedem Lebensjahr, welches ein Spender älter wurde ($p=0,013$, 95 % CI 1.04 – 1.42).

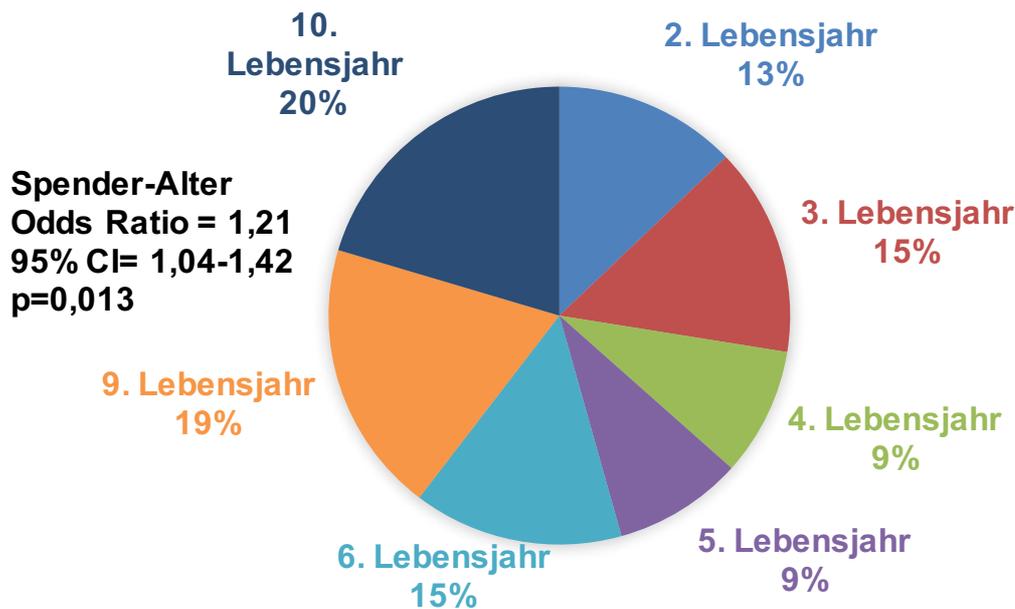


Abbildung 3-21: Einfluss des Spenderalters auf die dermo-epidermale Verbindungsstärke

Berücksichtigt wurden Grad 2 und 3 der Anhaftung der Epidermis an die Dermis (Grad 2: teilweise abgelöste, bis Grad 3: komplett anhaftende Epidermis). Bei neun- (94 % aller Neunjährigen) und zehnjährigen (100 % aller Zehnjährigen) Spendern zeigte sich der höchste prozentuale Anteil aller Spenderhautmodelle mit Grad 2 und 3 Adhärenz der Epidermis zur Dermis. Der Zusammenhang des höheren Alters mit höherem Grad an Adhärenz (OR=1,21, 95 % CI=1,04-1,42) ist signifikant, p=0,013.

In einer im Anschluss durchgeführten multivariablen Analyse mit Einbezug von den drei untersuchten Kultivierungsmedien als Kovariablen blieb ein höheres Alter ein prognostisch günstiger Faktor für eine gute Epidermis-Anhaftung (OR 1,22, 95 %-CI 1.03 – 1.43, p=0,02).

3.5 Einfluss einer Spender-Medium-Interaktion auf die Qualität von Vollhautmodellen

Um einen Einfluss des verwendeten Kulturmediums im Zusammenhang mit dem Spender herauszufinden, wurde eine weitere statistische Analyse mittels GLM durchgeführt. Dabei wurde das verwendete Medium als fester und der Spender als variabler Faktor verwendet. Das Spenderalter wurde in dieser Analyse nicht berücksichtigt, sodass der Spender als individuell einflussnehmender Faktor

Ergebnisse

untersucht wurde, unabhängig vom Alter. Es wurden im Modell ausschließlich die Parameter Epidermis- und Dermis-Dicke berücksichtigt, da die Parameter dermo-epidermale Adhäsion und Abwesenheit von Zellkernen in der Hornschicht als ordinale bzw. binäre Faktoren einen qualitativen Charakter besaßen und damit nicht in die Analyse einbezogen werden konnten. Tabelle 3.5-1 zeigt die Ergebnisse der Analyse, in Abbildung 3-22 werden die Ergebnisse bildhaft dargestellt.

Tabelle 3.5-1: Medium-Spender-Interaktion beeinflusst Epidermis- und Dermis-Dicke

Parameter	Medium Effekt	Spender Effekt	Medium-Spender-Interaktion
Epidermis-Dicke	p=0.057	p=0.250	p<0.001
Dermis-Dicke	p=0.023	p<0.001	p<0.001

Tabelle nach Übersetzung ins Deutsche wörtlich zitiert aus (Lange, Weil *et al.* 2016).

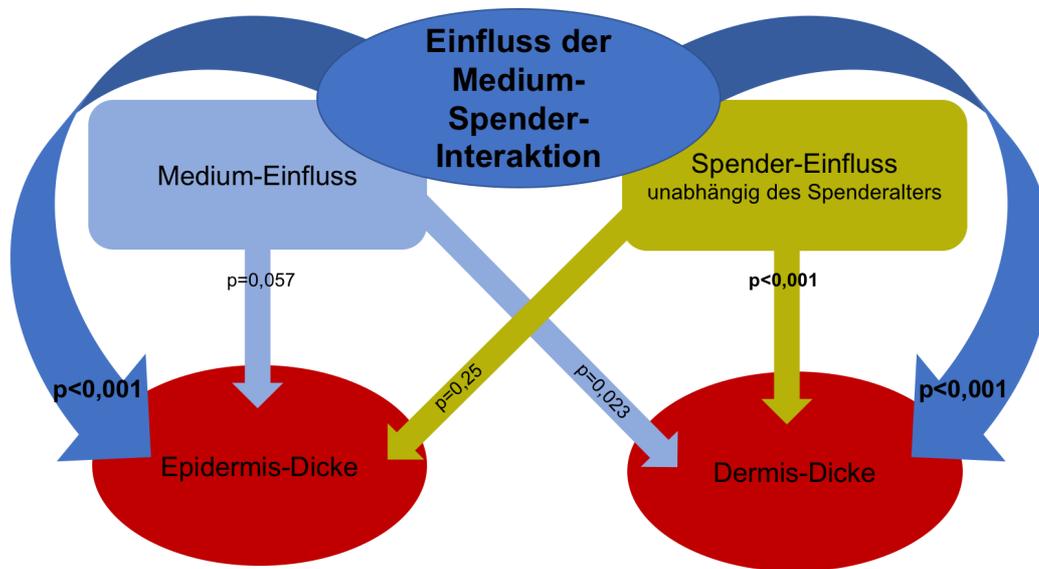


Abbildung 3-22: Einfluss der Interaktion zwischen Medium und Spender

Im Schaubild sind das Kultur-Medium, der Spender und die Medium-Spender-Interaktion als beeinflussende Faktoren auf die Epidermis- und Dermis-Dicke aufgetragen. Die errechneten p-Werte sind aus Tabelle 3.5-1 übernommen. Die Epidermis- und Dermis-Dicke stellen die Zielgrößen dar. Der Medium-Einfluss auf die Epidermis- und Dermis-Dicke, der Spendereinfluss auf die Epidermis- und Dermis-Dicke sowie der Einfluss der Interaktion zwischen Medium und Spender auf die Epidermis- und Dermis-Dicke wurden nach GLM berechnet (Medium als fester Faktor und Spender als variabler Faktor). Signifikant war der Einfluss der Interaktion zwischen Medium und Spender, sowohl auf die Epidermis- als auch auf die Dermis-Dicke ($p < 0,001$).

Die nach Analyse mittels GLM berechneten Ergebnisse demonstrieren vor allem einen signifikanten Einfluss der Interaktion des Spenders mit dem verwendeten Medium auf die Epidermis- und Dermis-Dicke. Es wurde aber auch ein *borderline*-signifikanter Einfluss auf die Epidermis-Dicke durch das Medium alleine beschrieben ($p = 0,057$), wohingegen ein signifikanter Einfluss auf die Dermis-Dicke durch das Medium ($p = 0,023$) gezeigt wurde. Diese Ergebnisse ergänzten die statistische Untersuchung des Medieumeeinflusses auf die Epidermis- und Dermis-Dicke mittels GEE der Regressionsanalysen, die Kapitel 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben wurden. Bei diesen unter 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Analyse konnte ein *borderline*-signifikanter Einfluss des Mediums

Ergebnisse

auf die Dermis-Dicke gezeigt werden, wohingegen sich lediglich ein starker Trend zur dünneren Epidermis nach EpiLife®-Kultivierung abzeichnete ($p=0,123$).

Im GLM wirkte sich der Spendereinfluss, unabhängig vom Spenderalter, signifikant auf die Dermis-Dicke ($p<0,001$) aus, wohingegen auf die Epidermis-Dicke kein signifikanter Einfluss ($p=0,25$) beschrieben wurde.

Beachtenswert bleibt letztendlich vor allem, dass es eine Abhängigkeit zwischen Medium und Spender gab, mit einer auf die Vollhautmodell-Qualität entscheidend einflussnehmenden Interaktion des Spenders mit dem Medium.

4 Diskussion

Hauterkrankungen können in jedem Lebensalter auftreten und gehen meist mit einem hohen Leidensdruck der Betroffenen einher (Gupta, Pur *et al.* 2017). Zur Erforschung der Hauterkrankungen sowie zur Testung verschiedener Therapieverfahren werden seit mehreren Jahrzehnten Tiermodelle verwendet. Die Limitation der Übertragbarkeit von Erforschungen im Tiermodell durch artenspezifische Unterschiede zum Menschen machte es notwendig, dass Alternativen zum Tiermodell entwickelt wurden. Mit der Möglichkeit der Herstellung dreidimensionaler Gewebe *in vitro* wurde eine Alternative geschaffen. *In vitro* hergestellte humane Vollhautmodelle finden in vielen Bereichen der Forschung Anwendung. In diesen dreidimensionalen Testsystemen können zellbiologische Vorgänge *ex vivo* untersucht werden, indem das Modell auf die Fragestellung angepasst hergestellt wird (Mertsching, Weimer *et al.* 2008). Durch den allseitigen Zell-zu-Zell-Kontakt und Zellkontakt zur Extrazellulärmatrix imitieren dreidimensionale humane Vollhautmodelle die Physiologie der menschlichen Haut besser als zweidimensionale Testsysteme oder Tiermodelle (Reuter, Walles *et al.* 2017). Die Möglichkeit, dreidimensionale Kulturen aufzubauen, macht es denkbar, Tiermodelle gänzlich zu ersetzen (Pampaloni, Reynaud *et al.* 2007). Daher wurden in den letzten 30 Jahren eine Vielzahl an verschiedenen Protokollen zur Herstellung artifizierender Vollhautmodelle etabliert, sodass inzwischen eine große Auswahl verschiedener Modelle zur Verfügung steht (Groeber, Holeiter *et al.* 2011).

Für Hauterkrankungen im Fachgebiet der Hämato-Onkologie, wie sie beispielsweise nach einer HSCT auftreten können, wurde bis dato in der Literatur kein *in vitro* hergestelltes Hautmodell beschrieben. Hauterkrankungen nach HSCT werden unter anderem durch Übertragung fremder immunkompetenter T-Lymphozyten verursacht. Dabei kommt es zur immunologischen Reaktion der Spenderlymphozyten mit den Zellen des Empfängers, sodass eine akute GvHD entstehen kann (Ferrara and Yanik 2005). Zielzellen finden sich bei der akuten GvHD unter anderem in der Haut (Nassereddine, Rafei *et al.* 2017). Dickinson *et al.* haben in ihrer Arbeit Hautbiospien von gesunden Spendern entnommen und

innerhalb dieser Biopsien durch spezifische zytotoxische T-Lymphozyten eine hochgradige akute GvHD auslösen können (Dickinson, Wang *et al.* 2002). Im Vergleich zu den explantierten Hautmodellen von Dickinson *et al.* werden *in vitro* hergestellte Hautmodelle nach Isolation von Fibroblasten und Keratinozyten aufwendig im Labor hergestellt. Explantationsmodelle und *in vitro* hergestellte Gewebemodelle sind Alternativen zu *in vivo* Studien. Ein Vorteil der *in vitro* Herstellung ist jedoch, dass das Hautmodell der Fragestellung angepasst hergestellt werden kann (Mertsching, Weimer *et al.* 2008). Komplexe Zusammenhänge zwischen verschiedenen Zellarten innerhalb der Haut können im *in vitro* hergestellten Hautmodell simplifiziert werden, indem ein Modell aus nur wenigen verschiedenen Zellarten hergestellt wird. Der Vorteil eines Explantationsmodells zeigt sich im Vergleich zum *in vitro* hergestellten Hautmodell in einer stetig guten Qualität und hoher Reproduzierbarkeit dieser.

Für zukünftige Forschungsvorhaben wäre ein *in vitro* hergestelltes GvHD-Hautmodell vorstellbar. Hierfür ist jedoch eine gute Qualität des Basis-Vollhautmodells mit hoher Reproduzierbarkeit notwendig. Bei der Herstellung eines humanen artifiziellen Vollhautmodells in größerer Anzahl mit einem etablierten Medium zeigte sich jedoch eine Variabilität im histomorphologischen Bild der Vollhautmodellquerschnitte. Außerdem konnten Unterschiede zur physiologischen *in vivo* Haut festgestellt werden. Somit war es das Ziel dieser Arbeit, einflussnehmende Faktoren auf die Qualität des humanen artifiziellen Vollhautmodells zu erarbeiten, um das Vollhautmodell selbst für den Einsatz in der Forschung optimieren zu können.

An Hand der histomorphologischen Unterschiede wurde in der hier vorgelegten Arbeit ein Bewertungsmodell etabliert, mit dem es möglich war, über objektive Bewertungsparameter die Morphologie eines Vollhautmodells mit der physiologischen Morphologie der *in vivo* Haut zu vergleichen. Die Bewertungsparameter richteten sich nach der nativen *in vivo* Haut, sodass eine Hautmodellqualität dann als gut definiert wurde, wenn die histomorphologische Struktur des Hautmodells dem einer menschlichen Hautbiopsie glich. Hierfür wurden fünf Kriterien definiert: Dicke der Epidermis, Dicke der Dermis,

Schichtanzahl der Epidermis, Adhärenz der Epidermis an der Dermis und Abwesenheit von Zellkernen in der Epidermis. Diese Bewertungsmaske wurde bei insgesamt 144 Vollhautmodellen von 16 verschiedenen Spendern angewandt. Als Kulturmedien wurden das etablierte *Keratinocyte Growth Medium 2* von Promocell® (KGM²) sowie eine Abwandlung desselbigen (KGM²variant) und EpiLife®, ein in der Literatur als effektiv beschriebenes Keratinozyten-proliferationsförderndes Medium von *Thermo Fisher Scientific*, verwendet (Poumay, Dupont *et al.* 2004, Zorn-Kruppa, Volksdorf *et al.* 2016). Allen Medien wurden Supplemente abhängig der Kultivierungsphase beigemischt (Vgl. Abbildung 2-1, Abbildung 2-2 und Abbildung 2-3). Von jedem Spender wurden mit jedem Medium 3 Vollhautmodell-Replikat angefertigt.

In dieser Arbeit wurde – nach bestem Kenntnisstand – erstmals systematisch der Einfluss von Spendereigenschaften im Einklang mit den Kulturmedien auf die histomorphologische Qualität von organotypischen *in vitro* hergestellten Vollhautmodellen untersucht.

Primär konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass mit jedem der drei verwendeten Kulturmedien ein intaktes Vollhautmodell mit physiologischen Strukturen ausgebildet werden kann. Es traten jedoch mediumspezifische Unterschiede im histomorphologischen Bild des Vollhautmodells auf. So zeigte sich ein relevanter positiver Effekt auf die Differenzierung der Epidermis bei Kultur mit EpiLife®-Medium. Unter EpiLife®-Kultivierung traten signifikant weniger Differenzierungsstörungen mit Zellkernen innerhalb des Stratum corneum im Sinne einer Parakeratose auf. Zeigten sich Zellkerne innerhalb des Stratum corneum, so wurde dies in der vorgelegten Arbeit als negatives Kriterium gewertet. Parakeratosen sind ein Merkmal für abnormale Differenzierung der Epidermis (Weindl, Castello *et al.* 2011). Einhergehend mit einer vollständigeren Ausdifferenzierung der Keratinozyten unter EpiLife® passen die Untersuchungen von Zorn-Kruppa *et al.*, die eine bessere Barrierefunktion in einer einfachen mehrschichtigen Keratinozytenkultur nach EpiLife®- als nach KGM²-Kultivierung beschrieben haben (Zorn-Kruppa, Volksdorf *et al.* 2016). Es spielen bei der

Differenzierung der Keratinozyten interzelluläre Kontakte, Kontakte zur Basalmembran, sowie das die Zelle umgebende Mikromilieu eine wichtige Rolle (Andriani, Margulis *et al.* 2003, Groeber, Holeiter *et al.* 2011). Ein Grund für die Abwesenheit von Zellkernen im Stratum corneum der Epidermis nach EpiLife®-Kultivierung könnte Vitamin C sein, welches EpiLife® während der Grenzflächenkultivierung beigemischt und es damit im Mikromilieu der mit EpiLife® kultivierten Vollhautmodelle vorhanden war. Vitamin C war nicht in KGM²- und KGM²variant-Medium enthalten. In der Literatur ist beschrieben, dass es die Differenzierung von Keratinozyten erhöht (Kim, Shin *et al.* 2015). Verschiedene Autoren haben eine Vitamin C-abhängige Verbesserung der Barrierefunktion der Epidermis unter anderem durch Erhöhung der Ceramid-Konzentration in der Hornschicht beschrieben (Ponec, Weerheim *et al.* 1997). Ceramid als Bestandteil des *corneocyte lipid envelope* dient der epidermalen Barrierefunktion und ist eines der meist vorhandenen Stoffe in der Epidermis (Ponec, Weerheim *et al.* 1997, Elias, Gruber *et al.* 2014). Seine Anreicherung innerhalb der Keratinozyten und die Ausdifferenzierung der Keratinozyten werden über Vitamin C gefördert (Kim, Shin *et al.* 2015).

Ein weiterer Unterschied im histomorphologischen Bild der Vollhautmodelle untereinander bestand im Querdurchmesser der Epidermis, der abhängig vom Kulturmedium dicker oder dünner war. Die nach EpiLife®-Kultivierungsprotokoll hergestellten Vollhautmodelle zeigten eine Tendenz zur dünneren Epidermis. Poumay *et al.* haben eine auf die Proliferation der Keratinozyten bezogene größere Effizienz unter EpiLife®-Kultur beschrieben (Poumay, Dupont *et al.* 2004). Bei einer stärkeren Proliferation der Keratinozyten wurde eine dickere Epidermis erwartet, sodass dieser von Poumay *et al.* beschriebene Effekt von EpiLife® nicht gesehen werden konnte. Im Gegenteil, es wurde durch die vorgelegten Ergebnisse eine höhere Proliferationsaktivität der Keratinozyten durch KGM²- und vor allem durch KGM²variant-Medium gezeigt, wobei es keine Signifikanz in den Unterschieden der Epidermis-Dicken gab. Der positive Einfluss auf die Epidermis-Dicke könnte in einer während der Submerskultivierungs-

Phase niedrigen Kalziumkonzentration im KGM²- und KGM²variant-Medium liegen. In der Literatur ist beschrieben, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen einer niedrigen Kalziumkonzentration und einer Intensivierung der Proliferation bei Maus-Keratinocyten gibt (Hennings, Holbrook *et al.* 1980, Hennings, Michael *et al.* 1980, Strudwick, Lang *et al.* 2015). Die Submerskultivierungs-Phase diente beim Aufbau des Vollhautmodells hauptsächlich dem Dickenwachstum durch die Proliferation der Zellarten. Während dieser Phase war Kalziumchlorid im EpiLife[®]-Protokoll mit 1,5 mM viel höher konzentriert als im KGM²- und KGM²variant-Protokoll mit jeweils 0,06 mM. Durch die erhöhte Kalziumkonzentration in EpiLife[®] während der submersen Kultivierungs-Phase könnte die Proliferationsfähigkeit der Keratinocyten zu Gunsten einer frühen Differenzierung gehemmt worden sein, wohingegen die einwöchige Submers-Kultivierung mit KGM² und KGM²variant mit jeweils niedriger Kalziumkonzentration zu einer höheren Proliferationsrate der vorhandenen Keratinocyten geführt haben könnte (Hennings, Michael *et al.* 1980). Die Grenzflächenkultur diente hauptsächlich der vollständigen Differenzierung der epidermalen Komponente (Prunieras, Regnier *et al.* 1983). Während der Grenzflächen-Kultivierung wurde die Kalziumkonzentration bei KGM² und KGM²variant auf 1,92 mM erhöht. Dieser Kalziumswitch führte zur terminalen Differenzierung mit Ausbildung eines Stratum corneum. Im EpiLife[®]-Protokoll fand sich während der Grenzflächen-Kultivierung dieselbe Kalziumkonzentration wie bei der submersen Kultivierung. Nach EpiLife[®]-Kultur zeigte sich dementsprechend eine besser differenzierte Epidermis ohne Zellkerne im Stratum corneum mit einem jedoch dünneren Querdurchmesser der Epidermis. Zu berücksichtigen ist jedoch auch der Unterschied in der Kultivierungszeit der drei Protokolle. Wie unter Abbildung 2-6 beschrieben, wurde bei EpiLife[®] nur über 24h submers kultiviert, wohingegen im KGM²- und KGM²variant-Protokoll 1 Woche Submers-Kultivierung stattfand. Die Gesamtkultivierungsdauer der Vollhautmodelle nach EpiLife[®]-Protokoll war 1 Woche kürzer als nach KGM²- und KGM²variant-Protokoll. Unter Berücksichtigung der größeren Epidermis-Dicke nach KGM²- und KGM²variant-Kultivierung könnte diese längere Zeit in Kombination mit der niedrigen

Kalziumkonzentration während der Submerskultivierung dazu geführt haben, eine stärkere Proliferation der Epidermis und damit ein größeres Dickenwachstum zu erreichen.

Weitere Unterschiede im KGM²- und KGM²variant-Protokoll im Gegensatz zum EpiLife[®]-Protokoll war die Anwesenheit von FCS in der Submerskultivierung innerhalb des KGM²- und KGM²variant-Protokolls (Vergleiche Abbildung 2-4). Lamb *et al.* betonten im Paper die Notwendigkeit von Serum im Medium, um eine vielschichtige, differenzierte Epidermis zu erreichen (Lamb *and* Ambler 2013). Es gelang in den Versuchen von Lamb *et al.* nicht, eine ausdifferenzierte vielschichtige Epidermis durch Kultivierung mit EpiLife[®] ohne Serum zu erreichen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde in der vorgelegten Arbeit gezeigt, dass mit EpiLife[®] als Kulturmedium alleine, ohne die Anwesenheit von Serum in Form von FCS, ein der nativen *in vivo* Haut ähnliches Vollhautmodell hergestellt werden konnte.

In der Literatur ist außerdem ein positiver Einfluss auf die Keratinozytenproliferation durch *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) im EpiLife[®]-Medium beschrieben (Lemper, De Paepe *et al.* 2014). Bei dickerer Epidermis fanden sich stets alle vier physiologischen Epidermis-Schichten, sodass eine dickere Epidermis jeweils mit einer höheren Qualität einherging.

Neben dem Einfluss vom Kulturmedium auf die Vollhautmodellqualität wurde in der vorgelegten Studie außerdem ein Effekt durch das Spenderalter untersucht. In einer univariaten Analyse konnte eine signifikante Verkleinerung der Epidermis festgestellt werden, mit jedem Jahr, welches ein Spender älter wurde. Mögliche Ursachen für die reziproke Abhängigkeit des Spenderalters und der Epidermis-Dicke werden durch De Corte *et al.* beschrieben. So haben vor allem Zellen isoliert aus neonataler Vorhaut ein sehr hohes Proliferationspotential (De Corte, Verween *et al.* 2012). Bei der Herstellung der Vollhautmodelle wurden ausschließlich juvenile Vorhautspender im Alter zwischen 2 und 10 Jahren verwendet. Es ist neben der erhöhten Proliferationsfähigkeit jüngerer Spenderzellen eine mit dem Alter sinkende Zellteilungs-Fähigkeit beschrieben.

Dies liege vor allem an einer mit steigendem Alter abnehmenden Aktivität der Telomerase (Ng, Aminuddin *et al.* 2009). Die Telomerase verlängert DNA-Sequenzen, die bei der Zellteilung verloren gehen, und sorgt dadurch für eine verzögerte Zellalterung. Bei gealterten Keratinozyten fand sich eine reduzierte Telomeraseaktivität (Matsui, Miyasaka *et al.* 2000). In der Literatur ist außerdem eine bessere Qualität von Hautmodellen durch jüngere Keratinozytenspender vorgeschrieben. Lacroix *et al.* haben eine qualitativ hochwertigere epidermale Struktur und besser organisierte Hautschichten bei jungen Zellspendern beschrieben und de Corte *et al.* fanden eine signifikant bessere Konstanz einer guten Qualität bei neonatalen Spenderkeratinozyten vor (Lacroix, Bouez *et al.* 2007, De Corte, Verween *et al.* 2012).

Neben der Telomeraseaktivität wurde ein weiterer Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten und damit auf die Dicke der Epidermis in der Literatur durch die Interaktion von Fibroblasten mit Keratinozyten beschrieben (Mine, Fortunel *et al.* 2008). Keratinozyten und Fibroblasten beeinflussen ihre Aktivität und Proliferation durch *parakrine* Sezernierung von Hormonen oder anderen Botenstoffen gegenseitig. So konnten unter anderem Andriani *et al.* zeigen, dass Fibroblasten einen starken Effekt auf das Mikromilieu von Keratinozyten haben (Andriani, Margulis *et al.* 2003). Entscheidend schienen dabei unter anderem Wachstumsfaktoren zu sein, die durch Keratinozyten gesteuert von Fibroblasten freigesetzt werden können (Groeber, Holeiter *et al.* 2011). Die Notwendigkeit von Fibroblasten in einem Hautmodell sowie deren Einfluss auf die Keratinozyten hat auch Boehnke *et al.* untersucht und eine zur Proliferation notwendige Fibroblasten-Keratinozyten-Interaktion festgestellt (Boehnke, Mirancea *et al.* 2007). In der hier vorgelegten Arbeit zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Einfluss der Dermis auf die Epidermis, indem mit Größerwerden der Dermis die Epidermis schrumpfte. *In vivo* sind in der Subkutis mit retikulären und papillären Fibroblasten zwei verschiedene Fibroblastentypen beschrieben. Retikuläre und papilläre Fibroblasten zeigen eine unterschiedliche Zellmorphologie und Funktion. Mine *et al.* haben beschrieben, dass vor allem papilläre Fibroblasten die Morphogenese der Epidermis beeinflussen. Es zeigte sich außerdem eine mit steigendem Alter ändernde Sekretionsaktivität beider

Fibroblastentypen (Mine, Fortunel *et al.* 2008). Beide Typen reduzierten mit steigendem Spenderalter ihre wachstumsfördernde Wirkung auf die Keratinozyten, sodass eine Proliferationsabnahme demnach mit dem steigenden Alter der Spender zusammenhängen würde. In der vorgelegten Arbeit wurde keine Selektion der Fibroblastentypen vorgenommen. Kaji *et al.* konnten weiter zeigen, dass mit steigendem Alter der Fibroblasten deren Teilungsaktivität abnahm (Kaji, Ohta *et al.* 2009). Die in der vorgelegten Arbeit beschriebene reziproke Abhängigkeit einer dickeren Dermis auf die Epidermis kann über das Alter des Spenders jedoch nicht erklärt werden. Tenchini *et al.* konnten in ihren Untersuchungen ein Überwachsen der Keratinozyten von Fibroblasten aufzeigen, sodass anzunehmen ist, dass ein überschießendes Wachstum der dermalen Struktur sich negativ auf die grundsätzlich schwierig zu kultivierenden Keratinozyten auswirkt (Tenchini, Ranzati *et al.* 1992).

Neben dem Einfluss des Spenderalters auf das Epidermis-Dickenwachstum konnte in der vorliegenden Arbeit ein Einfluss des Spenderalters auf die dermo-epidermale Verbindung gezeigt werden. Eine Epidermolyse tritt *in vivo* ausschließlich im krankhaften Zustand der Haut auf. Beschrieben ist eine Ablösung der Epidermis beispielsweise beim Krankheitsbild der Epidermolysis bullosa sowie bei einer fortgeschrittenen GvHD der Haut (Dickinson, Wang *et al.* 2002, Chen, Kim *et al.* 2012). Die Ablösung der Epidermis von der Dermis wurde als negatives Kriterium gewertet, mit Annahme einer geringeren adhäsiven Stärke Epidermis zur Dermis über die Basalmembran. Bei der Untersuchung der dermo-epidermalen Adhäsion konnte ein positiver Effekt durch ältere Keratinozytenspender beobachtet werden. Auch nach EpiLife®-Kultivierung wurde in der vorgelegten Studie ein nicht signifikanter Trend hin zu einer besseren Epidermis-Adhärenz beobachtet. Diese dermo-epidermale Verbindungsstärke wird maßgeblich von der Basalmembran, die über die basale Keratinozytenschicht im Zusammenspiel mit den Fibroblasten gebildet wird (Andriani, Margulis *et al.* 2003), getragen. Die Basalmembran dient in der Haut der Adhärenz der Dermis zur Epidermis. Finden sich Antikörper gegen diverse

Basalmembranbestandteile, so äußert sich das häufig in einer Ablösung der Epidermis von der Dermis mit Blasenbildung. Bei der Epidermolysis bullosa acquisita beispielsweise zirkulieren Auto-Antikörper gegen Bestandteile von Kollagen VII, welches an der Befestigung der Epidermis an der Dermis beteiligt ist, sodass es auf Grund einer Destruktion der Verbindung nach Auto-Antikörperreaktion und folgend Inflammation zur Ablösung der Epidermis kommt (Chen, Kim *et al.* 2012). Im Beispiel einer höhergradigen akuten GvHD sind es zytotoxische T-Zellen des Spenders, die zu einer Vakuolisierung der basalen Keratinozyten und im höchsten Stadium zu einer subepidermalen Ablösung der Epidermis führen (Sviland *and* Dickinson 1999). Es lässt sich bei einer vollständigen Adhärenz der Epidermis zur Dermis im histomorphologischen Bild rückschließen, dass eine intakte Basalmembran ausgebildet wurde. Während des Aufarbeitungsprozesses eines Vollhautmodellquerschnitts mit Überführen auf einen Objektträger und Färbung zur mikroskopischen Beurteilung unterliegt dieser Querschnitt vielen Scherkräften, sodass ein Ablösen der Epidermis allein durch diese Kräfte zustande kommen kann. Besteht in einem Vollhautmodell jedoch eine intakte Basalmembran mit hoher Reißfestigkeit der Epidermis, so erwartet man bei der Betrachtung unter dem Mikroskop einen vollständig intakten Vollhautmodellquerschnitt ohne Ablösungen der epidermalen Komponente. Dies zeigen Hautquerschnitte der *in vivo* Haut, welche natürlicherweise denselben Kräften während der histologischen Aufarbeitung unterzogen werden. Die Ausbildung einer Basalmembran unterliegt vielen Faktoren. Lee *et al.* führten an, dass es eine entscheidende Keratinozyten-Fibroblasten-Interaktion bei der Ausbildung einer Basalmembran gäbe (Lee *and* Cho 2005). Die Abhängigkeit einer intakten Basalmembran von Fibroblasten wurden ebenso von El Ghalbzouri *et al.* betont (El Ghalbzouri, Jonkman *et al.* 2005). Auch Andriani *et al.* haben einen beschleunigten Basalmembranaufbau beschrieben, wenn Fibroblasten vorhanden waren (Andriani, Margulis *et al.* 2003). Eine feste, physiologische dermo-epidermale Adhäsion im Vollhautmodell ist vor allem bei Krankheitsmodellen mit pathologischer Ablösung der Epidermis von der Dermis relevant. Hauterkrankungen wie die *Graft versus Host Disease* (GvHD) gehen in höheren Graden mit der Ablösung der Epidermis von der Dermis einher, sodass

ein Testmodell zur GvHD eine intakte dermo-epidermale Adhärenz im krankheitsfreien Vollhautmodell voraussetzen würde (Dickinson, Wang *et al.* 2002). Erklärungsansätze einer besseren Adhärenz in älteren Spendern fanden sich in der Arbeit von Le Varlet *et al.* (Le Varlet, Chaudagne *et al.* 1998). Jedoch sei hier betont, dass diese Steigerung der besseren Adhärenz bis zum Alter von 30 Jahren vorkomme (Le Varlet, Chaudagne *et al.* 1998). Ältere Spender mit einem Alter über 30 würden eine Abnahme der Adhärenz zu Kollagen Typ IV und Integrinen zeigen (Le Varlet, Chaudagne *et al.* 1998). Beide Moleküle finden sich in der Basalmembran (1.1.3, Basalmembran). Kritisch zu hinterfragen ist jedoch, inwiefern die Basalmembran des verwendeten Vollhautmodells in allen Proteinen der Basalmembran *in vivo* ähnlich war. So wurden in der vorliegenden Arbeit keine Färbungen gegen Kollagen IV und Integrine durchgeführt. Nichtsdestotrotz konnte der Einfluss des Spenderalters mit signifikant weniger Vollhautmodellen mit Ablösung der Epidermis von der Dermis bei älteren Zellspendern nach H.E.-Färbung beschrieben werden.

Neben den durchgeführten Regressionsanalysen wurde in einer Analyse mit GLM gezeigt, dass es einen Spendereinfluss unabhängig dessen Alters auf die Vollhautmodellqualität gab. Diese Beobachtung ist vereinbar mit Beobachtungen von Ng *et al.*. Hier wurden individuelle, vom Spender abhängige Variationen der Wachstumsraten von Keratinozyten und Fibroblasten beschrieben (Ng, Aminuddin *et al.* 2009). Es muss angemerkt werden, dass in der hier vorgelegten Arbeit die Gründe für die Zirkumzision, mit der die Vorhaut für die spätere Keratinozyten- und Fibroblastenisolation gewonnen wurde, nicht festgehalten wurden. Die Zirkumzision wurde durch einen urologischen oder kinderchirurgischen Facharzt indiziert. Bei den verwendeten Vorhäuten könnten Hauterkrankungen wie Lichen sclerosus oder rezidivierende Balanitiden vorgelegen haben (Aynaud, Piron *et al.* 1999, Malone and Steinbrecher 2007). Bei bereits vorerkranktem Gewebe, aus dem Zellen zur Herstellung eines Vollhautmodells isoliert wurden, könnten Ergebnisse dieser Arbeit verzerrt worden sein, indem Vollhautmodelle von Spendern mit erkranktem Gewebe,

unabhängig aller weiteren Faktoren, zu einer schlechten Modellqualität geführt haben könnten. Gegebenenfalls könnte daher in weiterführenden Studien die medizinische Indikation erhoben und womöglich erkranktes Gewebe aus der Studie ausgeschlossen werden.

Weiter wurde in einer Analyse mit GLM ein Einfluss auf die Qualität der Vollhautmodelle gezeigt, welcher durch eine Spender-Medium-Interaktion zustande kam. Dabei wurde der Spender an sich, unabhängig vom Spenderalter, untersucht. Das verwendete Kulturmedium wirkte sich auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Spenderzellen individuell unterschiedlich aus. Die Vollhautmodellqualität wurde vom passenden Zusammenspiel des Spenders mit dem Medium beeinflusst. Diese komplexe Spender-Medium-Interaktion hatte einen signifikanten Effekt auf die Epidermis- und auf die Dermis-Dicke und damit auf die Qualität des *in vitro* hergestellten Vollhautmodells. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Spenderzellen auf ein vorliegendes Mikromilieu individuell unterschiedlich reagieren. Das Mikromilieu verändert die Beschaffenheit der extrazellulären Matrix, die das Zellverhalten steuert und in der Zellentwicklung eine entscheidende Rolle spielt (Hynes 2009). Es wird vom zugegebenen Medium und von der Zell-zu-Zell-Kommunikation über Oberflächenproteine und parakrin sezernierte Hormone bestimmt. Boehnke *et al.* zeigten, dass es eine Keratinozyten-Fibroblasten-Interaktion gab, welche für die Zellproliferation und Organogenese notwendig war und dass ein bestimmtes Mikromilieu Zellfunktionen ändert, sodass sich beispielsweise Stammzellnischen *in vitro* ausbilden können (Boehnke, Mirancea *et al.* 2007). El Ghalbzouri *et al.* zeigten, dass das Mikromilieu der Dermis in der epidermalen Regeneration und in der Langlebigkeit der Keratinozyten eine große Rolle spielte (El Ghalbzouri, Commandeur *et al.* 2009). Das selbe Mikromilieu könnte bei dem einen Spender zu einer Proliferationssteigerung und bei einem anderen Spender zu einer verminderten Aktivität führen. Begründung findet dies in der biologischen Diversität der Spender. Zorn-Kruppa *et al.* konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass sich innerhalb eines verwendeten Mediums eine unterschiedlich große

spenderabhängige Variabilität im Vergleich zu einem anderen Medium zeigte. In ihren Versuchen zeigte sich vor allem eine geringere Variabilität unter EpiLife®-Kultivierung. Aus dem Einfluss einer Spender-Medium-Interaktion kann interpretiert werden, dass es für jeden Spender ein individuell zum Spender passendes Medium gab. Diese Beobachtung stimmt überein mit der Annahme, dass Spender sich auf zellulärer Ebene in ihren biologischen Eigenschaften von anderen Spendern unterscheiden. Die Heterogenität der Vollhautmodellqualität liegt damit unter anderem an der genetischen Vielfalt der Spender.

Alles in allem konnten in der vorliegenden Arbeit die Qualität eines humanen artifiziellen Vollhautmodells beeinflussende Faktoren erarbeitet werden. Es wurde gezeigt, dass es mit dem verwendeten Medium und auch mit dem Spenderalter einerseits voneinander unabhängige Faktoren gab, die die Qualität eines Vollhautmodells signifikant beeinflussten. Andererseits wurde durch die vorliegende Arbeit gezeigt, dass es Spendereigenschaften gibt, die im Einklang mit einem zum Spender passenden Medium die Qualität des Vollhautmodells beeinflussten, im Sinne einer Abhängigkeit des Spenders vom Kulturmedium. Unter Berücksichtigung des Einflusses genannter Mediumbestandteile kann mit Hilfe der hier dargestellten Einflussfaktoren die Qualität des Hautmodells weiter optimiert werden.

Für die Praxis kann sich daraus folgende Strategie ergeben: Primär sollten aus einem möglichst gesunden Spender Vollhautmodelle erstellt werden. Zeigt sich in mehreren Hautmodellen eine gute Qualität, so kann dieser Spender als geeignet bezeichnet werden. In einem zweiten Schritt kann mit verschiedenen Kulturmedien untersucht werden, welches Medium die Qualität des Hautmodells weiter steigert, sodass mit dieser Medium-Spender-Kombination ein qualitativ hochwertiges Vollhautmodell in hoher Anzahl hergestellt werden kann. Aus ökonomischen Gründen und um zügiger Ergebnisse zu erhalten, sollte das Medium-Protokoll mit der kürzesten Kultivierungsdauer Verwendung finden und gegebenenfalls sollten wichtige Mediumbestandteile wie beispielsweise KGF

hinzugefügt werden. Durch Selektion und Verwendung vorwiegend papillärer Fibroblasten könnte die Vollhautmodellqualität weiter optimiert werden.

Mit Hilfe von den genannten Optimierungen des Kulturmediums und mit Hilfe einer Selektion eines geeigneten Spenders mit folgend Verwendung einer geeigneten Medium-Spender-Kombination könnten qualitativ hochwertige, der *in vivo* Haut ähnliche Vollhautmodelle mit einer hohen Reproduzierbarkeit hergestellt werden. Diese Optimierungen können verwendet werden, um komplexere Hautmodelle zu generieren. In einem optimierten Vollhautmodell könnte in Anlehnung an das Explantationsmodell von Dickinson *et al.* eine GvHD induziert werden und diese untersucht und gegebenenfalls therapiert werden. Mit einem *in vitro* hergestellten GvHD-Vollhautmodell wird es möglich sein, die Pathophysiologie der GvHD weiter zu erforschen und gegebenenfalls Zelltherapien innerhalb dieses simplifizierten humanen Vollhautmodells zu untersuchen, indem beispielsweise mesenchymale Knochenmarkstromazellen als weitere Zellart bei der Herstellung in das Modell eingebracht werden würden. Voraussetzung für die Untersuchung einer komplexen Immunreaktion innerhalb des Hautmodells ist ein Basis-Vollhautmodell in guter Qualität und hoher Reproduzierbarkeit der Qualität. Die hier vorgelegten Ergebnisse ermöglichen es, die Qualität von humanen artifiziellen *in vitro* hergestellten Basis-Vollhautmodellen zu optimieren. Dies dient als Grundbaustein für ein komplexes GvHD-Vollhautmodell.

5 Zusammenfassung

Humane artifizielle Vollhautmodelle gewinnen im Bereich des Tissue Engineerings zunehmend an Bedeutung und werden mittlerweile in vielen verschiedenen Fachbereichen erforscht, optimiert und sogar als die Grundlagenforschung unterstützende Tierersatzmodelle angewendet. Dieses geht mit hohen Ansprüchen an Qualität und Reproduzierbarkeit dergleichen einher. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Kulturbedingen und Spendermaterial auf die Qualität humaner *in vitro* hergestellter Vollhautmodelle systematisch untersucht. Dazu wurde zunächst ein Katalog an histomorphologischen Qualitätskriterien erarbeitet, der sich an echten humanen Hautbiopsien orientierte und eine Gewichtung dieser Kriterien im Hinblick auf die Verwendung als echte Hautersatzmodelle erlaubte. Für die Herstellung der Hautmodelle wurden die etablierten Medien KGM², KGM²variant und EpiLife[®] und deren Kultivierungsprotokolle verwendet. Die zelluläre Grundlage der vorliegenden Untersuchungen bildeten die Präputien von sechzehn Kindern nach Zirkumzision. Keratinozyten und Fibroblasten wurden isoliert und mit den drei oben genannten Medien und zugrundeliegenden Kultivierungsprotokollen wurden in jeweils dreifacher Ausführung insgesamt 144 humane Vollhautmodelle erstellt, welche dann entsprechend des Bewertungskataloges beurteilt wurden. Die zugrunde gelegten Bewertungs- und Gütekriterien entsprachen histomorphologischen Parametern. Dazu gehörten die Dicke von Epidermis und Dermis, die Adhärenz zwischen Epidermis und Dermis sowie die Abwesenheit von Zellkernen im Stratum corneum der Epidermis.

Für die Analyse der Einflussfaktoren Spenderalter und Kultivierungsmedium wurden Regressionsmodelle mittels *Generalized Estimating Equations* angewandt. Das Spenderalter und das Kultivierungsmedium wurden dabei unabhängig voneinander in einer univariaten Analyse untersucht. Bei der Untersuchung des Einflusses des Kulturmediums auf die terminale Differenzierung innerhalb der Epidermis zeigte sich, dass durch Kultivierung mit EpiLife[®] signifikant weniger Vollhautmodelle mit Zellkernen im Stratum corneum

Zusammenfassung

hergestellt wurden, im Vergleich zur Kultur mit KGM² oder KGM²variant. Der Einfluss des Kulturmediums auf die Epidermis- und Dermis-Dicke war jeweils nicht signifikant. Trotzdem zeigte sich ein Trend mit einer dünneren Epidermis und Dermis nach EpiLife[®]-Kultivierung. Bei der Analyse des Spenderalters konnte ein positiver Einfluss eines jüngeren Spenders auf die Dicke der Epidermis im Vollhautmodell gezeigt werden. Die Epidermis-Dicke war signifikant größer, je jünger ein Vorhautspender war. Ein höheres Spenderalter dagegen führte zu signifikant weniger Ablösung der Epidermis von der Dermis. Keinen Einfluss hatte das Spenderalter auf die Dermis-Dicke und auf die Abwesenheit von Zellkernen in der Hornschicht. Die drei signifikanten Assoziationen in der univariaten Analyse wurden in einer multivariablen Analyse untersucht. Hierbei zeigte sich der Einfluss des Spenderalters auf die Epidermis-Dicke und die dermo-epidermale Adhäsion unter Einfluss der Kulturmedien, der Abwesenheit von Zellkernen in der Hornschicht und der Dermis-Dicke als Kovariablen ebenfalls signifikant. Auch blieb der Einfluss von EpiLife[®] auf die Abwesenheit von Zellkernen in der Hornschicht in der multivariablen Analyse signifikant. Es konnte hierbei außerdem ein signifikanter Einfluss der Dermis auf die Epidermis mit Schrumpfung der Epidermis bei Größerwerden der Dermis gezeigt werden. In einer durchgeführten komplexen statistischen Analyse mittels *General Linear Model* wurde der Einfluss einer Spender-Medium-Interaktion analysiert, ohne das Spenderalter als Variable mit einzubeziehen. Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Interaktion des Spenders mit dem Kulturmedium auf die Epidermis- und Dermis-Dicke und damit auf die Qualität der *in vitro* hergestellten Vollhautmodelle. Einerseits bestand also ein unabhängiger Einfluss des Spenderalters und des Mediums, andererseits gab es einen Einfluss von der Abhängigkeit einer optimalen Spender-Medium-Kombination auf die Vollhautmodellqualität.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals das komplexe Zusammenspiel von Spenderfaktoren und Kultivierungsbedingungen und deren Auswirkungen auf die Qualität von humanen Vollhautmodellen aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse haben Relevanz für den Einsatz dieser Modelle als

Zusammenfassung

Tierersatzmodelle in der Forschung. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse können optimierte organotypische Vollhautmodelle *in vitro* hergestellt werden, sodass zukünftig komplexere Hautmodelle generiert werden können. In einer Folgearbeit sollen die hier erarbeiteten Grundlagen helfen, Hautmodelle in der Erforschung der akuten GvHD der Haut zu bearbeiten.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Alonso, L. and E. Fuchs (2003). "Stem cells of the skin epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **100 Suppl 1**: 11830-11835.

Andriani, F., A. Margulis, N. Lin, S. Griffey and J. A. Garlick (2003). "Analysis of microenvironmental factors contributing to basement membrane assembly and normalized epidermal phenotype." J Invest Dermatol **120**(6): 923-931.

Aynaud, O., D. Piron and J. M. Casanova (1999). "Incidence of preputial lichen sclerosus in adults: histologic study of circumcision specimens." J Am Acad Dermatol **41**(6): 923-926.

Bacqueville, D., T. Douki, L. Duprat, S. Rebelo-Moreira, B. Guiraud, H. Dromigny, V. Perier, S. Bessou-Touya and H. Duplan (2015). "A new hair follicle-derived human epidermal model for the evaluation of sunscreen genoprotection." J Photochem Photobiol B **151**: 31-38.

Boehnke, K., N. Mirancea, A. Pavesio, N. E. Fusenig, P. Boukamp and H. J. Stark (2007). "Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents." Eur J Cell Biol **86**(11-12): 731-746.

Brouard, M. and Y. Barrandon (2002). "In-vivo dedifferentiation of keratinocytes to epidermal stem cells." Lancet **359**(9305): 528; author reply 529.

Brouard, M. and Y. Barrandon (2003). "Controlling skin morphogenesis: hope and despair." Curr Opin Biotechnol **14**(5): 520-525.

Candi, E., R. Schmidt and G. Melino (2005). "The cornified envelope: a model of cell death in the skin." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 328-340.

- Chen, M., G. H. Kim, L. Prakash and D. T. Woodley (2012). "Epidermolysis bullosa acquisita: autoimmunity to anchoring fibril collagen." Autoimmunity **45**(1): 91-101.
- De Corte, P., G. Verween, G. Verbeken, T. Rose, S. Jennes, A. De Coninck, D. Roseeuw, A. Vanderkelen, E. Kets, D. Haddow and J. P. Pirnay (2012). "Feeder layer- and animal product-free culture of neonatal foreskin keratinocytes: improved performance, usability, quality and safety." Cell Tissue Bank **13**(1): 175-189.
- Dickinson, A. M., X. N. Wang, L. Sviland, F. A. Vyth-Dreese, G. H. Jackson, T. N. Schumacher, J. B. Haanen, T. Mutis and E. Goulmy (2002). "In situ dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens." Nat Med **8**(4): 410-414.
- Edmondson, R., J. J. Broglie, A. F. Adcock and L. Yang (2014). "Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors." Assay Drug Dev Technol **12**(4): 207-218.
- Egawa, G. and K. Kabashima (2016). "Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: Essential topics to prevent the atopic march." J Allergy Clin Immunol **138**(2): 350-358 e351.
- El Ghalbzouri, A., S. Commandeur, M. H. Rietveld, A. A. Mulder and R. Willemze (2009). "Replacement of animal-derived collagen matrix by human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products." Biomaterials **30**(1): 71-78.
- El Ghalbzouri, A., M. F. Jonkman, R. Dijkman and M. Ponc (2005). "Basement membrane reconstruction in human skin equivalents is regulated by fibroblasts and/or exogenously activated keratinocytes." J Invest Dermatol **124**(1): 79-86.

- El Ghalbzouri, A., R. Siamari, R. Willemze and M. Ponc (2008). "Leiden reconstructed human epidermal model as a tool for the evaluation of the skin corrosion and irritation potential according to the ECVAM guidelines." Toxicol In Vitro **22**(5): 1311-1320.
- Elias, P. M., R. Gruber, D. Crumrine, G. Menon, M. L. Williams, J. S. Wakefield, W. M. Holleran and Y. Uchida (2014). "Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE)." Biochim Biophys Acta **1841**(3): 314-318.
- Ericsson, A. C., M. J. Crim and C. L. Franklin (2013). "A brief history of animal modeling." Mo Med **110**(3): 201-205.
- Ferrara, J. L. and G. Yanik (2005). "Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies." Clin Adv Hematol Oncol **3**(5): 415-419, 428.
- Gabbanini, S., E. Lucchi, M. Carli, E. Berli, A. Minghetti and L. Valgimigli (2009). "In vitro evaluation of the permeation through reconstructed human epidermis of essential oils from cosmetic formulations." J Pharm Biomed Anal **50**(3): 370-376.
- Gambardella, L. and Y. Barrandon (2003). "The multifaceted adult epidermal stem cell." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 771-777.
- Goldberg, L. H. (1996). "Basal cell carcinoma." Lancet **347**(9002): 663-667.
- Green, K. J. and J. C. Jones (1996). "Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components." FASEB J **10**(8): 871-881.
- Grice, E. A. and J. A. Segre (2011). "The skin microbiome." Nat Rev Microbiol **9**(4): 244-253.

- Groeber, F., M. Holeiter, M. Hampel, S. Hinderer and K. Schenke-Layland (2011). "Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications." Adv Drug Deliv Rev **63**(4-5): 352-366.
- Gupta, M. A., D. R. Pur, B. Vujcic and A. K. Gupta (2017). "Suicidal behaviors in the dermatology patient." Clin Dermatol **35**(3): 302-311.
- Hammers, C. M. and J. R. Stanley (2016). "Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid." Annu Rev Pathol **11**: 175-197.
- Hennings, H., K. Holbrook, P. Steinert and S. Yuspa (1980). "Growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture: effects of extracellular calcium." Curr Probl Dermatol **10**: 3-25.
- Hennings, H., D. Michael, C. Cheng, P. Steinert, K. Holbrook and S. H. Yuspa (1980). "Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture." Cell **19**(1): 245-254.
- Hynes, R. O. (2009). "The extracellular matrix: not just pretty fibrils." Science **326**(5957): 1216-1219.
- Kaji, K., T. Ohta, N. Horie, E. Naru, M. Hasegawa and N. Kanda (2009). "Donor age reflects the replicative lifespan of human fibroblasts in culture." Hum Cell **22**(2): 38-42.
- Kim, K. P., K. O. Shin, K. Park, H. J. Yun, S. Mann, Y. M. Lee and Y. Cho (2015). "Vitamin C Stimulates Epidermal Ceramide Production by Regulating Its Metabolic Enzymes." Biomol Ther (Seoul) **23**(6): 525-530.
- Kopan, R. and E. Fuchs (1989). "A new look into an old problem: keratins as tools to investigate determination, morphogenesis, and differentiation in skin." Genes Dev **3**(1): 1-15.

Kumar, N. M. and N. B. Gilula (1996). "The Gap Junction Communication Channel." Cell **84**(3): 381-388.

Lacroix, S., C. Bouez, S. Vidal, V. Cenizo, C. Reymermier, V. Justin, J. Vicanova and O. Damour (2007). "Supplementation with a complex of active nutrients improved dermal and epidermal characteristics in skin equivalents generated from fibroblasts from young or aged donors." Biogerontology **8**(2): 97-109.

Lamb, R. and C. A. Ambler (2013). "Keratinocytes propagated in serum-free, feeder-free culture conditions fail to form stratified epidermis in a reconstituted skin model." PLoS One **8**(1): e52494.

Lange, J., F. Weil, C. Riegler, F. Groeber, S. Rebhan, S. Kurdyn, M. Alb, H. Kneitz, G. Gelbrich, H. Walles and S. Mielke (2016). "Interactions of donor sources and media influence the histo-morphological quality of full-thickness skin models." Biotechnol J, 2016 Oct;11(10):1352-1361
Geteilte Erstautorenschaft zwischen Lange, J. und Weil, F.

Le Varlet, B., C. Chaudagne, A. Saunois, P. Barre, C. Sauvage, B. Berthouloux, A. Meybeck, M. Dumas and F. Bonte (1998). "Age-related functional and structural changes in human dermo-epidermal junction components." J Investig Dermatol Symp Proc **3**(2): 172-179.

Lee, D. Y. and K. H. Cho (2005). "The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems." Arch Dermatol Res **296**(7): 296-302.

Lemper, M., K. De Paepe and V. Rogiers (2014). "Practical problems encountered during the cultivation of an open-source reconstructed human epidermis model on a polycarbonate membrane and protein quantification." Skin Pharmacol Physiol **27**(2): 106-112.

- Lopez-Ojeda, W. and W. James (2017). Anatomy, Skin (Integument). StatPearls. Treasure Island (FL).
- Malone, P. and H. Steinbrecher (2007). "Medical aspects of male circumcision." BMJ **335**(7631): 1206-1290.
- Marcelo, C. L., A. Peramo, A. Ambati and S. E. Feinberg (2012). "Characterization of a unique technique for culturing primary adult human epithelial progenitor/"stem cells"." BMC Dermatol **12**: 8.
- Matsui, M., J. Miyasaka, K. Hamada, Y. Ogawa, M. Hiramoto, R. Fujimori and A. Aoi (2000). "Influence of aging and cell senescence on telomerase activity in keratinocytes." J Dermatol Sci **22**(2): 80-87.
- McLean, W. H. (2016). "Filaggrin failure - from ichthyosis vulgaris to atopic eczema and beyond." Br J Dermatol **175 Suppl 2**: 4-7.
- Mertsching, H., J. Schanz, V. Steger, M. Schandar, M. Schenk, J. Hansmann, I. Dally, G. Friedel and T. Walles (2009). "Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue." Transplantation **88**(2): 203-210.
- Mertsching, H., M. Weimer, S. Kersen and H. Brunner (2008). "Human skin equivalent as an alternative to animal testing." GMS Krankenhhyg Interdiszip **3**(1): Doc11.
- Mine, S., N. O. Fortunel, H. Pigeon and D. Asselineau (2008). "Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging." PLoS One **3**(12): e4066.
- Nassereddine, S., H. Rafei, E. Elbahesh and I. Tabbara (2017). "Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review." Anticancer Res **37**(4): 1547-1555.

- Ng, M. H., B. S. Aminuddin, S. Hamizah, C. Lynette, A. L. Mazlyzam and B. H. Ruszymah (2009). "Correlation of donor age and telomerase activity with in vitro cell growth and replicative potential for dermal fibroblasts and keratinocytes." J Tissue Viability **18**(4): 109-116.
- Noel-Hudson, M. S., I. Dusser, I. Collober, M. P. Muriel, F. Bonte, A. Meybeck, J. Font and J. Wepierre (1995). "Human epidermis reconstructed on synthetic membrane: influence of experimental conditions on terminal differentiation." In Vitro Cell Dev Biol Anim **31**(7): 508-515.
- Pampaloni, F., E. G. Reynaud and E. H. K. Stelzer (2007). "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 839-845.
- Pfendner, E. G., S. G. Sadowski and J. Uitto (2005). "Epidermolysis bullosa simplex: recurrent and de novo mutations in the KRT5 and KRT14 genes, phenotype/genotype correlations, and implications for genetic counseling and prenatal diagnosis." J Invest Dermatol **125**(2): 239-243.
- Plewig, G., T. Jansen and N. Y. Schurer (1997). "[Stratum corneum]." Hautarzt **48**(7): 510-521; quiz 520.
- Ponec, M. (2002). "Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing." Adv Drug Deliv Rev **54 Suppl 1**: S19-30.
- Ponec, M., A. Weerheim, J. Kempenaar, A. Mulder, G. S. Gooris, J. Bouwstra and A. M. Mommaas (1997). "The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C." J Invest Dermatol **109**(3): 348-355.

- Poumay, Y., F. Dupont, S. Marcoux, M. Leclercq-Smekens, M. Herin and A. Coquette (2004). "A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies." Arch Dermatol Res **296**(5): 203-211.
- Proksch, E., J. M. Brandner and J. M. Jensen (2008). "The skin: an indispensable barrier." Exp Dermatol **17**(12): 1063-1072.
- Prunieras, M., M. Regnier and D. Woodley (1983). "Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface." J Invest Dermatol **81**(1 Suppl): 28s-33s.
- Pudlas, M., S. Koch, C. Bolwien, S. Thude, N. Jenne, T. Hirth, H. Walles and K. Schenke-Layland (2011). "Raman spectroscopy: a noninvasive analysis tool for the discrimination of human skin cells." Tissue Eng Part C Methods **17**(10): 1027-1040.
- Reinisch, C. M. and E. Tschachler (2012). "The dimensions and characteristics of the subepidermal nerve plexus in human skin--terminal Schwann cells constitute a substantial cell population within the superficial dermis." J Dermatol Sci **65**(3): 162-169.
- Reuter, C., H. Walles and F. Groeber (2017). "Preparation of a Three-Dimensional Full Thickness Skin Equivalent." Methods Mol Biol **1612**: 191-198.
- Rheinwald, J. G. and H. Green (1975). "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells." Cell **6**(3): 331-343.
- Salerno, S., S. Morelli, F. Giordano, A. Gordano and L. D. Bartolo (2016). "Polymeric membranes modulate human keratinocyte differentiation in specific epidermal layers." Colloids Surf B Biointerfaces **146**: 352-362.

- Sandby-Moller, J., T. Poulsen and H. C. Wulf (2003). "Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits." Acta Derm Venereol **83**(6): 410-413.
- Song, J., K. Izumi, T. Lanigan and S. E. Feinberg (2004). "Development and characterization of a canine oral mucosa equivalent in a serum-free environment." J Biomed Mater Res A **71**(1): 143-153.
- Stock, U. A. and J. P. Vacanti (2001). "Tissue engineering: current state and prospects." Annu Rev Med **52**: 443-451.
- Strudwick, X. L., D. L. Lang, L. E. Smith and A. J. Cowin (2015). "Combination of Low Calcium with Y-27632 Rock Inhibitor Increases the Proliferative Capacity, Expansion Potential and Lifespan of Primary Human Keratinocytes while Retaining Their Capacity to Differentiate into Stratified Epidermis in a 3D Skin Model." PLoS One **10**(4): e0123651.
- Sviland, L. and A. M. Dickinson (1999). "A human skin explant model for predicting graft-versus-host disease following bone marrow transplantation." J Clin Pathol **52**(12): 910-913.
- Tenchini, M. L., C. Ranzati and M. Malcovati (1992). "Culture techniques for human keratinocytes." Burns **18 Suppl 1**: S11-16.
- Tohya, K., S. Urabe, J. Igarashi, T. Tomura, A. Take and M. Kimura (2000). "Appearance of peculiar vessels with immunohistological features of high endothelial venules in the dermis of moxibustion-stimulated rat skin." Am J Chin Med **28**(3-4): 425-433.
- Vacanti, J. P. and R. Langer (1999). "Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation." Lancet **354 Suppl 1**: S132-34.

- Van Muijen, G. N., S. O. Warnaar and M. Ponc (1987). "Differentiation-related changes of cytokeratin expression in cultured keratinocytes and in fetal, newborn, and adult epidermis." Exp Cell Res **171**(2): 331-345.
- Vasconcelos, L., E. C. Vieira, E. M. Minicucci, A. G. Salvio, M. P. Souza, M. E. Marques and S. A. Marques (2013). "Chronic graft-versus-host disease: clinical presentation of multiple lesions of lichenoid and atrophic pattern." An Bras Dermatol **88**(5): 799-802.
- Visscher, M. and V. Narendran (2014). "The Ontogeny of Skin." Adv Wound Care (New Rochelle) **3**(4): 291-303.
- Vorsmann, H., F. Groeber, H. Walles, S. Busch, S. Beisert, H. Walczak and D. Kulms (2013). "Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing." Cell Death Dis **4**: e719.
- Weindl, G., F. Castello and M. Schafer-Korting (2011). "Evaluation of anti-inflammatory and atrophogenic effects of glucocorticoids on reconstructed human skin." Altern Lab Anim **39**(2): 173-187.
- Williams, D. (2004). "Benefit and risk in tissue engineering." Elsevier materialstoday.
- Wolf, R. and L. C. Parish (2005). "Life-threatening skin diseases: part I." Clin Dermatol **23**(2): 131-133.
- Yousefi, B., M. Mahmoudi, A. Sarafnejad, E. Karimizadeh, E. Farhadi, A. R. Jamshidi, H. Kavosi, S. Aslani and F. Gharibdoost (2017). "Downregulation of Aquaporin3 in Systemic Sclerosis Dermal Fibroblasts." Iran J Allergy Asthma Immunol **16**(3): 228-234.

Anhang

Zhang, Z. and B. B. Michniak-Kohn (2012). "Tissue engineered human skin equivalents." Pharmaceutics **4**(1): 26-41.

Zorn-Kruppa, M., T. Volksdorf, C. Ueck, E. Zoller, K. Reinshagen, I. Ridderbusch, G. Bruning, P. Houdek, I. Moll and J. M. Brandner (2016). "Major cell biological parameters of keratinocytes are predetermined by culture medium and donor source." Exp Dermatol **25**(3): 242-244.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Aufbau der Epidermis.....	4
Abbildung 1-2: Tissue Engineering am Beispiel der Hautmodellgenerierung.....	9
Abbildung 2-1: Medium-Inhaltsstoffe während Zellkultur.....	22
Abbildung 2-2: Medium-Inhaltsstoffe während Submerskultur	23
Abbildung 2-3: Medium-Inhaltsstoffe während Grenzflächenkultur	24
Abbildung 2-4: Vergleich der fetalen Kälberserum-Konzentration.....	26
Abbildung 2-5: Schema zur Herstellung eines humanen artifiziiellen Vollhautmodells	28
Abbildung 2-6: Chronologie der mediumabhängigen Hautgenerierung.....	35
Abbildung 3-1: Altersverteilung der verwendeten Vorhautspender.....	42
Abbildung 3-2: Gegenüberstellung nativer menschlicher Haut zu humanen artifiziiellen Vollhautmodellen	44
Abbildung 3-3: Beispielhafte Messungen der Epidermis-Dicke	46
Abbildung 3-4: Dicke der Epidermis in 144 Vollhautmodellen	47
Abbildung 3-5: Dicke der Epidermis in 144 Vollhautmodellen im Zusammenhang mit EpiLife®, KGM ² und KGM ² variant.....	49
Abbildung 3-6: Vergleich von Vollhautmodellen mit kleiner und großer Epidermis-Dicke	50
Abbildung 3-7: Univariate Analyse des Einflusses des Mediums auf die Epidermis-Dicke.....	51
Abbildung 3-8: Dicke der Dermis in 144 Vollhautmodellen.....	53
Abbildung 3-9: Dicke der Dermis in 144 Vollhautmodellen im Zusammenhang mit EpiLife®, KGM ² und KGM ² variant.....	55
Abbildung 3-10: Univariate Analyse des Einflusses des Mediums auf die Dermis-Dicke.....	56
Abbildung 3-11: Abwesenheit von Zellkernen in der Hornschicht in Abhängigkeit vom Medium.....	57
Abbildung 3-12: Univariate Analyse der <i>Odds Ratio</i> bei Abwesenheit von Zellkernen innerhalb des Stratum corneum	58

Anhang

Abbildung 3-13: Dermo-epidermale Verbindungsstärke in 144 Vollhautmodellen	59
Abbildung 3-14: Dermo-epidermale Verbindungsstärke Grad II und III je nach Medium	60
Abbildung 3-15: Univariate Analyse der <i>Odds Ratio</i> bei der dermo-epidermalen Adhärenz.....	61
Abbildung 3-16: Einfluss der Dermis- auf die Epidermis-Dicke.	62
Abbildung 3-17: Zusammenhang zwischen der Dicke der Dermis und der Epidermis	63
Abbildung 3-18: Einfluss des Spenderalters auf Epidermis-Dicke.....	65
Abbildung 3-19: Einfluss des Spenderalters auf die Dermis-Dicke	66
Abbildung 3-20: Einfluss des Spenderalters auf die Ausdifferenzierung	68
Abbildung 3-21: Einfluss des Spenderalters auf die dermo-epidermale Verbindungsstärke	70
Abbildung 3-22: Einfluss der Interaktion zwischen Medium und Spender.....	72

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1-1: Medium-Zusätze KGM ²	19
Tabelle 2.1-2: Medium-Zusätze KGM ² variant.....	20
Tabelle 2.1-3: Medium-Zusätze EpiLife®	21
Tabelle 2.5-1: Fünf Qualitätskriterien zur qualitativen Bewertung eines humanen artificialen Vollhautmodells	38
Tabelle 3.5-1: Medium-Spender-Interaktion beeinflusst Epidermis- und Dermis- Dicke	71

6.4 Abkürzungsverzeichnis

6.4.1 Abkürzungen

AK	Antikörper
BP	Bullöses Pemphigoid
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CI	Konfidenzintervall
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>etalii</i> (und andere)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (dt.: fetales Kälberserum)
GEE	<i>Generalized Estimating Equations</i>
GLM	<i>General Linear Model</i>
GNL	Gelneutralisationslösung
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
H.-E.	Hämatoxylin-Eosin
HKGS	<i>Human Keratinocyte Growth Supplement</i>
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
KGM ²	<i>Keratinocyte Growth Medium 2</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
p	p-Wert (=Signifikanzwert)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (dt.: Phosphatgepufferte Salzlösung)
PenStrep	Penicillin, Streptomycin
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett

vgl. Vergleiche

6.4.2 Einheiten

°C	Grad Celsius
cm ²	Quadratcentimeter
h	Stunde(n)
min.	Minuten
ml	Mililiter
mM	Milimolar
mm ²	Quadratmilimeter
ng	Nanogramm
rpm	<i>rounds per minute</i> (dt.: Runden pro Minute)
U	Einheit
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. med. Stephan Mielke** möchte ich meinen allergrößten Dank für die Überlassung des Themas, für die ständige Unterstützung während des Projektes und für die richtungsweisenden Ratschläge auch im Privaten danken. Nur durch sein Engagement und seine Motivation konnte das Projekt in dieser Form durchgeführt werden. Durch seine Unterstützung konnte ich das Promotionsstipendium der Universität Würzburg und das Medical Excellence Stipendium der Manfred-Lautenschläger-Stiftung erhalten. Durch seine motivierende Art und sein organisiertes Arbeiten konnten notwendige Strukturen für die Realisierung des Projektes geschaffen werden. Durch ihn konnte ich Einblicke in die experimentelle Forschung erwerben. Durch seine empathische Art und das von ihm mir entgegengebrachte Vertrauen hat mir die Zusammenarbeit in seinem Team zu jeder Zeit Spaß gemacht. Vielen herzlichen Dank für die lehrreiche Zeit, lieber Stephan.

Weiter möchte ich meinen herzlichen Dank an Frau **Prof. Dr. rer. nat. Heike Walles** richten. Durch ihre Unterstützung konnte ich die Techniken des Tissue Engineerings erlernen. Außerdem konnte Heike mir zu jeder Zeit gute Ratschläge mit auf meinen Lebensweg geben. Sie ermöglichte mir Einblicke in die Forschung, von denen ich für mein weiteres Arbeitsleben profitieren werde.

Ein besonderer Dank gilt dem gesamten Team aus dem Labor der AG Mielke – allen voran **Julia Lange, Silke Rebhan, Laura Bernhard, Miriam Alb, Stefanie Obermeier und Mathias „Matze“ Lutz**. Zusammen mit Julias stets tatkräftiger Hilfe und unglaublichem Organisationstalent konnten die Ergebnisse des Projektes publiziert werden. Beim Schreiben meiner Dissertation stand mir Julia stets zur Seite. Sie korrigierte meine Arbeit immer zeitnah und sie gab mir als meine Betreuerin stets gute Ratschläge. Ohne die außerordentlich fleißige Mithilfe der MTA's Silke und Laura wäre es nicht möglich gewesen, dieses Projekt durchzuführen. Matze konnte mir vor allem bei der Fertigstellung der Dissertation und der Antragstellung wertvolle Tipps geben. Miriam hatte außerordentliche Engagement gezeigt und uns bei der Basisarbeit im Labor maßgeblich mit

Danksagung

unterstützt. Silke war tags und nachts zu erreichen. Durch ihre freundliche Art gestaltete sich das Arbeiten immer als sehr angenehm. Es war eine unvergessliche und schöne Zeit im Gebäude „C11“.

Ein riesiges Dankeschön möchte ich außerdem dem Team vom Labor für Regenerative Medizin und Tissue Engineering Würzburg aussprechen. Allen voran hat mir **Szymon Kurdin** die Techniken zur Generierung eines Hautmodells mit Geduld beigebracht und alle Fragen beantwortet. Ebenso konnte ich zu jeder Zeit auf die Expertise von **Antje Appelt-Menzel** und **Florian Gröber** zurückgreifen. Vielen Dank für eure Hilfe. **Carolin Tripp** hatte mich bei der Herstellung der ersten Hautmodelle unterstützt, vielen Dank. **Matthias Schweinlin** und **Sabine Wilhelms** sind mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und haben mich moralisch unterstützt. Vielen Dank für alles.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt den urologischen Kollegen, die das Projekt durch ihr Engagement bei der Probandenrekrutierung und Probengewinnung erst ermöglicht haben. Allen voran ist hierbei **Prof. Dr. med. Jens J. Rassweiler**, Leiter der urologischen Klinik Heilbronn, zu nennen. Er und sein Team haben sich stets um neue Spender bemüht und durch großes Engagement einen reibungslosen Ablauf ermöglicht. Gerne möchte ich mich außerdem bei **Dr. med. M Gruner**, niedergelassener Urologe in Bad Kissingen, bei **Dr. med. Kieser & Kollegen** in Ochsenfurt, Gemeinschaftspraxis MainUrologie, bei **Dr. med. Cermann** und **Dr. med Karras**, Gemeinschaftspraxis in Meiningen, und bei Frau **Dr. med. Weltzien** und ihrem Team aus Frankfurt, Klinik Frankfurt Höchst, für die problemlose Probenlieferung und Probandenrekrutierung bedanken.

Unglaublich hilfreich und stets für alle Fragen offen waren **Christoph Riegler** als wissenschaftlicher Angestellter des Lehrstuhls für klinische Epidemiologie und Biometrie Würzburg sowie **Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Götz Gelbrich** unter der Leitung von **Prof. Dr. med. Peter Heuschmann**. Insbesondere Christoph hat mir bei all meinen Fragen zur Statistik immer zügig und freundlich Antwort gegeben. Herzlichen Dank für die Unterstützung.

Weiterhin bedanken möchte ich mich gerne bei Herrn **Dr. med. Hermann Kneitz** für die Hilfe bei der Begutachtung der Hautmodelle. Durch seine hilfreichen Tipps

Danksagung

konnten wir die Qualität der hergestellten Hautmodelle weiter verbessern. Um Herrn Dr. Kneitz halfen viele wissenschaftliche Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen bei dem Färbeprozess der hergestellten Hautmodellquerschnitte. Vielen Dank hierfür.

Nicht zuletzt gilt mein größter Dank meiner Ehefrau **Luisa**, die mich bedingungslos unterstützt hat, die mir Freiräume geschaffen hat und die stets ein offenes Ohr für mich hatte. Sie hat sich Zeit genommen, um meine Dissertation zu korrigieren und sie hat mich moralisch aufgebaut, nachdem sich der Prozess des Schreibens über mehrere Wochen hingezogen hat. Luisa unterstützt mich ebenso in der Berufsfindung und Verwirklichung meiner Karriere als Arzt. Durch sie und meine Familie finde ich einen Ausgleich und mein Glück. An dieser Stelle sei auch ein Dank an meine beiden Kinder **Emily** und **Felina** gerichtet, die sich des Öfteren in Geduld üben mussten. Sie hatten Verständnis dafür, dass ich während der Laborarbeit und des Schreibens weniger Zeit für sie aufbringen konnte. Meine Familie mit meiner **Mutter Birgit** und meinem **Vater Wolfgang** sowie meinen Geschwistern **Marion**, **Lena** und **Franziska** und deren Partnern **Kai**, **Marcel** und **Thomas** sei für ihre immerwährende Unterstützung gedankt. Insbesondere meine Mutter hat mir viele Freiräume geschaffen, indem sie die Kinderbetreuung übernommen hat. Ohne meine Mutter wäre es nicht möglich, dass ich im Einklang mit meiner Ehefrau und mit meinen Kindern meinen Karriereweg so gehen kann, wie ich es möchte. Sie hat maßgeblich Anteil am Familienzusammenhalt und imponiert durch ihren immerwährenden Fleiß als Kinderbetreuerin, Haushaltshilfe, Ratgeberin, Arzthelferin und Mutter. Durch meinen Vater erhielt ich finanzielle sowie fachliche Unterstützung über das gesamte Studium hinweg. Er ebnete mir den Weg für die Probensammlung für mein Projekt, er ermöglichte mir Freizeit im Hoffenheimer Stadion und er hatte stets gute Ratschläge, was meine Karriere und mein Privatleben betrifft. Herzlichen Dank, insbesondere euch beiden!

Meine Schwiegerfamilie mit **Lorenz Trümper** und **Elisabeth Trümper-Messmer** hat mich ebenfalls tatkräftig unterstützt, mir Freiräume geschaffen und mir gute Ratschläge erteilt. Vor allem **Lorenz** hat am Ende meiner Dissertation hilfreich

Danksagung

mitgewirkt und konnte durch seine Profession gute Ratschläge erteilen. Gerne möchte ich abschließend auch meiner Schwägerin **Julika Trümper** herzlich danken. Sie hat sich mit großem Engagement dem sprachlichen Feinschliff meiner Arbeit angenommen. Herzlichen Dank für eure stetige Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Details

Name: Frederik Weil

Geburtsdatum: 10 Aug, 1987

Geburtsort: Heilbronn, Deutschland

Verheiratet mit Luisa Sophie Weil, geb. Trümper

Kinder: Emily Carlotta (5 Jahre)
Felina Clara (2 Jahre)

Eltern: Dr. med. Wolfgang Weil – Facharzt für Allgemeinmedizin
Birgit Weil – gelernte Kinderkrankenschwester

Ausbildung

03/2018 Erwerb der Zusatzqualifikation Notfallmedizin

12/2014 Approbation [Gesamtnote: 1,8]

10/2013-11/2014 Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Baden-Württemberg.
Humanmedizin [zweites Staatsexamen: 2,0]

04/2008-09/2013 Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Bayern.
Humanmedizin [erstes Staatsexamen: 1,5]

07/2007-09/2007 Arbeiter-Samariter-Bund Heilbronn, Baden-Württemberg.
Rettungssanitäter [Abschluss: 1,0]

09/1998-07/2007 Justinus-Kerner-Gymnasium Heilbronn, Baden-Württemberg.
Abitur: 1,8 oder 637 [840] Punkte.

Lebenslauf

Arbeitserfahrung

Seit 11/2017	Assistenzarzt in Weiterbildung unter Prof. Friedmann-Bette, Innere Medizin VII Uniklinik Heidelberg: Sportmedizin
03/2016-10/2017	Assistenzarzt in Weiterbildung unter Prof. Dr. M. W. Bächler, Chirurgie Krankenhaus Salem Heidelberg
03/2015-02/2016	Assistenzarzt in Weiterbildung unter Prof. Dr. M. W. Bächler, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
05/2012	Poster Präsentation bei der Würzburger Initiative Tissue Engineering Conference 2012
seit 08/2011	Doktorand der Med. Klinik und Poliklinik II – Hämato-, Onkologie in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin. Thema: „Spendermerkmale und Kulturmedium beeinflussen die histomorphologische Qualität von humanen artifizialen Hautmodellen“
08/2013-07/2014	Uniklinikum Heidelberg – praktisches Jahr Chirurgie, Innere Medizin und Anästhesie
03/2013	Uniklinikum Heidelberg – Viszeralchirurgie. Famulant: 30 Tage Dauer
03/2012	Hausarztpraxis Dr. Wolfgang Weil – Heilbronn Famulant: 30 Tage Dauer
09/2011	Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart – internistische Notaufnahme, Famulant: 30 Tage Dauer
03/2011	Krankenhaus “am Gesundbrunnen” – Dermatologie, Heilbronn Famulant: 15 Tage Dauer
09/2010	Krankenhaus “St. Georg” – Innere Medizin, Hamburg Famulant: 30 Tage Dauer

Lebenslauf

- 09/2009 Krankenhaus "am Gesundbrunnen" – Unfallchirurgie, Heilbronn. Pflegepraktikum: 45 Tage Dauer
- 04/2009 Krankenhaus "am Gesundbrunnen" – Urologie, Heilbronn. Pflegepraktikum: 45 Tage Dauer
- 10/2007-04/2008 Arbeiter-Samariter-Bund Heilbronn, Baden-Württemberg. Sanitäter
- 03/2005 Praktikum für medizinische Diagnostik . Dr. Dr. Blackholm Heilbronn: 7 Tage Dauer

Publikationen

Lange J, Weil F, Riegler C, Groeber F, Rebhan S, Kurdyn S, *et al.* Interactions of donor sources and media influence the histo-morphological quality of full-thickness skin models. *Biotechnol J.* 2016 Oct;11(10):1352-1361. Geteilte Erstautorenschaft zwischen Lange, J. und Weil, F.

Ersatzdienst

07/2007-04/2008 Arbeiter-Samariter-Bund Heilbronn, Baden-Württemberg. Rettungssanitäter-Tätigkeiten.

Stipendium

- 2012-2014 Stipendiat der Manfred-Lautenschläger-Stiftung im Medical Excellence Programm
- 2013-2014 Inhaber des Promotionsstipendiums der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Dossenheim, den 14. Mai 2018. Frederik Weil