

**Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar**

Direktor: Prof. Dr. Tim Pohlemann

**Etablierung und Charakterisierung eines
Co-Kultur-Modells
bestehend aus mikrovaskulären
Endothelzellen und Fibroblasten**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2008

vorgelegt von:

Claudia Meins

geboren am 22. Februar 1983

in Bad Oldesloe

meiner Mutter,
meinem Vater

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	IV
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMERY	3
2. EINLEITUNG	5
2.1. Die Bedeutung von Wunden im menschlichen Organismus	5
2.1.1. Soziologische und ökonomische Betrachtungen	6
2.2. Wundheilung	7
2.2.1. Wundheilungsphasen	7
2.2.1.1. Hämostase	8
2.2.1.2. Inflammation	8
2.2.1.3. Proliferation	10
2.2.1.4. Remodeling	11
2.3. In vitro Co-Kultur-Wund-Modell	13
2.4. Wundheilung und Hypoxie	14
2.5. Wundheilung und Wachstumsfaktoren	15
2.5.1. TGF- β_1	15
2.6. Die eigene Fragestellung	17
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1. Der Versuch im Überblick	18
3.2. Zellkultur	19
3.2.1. Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	19
3.2.2. Normale humane dermale Fibroblasten	22
3.2.3. NHDF-HDMEC-Co-Kultur	24
3.3. Experimentelles Setup	25
3.4. In vitro-Hypoxie	26
3.5. Migrationsassay	27
3.6. Immunzytochemische Färbung	30

3.6.1.	Grundlagen der Immunzytochemischen Färbung	30
3.6.2.	Färbeprotokoll	31
3.6.3.	Primärantikörper	32
3.6.3.1.	Von-Willebrand-Faktor	32
3.6.3.2.	Extra-Domain-A-Fibronektin	32
3.6.3.3.	α -Smooth-Muscle-Actin	33
3.6.3.4.	Endothelin-1	33
3.6.4.	Verwendete Antikörper bei den Mono-Kulturen	34
3.6.5.	Verwendete Antikörper bei den Co-Kulturen	38
3.7.	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	42
3.7.1.	Aufbau des Fluoreszenzmikroskopes	43
3.7.2.	Auswertung	43
3.8.	ELISA	45
3.8.1.	Prinzip des Enzyme-linked-Immunosorbent Assay	45
3.8.2.	ELISA zur Quantifizierung von ET-1	45
3.9.	Statistische Auswertung	47
3.10.	Geräte	48
3.11.	Materialien	49
3.11.1.	Vorbereitung der Objektträger für die Zellkultur	52
3.12.	Lösungen	53
4.	ERGEBNISSE	54
4.1.	Wachstumsmorphologie in den Co-Kulturen	54
4.2.	In vitro Wunden	55
4.3.	Mono-Kulturen	56
4.3.1.	Normoxie	56
4.3.1.1.	Populationen	56
4.3.1.2.	In vitro Wunden	57
4.3.2.	Hypoxie	60
4.3.2.1.	Populationen	60
4.3.2.2.	In vitro Wunden	61
4.3.3.	TGF- β_1	64
4.3.3.1.	Populationen	64
4.3.3.2.	in vitro Wunden	66

4.4.	Co-Kulturen	69
4.4.1.	Normoxie	69
4.4.1.1.	Populationen	69
4.4.1.2.	In vitro Wunden	72
4.4.2.	Hypoxie	74
4.4.2.1.	Populationen	74
4.4.2.2.	In vitro Wunden	77
4.4.3.	TGF- β_1	79
4.4.3.1.	Populationen	79
4.4.3.2.	In vitro Wunden	83
4.4.4.	Endothelin-1	85
5.	DISKUSSION	87
6.	LITERATURVERZEICHNIS	101
	PUBLIKATIONEN	115
	DANKSAGUNG	117
	LEBENS LAUF	118

ABKÜRZUNGEN

Abbildung	Abb.
α -Smooth-Muscle-Actin	α -SMA
Dimethylsulfoxid	DMSO
Endothelin-1	ET-1
Endothelin-A-Rezeptor	ET-A-Rezeptor
Enzyme-linked Immunosorbent Assay	ELISA
Epidermale Growth Factor	EGF
Extra-Domain-A-Fibronektin	EDA-Fn
Extrazelluläre Matrix	ECM
Fibroblast Growth Factor	FGF
Gesamtzellzahl	GZ
Goat anti mouse	GAM
Goat anti rabbit	GAR
Granulocyte-Colony Stimulating Factor	G-CSF
Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	HDMEC
Humane Umbilikalvenen Endothelzellen	HUVEC
Hypoxie induzierter Faktor-1	HIF-1
Kaliumchlorid	KCl
Lateinisch	lat.
Minuten	min
Myofibroblasten	MF
Normale humane dermale Fibroblasten	NHDF
Passage	P
Plated activated Factor	PAF
Platelet-Derived Growth Factor	PDGF
Sekunden	sec
Stunden	h
Tabelle	Tab.
Tumornekrosefaktor	TNF
Transforming Growth Factor	TGF

Umdrehungen/Minute	U/min
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF
Von-Willebrand-Faktor	vWF

1. ZUSAMMENFASSUNG

Am Prozess der humanen Wundheilung sind viele verschiedene Zelltypen beteiligt. Fibroblasten stellen dabei den größten Anteil der Zellmasse dar. Ihre differenzierte Form, die Myofibroblasten, liefern wichtige Proteine, wie Zytokine, Matrixmetalloproteinasen und solche der extrazellulären Matrix, und tragen wesentlich zur Wundkontraktion bei. Eine weitere Funktion der Myofibroblasten, die Unterstützung der im Wesentlichen durch Endothelzellen geleisteten Angiogenese im Rahmen der Wundheilung, wird momentan in der Literatur diskutiert. Die verschiedenen Stadien der Wundheilung erfordern daher eine koordinierte Regulation der Interaktion von Endothelzellen, Fibroblasten und Myofibroblasten. Die direkte Zellinteraktion wurde in bisherigen Modellen nur unzureichend betrachtet. In der Regel wurden Experimente an mono-kultivierten Zellen durchgeführt, ohne dass die Interaktion zu anderen Zelltypen oder das durch andere Zelltypen bereitgestellte Milieu im Detail beachtet wurden.

Wir etablierten daher einen *in vitro*-Wundheilungsassay (co-culture scratch-wound migration assay = CCSWMA), bestehend aus humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen, normalen humanen dermalen Fibroblasten und Myofibroblasten, der zur Quantifizierung der Zellinteraktion genutzt werden kann. Das stabile Verhalten der einzelnen Zelltypen zueinander gewährleistete die Untersuchung über einen Zeitraum von mehreren Tagen. Der Assay diente im Weiteren dazu, den Einfluss der für die frühe Wundheilung typischen Hypoxie und den Einfluss von TGF- β_1 , als einem der zentralen Zytokine regenerativer Prozesse, auf Zellebene zu überprüfen. Mittels Quantifizierung der Parameter Proliferation, Migration und Differenzierung konnte das Verhalten der einzelnen Zelltypen in Co-Kultur mit dem Verhalten in Endothelzell- und Fibroblasten-Mono-Kulturen verglichen werden.

In unserem Modell führte Hypoxie generell zu einer Abnahme sowohl der Proliferation als auch der Migration in Mono- und Co-Kultur. Signifikant war die Abnahme der Proliferation um 50% und die Abnahme der Migration um 32% bei den Endothelzellen unter Hypoxie in Mono-Kultur verglichen mit den mono-kultivierten Endothelzellen unter Normoxie.

Wachstumsfaktoren spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Wundheilung und beeinflussen alle relevanten zytophysiologicalen Parameter wie auch Proliferation und Migration. Es zeigte sich, dass TGF- β_1 unterschiedliche Auswirkungen auf Proliferation, Migration und Differenzierung in Anhängigkeit der anderen Modell-Parameter hatte. So führte TGF- β_1 in den Co-Kulturen zu einer signifikanten Proliferationshemmung an Kulturtag 2, die sich in einer um 18,3% niedrigeren Zellzahl manifestierte, verglichen mit der an Kulturtag 1.

Unter Einbeziehung der typischen morphologischen Anordnung der Zelltypen zueinander in Co-Kultur und der Analyse des Endothelin-1-Umsatzes konnten wir ein Modell ableiten, mit dem die unterschiedliche Regulation der Wundheilung in vivo zu verschiedenen Heilungsphasen erklärt werden kann.

Der mit dieser Arbeit eingeführte in vitro-Wundheilungsassay CCSWMA stellt ein ideales Instrument dar, mit Hilfe dessen Regenerations-spezifische (patho-) physiologische Parameter ebenso wie Modulatoren der Heilungsprozesses in vitro zelltypspezifisch untersucht werden können. Seine gute Standardisier- sowie Reproduzierbarkeit stellen einen großen Vorteil gegenüber in vivo-Modellen auf der Basis von Tierexperimenten dar. Diese sind grundsätzlich - wegen des höheren Aufwands (administrativ/Tierschutzantrag), der prinzipiell bedingten ethischen Problematik, und höherer Kosten - schwieriger durchzuführen als der CCSWMA. Der CCSWMA bietet daher zukünftig eine gute Möglichkeit, einen wesentlichen Anteil von Tierexperimenten zu vermeiden.

SUMMARY

A variety of different cell types is involved in the process of human wound healing. Fibroblasts represent the largest cell mass in order to fill the defect. Especially their differentiated form, the myofibroblasts, provide a variety of different extracellular matrix proteins and are important for wound contraction. In current literature, it is discussed, whether myofibroblasts are also responsible for early neoangiogenesis by supporting the formation of new vessels together with endothelial cells. Therefore, the different stages of the healing sequence require the coordinated regulation of the interaction of endothelial cells' and fibroblasts'. In current models direct cell interaction is widely disregarded. Most experiments were done using mono-cultured cells, not allowing the visualization of the interaction between different cell types or between cells and the milieu which is provided by the other cell type.

We established an in vitro wound healing assay (co-culture scratch-wound migration assay = CCSWMA) using human dermal microvascular endothelial cells and normal human dermal fibroblasts in order to quantify cell interaction. The general growth characteristics of the cell types allowed for experiments in a time frame of several days. Furthermore the assay served to verify the influence of hypoxia, which is typical for early wound healing, and the influence of TGF- β_1 , one of the central cytokines during regeneration on the cellular level. Via the quantification of the parameters proliferation, migration and myofibroblast differentiation we were able to compare the behaviour of co-cultured cells to that of mono-cultured endothelial cells and fibroblasts.

In our model hypoxia led to a decrease of proliferation as well as migration of both cell types in mono- and co-culture. A 50% decrease of proliferation and a 32% decrease of migration of the mono-cultured endothelial cells under hypoxia were significant when compared to the mono-cultured endothelial cells under normoxia. Cytokines play a key role in the regulation of the wound healing and regulate several relevant cytophysiological parameters such as proliferation and migration. It was shown here, that TGF- β_1 has different effects on proliferation, migration and differentiation dependent on other model-parameters. In co-culture TGF- β_1 led to a

significant inhibition of proliferation on culture day 2, which manifested in a cell number - which was 18,3% lower than on culture day 1.

Taking into account the typical morphological arrangement of the different cell types in co-culture and the analysis of the endothelin-1-release and -uptake we were able to present a model which explains the regulation of wound healing during different phases of the healing sequence.

The in vitro wound healing assay CCSWMA established in this thesis is an ideal tool to analyse the effects of regeneration-specific (patho-) physiological parameters. The CCSWMA serves to analyse the modulators of the healing process in parallel with respect to the different cell types in vitro. Our model has a great benefit in terms of standardisation and reproducibility compared to in vivo models based on animal experiments. These are basically more difficult to arrange than the CCSWMA, due to the complexity (administration/-animal protection rules), ethical problems and higher costs. The CCSWMA therefore offers a good possibility to avoid an essential part of animal studies in the future.

2. EINLEITUNG

2.1 Bedeutung von Wunden im menschlichen Organismus

Eine Wunde ist als Verlust der Organintegrität definiert. Defekte treten am häufigsten durch exogene oder endogene Störfaktoren am Hautorgan auf (Voggenreiter & Dold 2004). Zu den komplizierten Wunden werden tiefgehendere Schädigungen, die das Muskelgewebe, das Skelettsystem oder innere Organe betreffen, gezählt (Hunt 1988; Lazarus et al. 1994).

Nach ihrer Genese unterscheidet man verschiedene Wundformen:

Einerseits gibt es die durch Gewalteinwirkung, also mechanisch, entstandenen Wunden. Bei denen unterscheidet man zwischen spitzen, beispielsweise Schnitt- und Stichwunden, und stumpfen, wie Platz-, Riss-, Quetsch- und Schürfwunden. Kratz-, Biss- und Schusswunden stellen eine Kombination aus scharf-stumpfer Gewalt dar.

Andererseits gibt es die durch Einwirkung von Hitze (Verbrennung) oder Kälte (Erfrierung) entstehenden thermischen Wunden.

Durch Verätzungen entstehende Wunden sind chemisch bedingt. Sie entstehen durch Säuren, Laugen oder andere zytotoxische Substanzen.

Des Weiteren gibt es sogenannte strahlenbedingte Wunden. Diese entstehen durch Einwirkung ultravioletter oder ionisierender Strahlung.

Aus medizinischer Sicht sind die durch bakterielle Keime ausgelöst, also infizierte Wunden am wichtigsten. Diese können verschiedenster Genese sein, wie Kontamination oder Superinfektion.

2.1.1 Soziologische und ökonomische Betrachtungen

Die Behandlung von Wunden stellt aus sozioökonomischer Sicht ein großes Problem dar, denn bei etwa 10% der chirurgischen Patienten kommt es zu Heilungsverzögerungen und damit zu einer Verlängerung der Behandlungsdauer, woraus erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem entstehen.

Zu den prädisponierenden Faktoren einer Wundheilungsstörung zählen häufig ein manifester oder latenter Diabetes mellitus (Peters et al. 1996), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (Eneroth & Persson 1993), die venöse Insuffizienz, das postthrombotische Syndrom, sowie die chronische Niereninsuffizienz (Kannon & Garrett 1995). Weitere prädisponierende Faktoren können Tumorerkrankungen und deren Therapie mit Chemotherapeutika sein (Springfield 1993).

Die Wundheilung stellt somit eine große Herausforderung für die Medizin dar (Bhora et al. 1995).

Aufgrund der Alterung der Bevölkerung ist mit einem Anwachsen dieser potentiellen Risikofaktoren der Wundheilung zu rechnen. Neueste Prognosen zur Bevölkerungsentwicklung des Deutschen Institutes zur Wirtschaftsforschung sagen einerseits eine Schrumpfung der deutschen Bevölkerung von gegenwärtig 82 Millionen auf 60-73 Millionen voraus, andererseits wird der Anteil der über 60-Jährigen auf gut ein Drittel (25 Millionen) ansteigen. Dies resultiert aus dem Anstieg der Lebenserwartung von derzeit ca. 80 Jahren für weibliche Neugeborene auf 86,4 Jahre im Jahr 2050 und von ca. 74 Jahren für männliche Neugeborene auf 81,4 Jahre im Jahr 2050 (www.diw.de).

Dadurch wird der volkswirtschaftliche Aspekt der Wundbehandlung noch weiter in den Vordergrund treten.

Neben der Therapie von prädisponierenden Grunderkrankungen ist eine, den einzelnen Phasen der Wundheilung (siehe 2.2) adaptierte Behandlung von entscheidender Bedeutung, um die Heilungschancen zu verbessern. Wichtig ist hierfür die Entwicklung neuer Therapiekonzepte und die Überprüfung bereits bekannter Therapien, wie sie bei der Behandlung chronischer Wunden häufig verwendet werden. Dies erfordert experimentelle Studien.

Um grundlegende Mechanismen der Wundheilung und verschiedene Einflussfaktoren auf die Heilung, wie Hypoxie oder Wachstumsfaktoren, zu

untersuchen, eignen sich standardisierte Modelle, bei denen der Ablauf der einzelnen Wundheilungsphasen vergleichbar zur humanen Wundheilung sein sollte. Das CCSWMA hat gegenüber in vivo-Modellen den Vorteil, wirtschaftlicher bezüglich Aufwand und Kosten zu sein, da einerseits Tierexperimentelle vermieden werden können und andererseits die Standardisierung und Reproduzierung wesentlich einfacher ist.

2.2 Wundheilung

Man differenziert zwei unterschiedliche Formen der Wundheilung. Von einer primären Wundheilung spricht man bei relativ glatten, gut adaptierten Wundrändern, bei denen es nicht zu Ausreißungen oder Verschmutzung der Wunde kommt. Zelltod und Entzündung halten sich bei dieser Heilungsform in Grenzen. Die primäre Wundheilung wird heutzutage durch optimale Wundadaptation, dementsprechende Nahttechniken oder Debridement generell angestrebt.

Bis zur Einführung der Asepsis entsprach die sekundäre Wundheilung dem Regelfall. Größere Defekte oder nicht optimal adaptierte Wundränder liegen ihr zu Grunde. Diese Heilungsform, die eher dem natürlichen Verlauf entspricht, geht oft mit einem Infekt einher. Dieses unterscheidet sie von der primären Wundheilung und kommt durch eine länger andauernde Entzündungsphase zustande.

2.2.1 Wundheilungsphasen

Man teilt die Wundheilung, unabhängig von der Art der Wunde, in vier, sich zeitlich überlappende, dynamische Phasen ein: Hämostase, Inflammation (Entzündungsphase), Proliferation (Wachstumsphase) und Remodeling (Umbau- und Differenzierungsphase). Dabei variiert die Terminologie oft stark (Mustoe et al. 1987; Schilling 1976; Hatz 1993).

Die Vorgänge der einzelnen Phasen werden im Folgenden detailliert beschrieben:

2.2.1.1 Hämostase

Das primäre Ziel des Organismus - nach einem Trauma mit Gewebe- und Blutgefäßverletzung - ist die Blutstillung durch Kontraktion arterieller Gefäße und Aggregation von Thrombozyten (Assoian & Sporn 1986). Granula setzen Heparin, Histamin, Wachstumsfaktoren und viele andere Enzyme frei. Bei einer Gewebeerletzung werden Interzellulärmatrix und verschiedene Zellbestandteile freigesetzt. Diese üben zusammen mit den Komplementbruchstücken C3a und C5a (Lynch 1991) chemotaktische Eigenschaften auf Leukozyten aus (Simpson & Ross 1972). Dadurch wird die Entzündungsphase vorbereitet. Danach beginnt sich der Gewebedefekt mit Fibringerinnseln zu füllen. Sie bilden ein Gerüst für die migrierenden Fibroblasten und in ihnen bleiben sowohl Zelltrümmer als auch Blutbestandteile hängen (Brändstedt et al. 1980; Clark 1985; Hertle et al. 1992). Die erste Phase ist innerhalb von Minuten (min) mit der Hämatombildung abgeschlossen. Verschiedene intrinsische Faktoren des Blutgefäßendothels tragen durch Beendigung der Thrombozytenaggregation und Koagulation dazu bei (Clark 1985). Das Hämatom bildet eine provisorische extrazelluläre Matrix für die Einwanderung von Zellen.

2.2.1.2 Inflammation

Die Inflammation, die in der Regel 72 Stunden (h) andauert, beginnt parallel zur Hämostase. Sie lässt sich in einen frühen und in einen späten Abschnitt gliedern und ist durch den Verlust der Keimbarriere und der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem entstandenen Gewebeschaden gekennzeichnet.

Das dafür erforderliche Einwandern von sogenannten Entzündungszellen, welche durch Monozyten und Makrophagen, neutrophile Granulozyten sowie T-Lymphozyten repräsentiert werden, beginnt bereits nach einer Stunde. Dies ist nur bei Vorliegen eines feuchten Wundmilieus möglich. Dafür muss die Wunde durch einen Fibrinschorf gegen Austrocknung geschützt sein. Die amöboid beweglichen neutrophilen Granulozyten sind bereits innerhalb der ersten Stunden in der Wunde nachweisbar (Clark 1985). Sie sondern hydrolytische Enzyme, unter anderem Peroxydasen und Ribonukleasen, ab, die dem Wunddebridement, zu dem auch

der Abbau von Zelltrümmern gehört, dienen. Des Weiteren tragen sie durch Phagozytose zur lokalen Infektabwehr bei (Simpson & Ross 1972; Lynch 1991).

Nach 4-6 h erscheinen Makrophagen, durch Differenzierung und Aktivierung von Monozyten entstanden, und Lymphozyten im Wundgebiet (Mueller et al. 1994). Sie werden durch verschiedene chemotaktische Substanzen in die Wunde gelockt. Die Makrophagen reifen zu Histozyten und sind dadurch in der Lage Bakterien zu phagozytieren. Darüber hinaus tragen sie durch Antigenpräsentation und Beseitigung von Mikroorganismen, Fremdstoffen, zerstörtem Gewebe und intakten Zellen, wie verbrauchten Erythrozyten und Neutrophilen, wesentlich zur Reinigung der Wunde bei (Clark 1985).

Makrophagen können entstandene Nekrosen abbauen, und außerdem einen Leitweg für proliferierende Fibroblasten und Endothelzellen schaffen, in dem sie regelrechte „Straßen“ bilden. Außerdem kann man den Makrophagen in dieser Phase eine koordinierende Funktion zusprechen, denn als mobiler Teil des monozytären Systems können sie durch die Sezernierung von Proteinen oder Enzymen vor Ort wesentlich zur Heilung beitragen. Der enzymatische Abbau von Infektionserregern und anderen Gewebsresten führt - genauso wie die Gewebhypoxie - zur Azidose in der Wunde. Azidose aktiviert andererseits Proteasen und fördert die Plasmafreisetzung, damit ist sie auch als Nährmedium für einwandernde Fibroblasten wichtig. Außerdem werden Wachstumsfaktoren von Makrophagen (z.B. TGF- α (Transforming Growth Factor- α), TGF- β_{1-3} (Transforming Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), TNF- α (Tumornekrosefaktor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)) (Hunt et al. 1984; Cromack et al. 1990) und Thrombozyten (z.B. EGF (Epidermal Growth Factor), TGF- $\beta_{1/2}$, PDGF, PAF (Plated activated Factor)) (Hunt 1990; Kuwano et al. 1994) sezerniert. Diese Wachstumsfaktoren stimulieren Fibroblasten (Hunt et al. 1984; Tsuboi & Rifkin 1990), Endothelzellen (Hunt 1988) und Keratinozyten (Werner et al. 1992; Kratz et al. 1995) so, dass sie in die Wunde einwandern (Jyung et al. 1994, Chen et al. 1995; Kirchberg et al. 1995). Diese späte Phase der Inflammation bereitet die Phase der Proliferation vor (Arey 1936; Simpson & Ross 1972). Die Konzentration und Verteilung von Wachstumsfaktoren ist einer der entscheidenden Parameter während der Proliferation.

2.2.1.3 Proliferation

Während der Proliferation liegt das Hauptbestreben der Zellen im Auffüllen des Gewebedefektes. Diese Phase beginnt schon etwa ein bis zwei Tage nach der Verletzung und dauert bis zu 14 Tage an (Hunt 1988). Sie wird ab dem vierten Tag nach der Verletzung sichtbar und zwar durch die Ausbildung eines charakteristischen so genannten Granulationsgewebes. Dabei bilden sich an freien Oberflächen rötliche, leicht blutende, glasig-transparente Körnchen (lat. Granula) (Clark 1993). Sie stehen für einzelne Gefäßbäumchen mit kleinen Kapillaren. Definiert ist das Granulationsgewebe als eine vorübergehend auftretende, primitive Gewebeeinheit, die nach Erfüllung ihrer Aufgaben schrittweise zu Narbengewebe umgewandelt wird.

Die Stimulationsmechanismen, die während der Inflammation in Gang gesetzt worden sind, führen zur Zellteilung und darüber hinaus zum vermehrten Einwandern von Zellen in die Wunde. In der Wunde beginnen diese Zellen dann zu proliferieren (Grinnell 1994; Fassler et al. 1996), sie bilden neue Gefäße (Rappolee et al. 1988) und Kollagen (Knighton et al. 1982) und erhöhen dadurch die Zelldichte in der Wunde (Bennett & Schultz 1993).

Granulationsgewebe besteht hauptsächlich aus Endothelzellen, Leukozyten, Histiozyten, Fibrozyten, Plasmazellen, Makrophagen und insbesondere Wundfibroblasten, die sich aus Gewebefibroblasten differenziert haben.

Ab Tag 4 produzieren die Wundfibroblasten unter anderem Typ I Prokollagen und Typ III- und Typ IV-Kollagen, darüber hinaus noch andere Matrixmoleküle, welche sie in der Wunde ablagern. Die Strukturmoleküle (Fibrin, Fibronectin und Hyaluronsäure) der neugebildeten, provisorischen Matrix bilden ein lockeres, dreidimensionales Netzwerk für die immigrierenden Zellen (Clark 1985). Außerdem beginnt die Kontraktion der Wundränder, es kommt zur Defektauffüllung der Wunde mit Bindegewebe und vom Rande her kommt es zur beginnenden Epithelialisierung (Voggenreiter & Dold 2004).

Um den 7.Tag ist die größte Menge an Fibroblasten in der Wunde zu finden. Sie werden durch Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF und TGF- β) bezüglich ihrer Proliferation, Chemotaxis und synthetischer Aktivität beeinflusst. Ein Ungleichgewicht dieser modulierenden Faktoren kann zu einer fehlerhaften oder aber auch überschießenden Heilung führen (Voggenreiter & Dold 2004). Da die

Wundfibroblasten im Granulationsgewebe eine zentrale Rolle spielen, wird deutlich, dass sowohl die Quantität, als auch Qualität des Gewebes sehr von der Synthese- und Proliferationsfähigkeit der Fibroblasten abhängen (LaVan & Hunt 1990). Unter anderem tragen die Myofibroblasten (MF) zur Gewebekontraktion bei und steuern die Wundheilung durch Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM) (Shepard et al. 2004; Desmouliere et al. 1993; Grotendorst et al. 2004). Abgesehen von der ECM-Produktion gewährleisten die MF auch noch die Stabilisierung neuer Gefäßsprossungen während der Neoangiogenese (Powell et al. 1999).

Diese Gefäßneubildung ist eine grundlegende Voraussetzung für die Bildung von Granulationsgewebe (Voisard et al. 1997). Die Angiogenese ist ein komplizierter Vorgang, der auf ECM und insbesondere auf die Stimulation von Endothelzellen angewiesen ist (Simpson & Ross 1972). Dabei sind jedoch eine Vielzahl weiterer Faktoren, wie VEGF und TGF- β , von Bedeutung. Ebenso stimulieren eine niedrige Sauerstoffspannung und Laktat die Angiogenese. Nach Abschluss der Epithelialisierung endet die Phase der Proliferation.

2.2.1.4 Remodeling

Die vierte und letzte Phase ist die Differenzierungs- und Umbauphase, das sogenannte Remodeling (Kimura et al. 1995; Fassler et al. 1996). Sie ist durch Wundkontraktion, Reepithelialisierung und Narbenbildung gekennzeichnet.

Anfangs werden die Proteoglykane, zum Beispiel Hyaluronsäure, aus der Matrix entfernt und an ihrer Stelle werden Kollagenbündel, aus Kollagen Typ I, eingelagert. Der Hauptbestandteil der Proteoglykane, das Fibronectin, diente in den vorherigen Wundheilungsphasen gemeinsam mit dem Fibrin als zeitweilige Leitlinie für die Zellmigration in die Wunde (Clark 1985). Die Fibroblasten werden durch Enzyme, die im Granulationsgewebe freigesetzt werden, unter anderem Proteasen und Laktat, aktiviert und zur Faserneubildung und Proliferation angeregt.

Die MF, die sich im Granulationsgewebe aus Fibroblasten differenzieren, sind für die Kontraktionszunahme verantwortlich. Sie ähneln in ihren Eigenschaften und Proteinen den Zellen der glatten Muskulatur. Durch die Kontraktion wird das

Gewebe wasserärmer und die Gefäß- und Zelldichte nimmt ab. Letzten Endes kommt es zur Umwandlung in Narbengewebe (Desmouliere et al. 1995; Hanselmann & Mutschler 1998).

Bei der normalen menschlichen Wundheilung verlassen die MF die Narbe. Falls sie allerdings im Gewebe persistieren kommt, es durch Kontraktion des Granulationsgewebes zur hypertrophen Narbenbildung (Moulin et al. 1998; Desmouliere et al. 1993). Ein Beispiel einer solchen abnormalen Kontraktion ist der Morbus Dupuytren, bei dem die Kontraktion der Palmarfaszie zur irreversiblen Kontraktion mit Funktionsverlust der Finger führt (Vaughan et al. 2000). TGF- β_1 vermittelt dosisabhängig eine Zunahme der kontraktilen Kraft in den MF (Vaughan et al. 2000). Allerdings führt ein Persistieren der TGF- β_1 Produktion durch die daraus resultierende fortbestehende ECM-Produktion zur Fibrose (Border & Ruoslahti 1992; Masur et al. 1996).

Die Reepithelialisierung ist ein ausschlaggebender Schritt, der durch das Einwandern wundrand-ständiger Epithelzellen gekennzeichnet ist. Ferner kommt es zur Reduktion der Gefäßdichte.

Im Defektbereich entsteht eine narbige Schrumpfung, die mit einer Einziehung an der Oberfläche sichtbar wird. Das Narbengewebe ersetzt den Gewebedefekt durch eine stabile Narbe, womit die Kontinuität wiederhergestellt wird. Somit wird die Wundstabilität gegenüber Scher- und Zugkräften erhöht (Grotendorst et al. 1985). Die Narbe besitzt allerdings letztendlich nur etwa 80% der Festigkeit des ursprünglichen Gewebes (Tibbs 1997). Definitionsgemäß ist die Wundheilung abgeschlossen, sobald die Zirkulation und der ursprüngliche Zellhaushalt im verletzten Gewebe vollständig wiederhergestellt sind. Die Heilungsphasen schreiten, hauptsächlich bei großen Defekten, konzentrisch vom Wundrand ins Wundzentrum voran und sind nicht gleichzeitig über die komplette Wundfläche verteilt. Dadurch wird das gleichzeitige Vorkommen von Inflammations- und Proliferationsphase in einer Wunde möglich.

Das entstandene Narbengewebe ist ein faserreiches, zell- und gefäßarmes Bindegewebe. Es ist allerdings nur ein Ersatzgewebe, infolgedessen fehlen Drüsen- und Pigmentzellen, sowie weitere wichtige Eigenschaften der Haut.

Die Wundheilung ist allerdings immer nur eine Reparatur und nie eine Regeneration (Calvin 1998).

2.3 In vitro Co-Kultur-Wund-Modell

Die Identifikation der basalen Prozesse der Zellinteraktionen ist sowohl für das Verständnis der Geweberegeneration als auch für die Entwicklung neuer Tissue-Engineering-Strategien wichtig. Bei der Wundheilung kann man die Regeneration, ein gut organisiertes Zusammenspiel von verschiedenen Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Myozyten, Epithelzellen, immunkompetenten Zellen und Stammzellen gut untersuchen (Singer & Clark 1999; Diegelmann & Evans 2004; Roh & Lyle 2006).

Menschliche Wundbiopsien sind allerdings nicht nur aus ethischen Gründen schwierig zu erhalten. Des Weiteren ist die Standardisierung der Gewebegewinnung sehr kompliziert.

Daher wurden in vitro Modelle entwickelt, die Trauma und Regeneration nachahmen und zusätzlich die Untersuchung der Zellantwort ermöglichen (Gottrup et al. 2000). Modelle, bei denen die in vitro Wund-Technik verwendet wurde, haben das Problem, dass sie meist nur auf einen Zelltyp fokussiert sind, und dementsprechend keine Analyse der Zellinteraktionen erlauben (Kole et al. 2005; Hochman et al. 2006). Es gibt zwar verschiedene Modelle, die die Zellinteraktion auf der Basis von Co-Kulturen untersuchen, aber diese Modelle sind nicht mit in vitro Wundheilungsassay kombiniert.

Derzeit existiert kein angemessenes Modell das die Interaktion von Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen unter Wundbedingungen charakterisiert. Wir konzentrierten uns auf diese Zelltypen, weil die funktionelle Interaktion von mikrovaskulären Endothelzellen und Fibroblasten für die Regeneration von Gewebedefekten und für die Wundheilung zwingend erforderlich ist. Dafür entwickelten wir ein in vitro Modell, welches kombiniert ist aus einem in vitro Wundheilungsassay und co-kultivierten humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) und normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) (CCSWMA = co-culture scratch-wound migration assay). Des Weiteren konzentrierten wir uns auf den Effekt von in vitro Hypoxie auf Proliferation, Migration und die Endothelin-1 (ET-1) vermittelte Zellinteraktion. Wir wollten herausfinden, ob das zelluläre Zusammenspiel der Co-Kultur während der simulierten Bedingungen einen Vorteil darstellen könnte. Es repräsentiert einen

Teil der typischen Wundheilung auf Zellebene. Das Modell wurde verwendet, um den Effekt von 24stündiger Hypoxie ($< 5\text{mmHg O}_2$) (siehe 2.4) und von TGF- β_1 (siehe 2.5.1) auf die Proliferation, Migration, Differenzierung und ET-1 zu untersuchen.

2.4 Wundheilung und Hypoxie

Die Wundheilung ist einer der komplexesten biologischen Prozesse im Organismus. Sie ist ein interaktiver Prozess, für den sowohl lösliche Mediatoren als auch Blutzellen, extrazelluläre Matrix und Parenchymzellen wichtig sind (Voggenreiter & Dold 2004).

Zunächst führt eine Verletzung zur Gewebeerstörung und durch die Gefäßzerstörung und den hohen Sauerstoffverbrauch der Zellen am Wundrand und im Granulationsgewebe zu Hypoxie (Hunt et al. 1972). Hypoxie spielt in der frühen Wundheilungsphase eine positive Rolle (Tandara & Mustuoe 2004). Sie führt zur Synthese und Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie TGF- β (Falanga et al. 1991) oder VEGF (Voggenreiter & Dold 2004) durch die ansässigen Zellen. Darüber hinaus erhöht akute Hypoxie die Proliferation von Fibroblasten (Falanga & Kirsner, 1993; Eul et al. 2005), wohingegen unter chronischer Hypoxie die Proliferationskapazität abnimmt (Siddiqui et al. 1996). Hypoxie fördert auch die Migration von Fibroblasten (Mogford et al. 2002; Lerman et al. 2003; Eul et al. 2005) und menschlichen Keratinozyten (O'Toole et al. 1997; Xia et al. 2001).

Eine niedrige Sauerstoffspannung und Laktat stimulieren auch die Angiogenese während der Proliferationsphase der Wundheilung (Voggenreiter & Dold 2004). Mit der Gefäßneubildung kommt es zur Reoxygenierung, und der Sauerstoffgehalt in der Wunde nimmt wieder zu.

2.5 Wundheilung und Wachstumsfaktoren

Am Anfang der Inflammation steht die Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Wichtig sind dabei vor allem EGF, FGF, PDGF und TGF- β und - α . Der EGF wird von Thrombozyten produziert (Hunt 1990; Kuwano et al. 1994) und wirkt auf die Motilität, Migration und Proliferation von Epithelzellen und Keratinozyten (Bennet & Schultz 1993; Werner et al. 1992; Kratz et al. 1995). Der FGF wird wiederum von Makrophagen (Hunt et al. 1984; Cromack et al. 1990) und Endothelzellen produziert und wirkt insbesondere während der Phase der Proliferation auf die Angiogenese und Proliferation von Endothelzellen und Fibroblasten (Hunt 1988, Hunt et al. 1984, Tsuboi & Rifkin 1990). Thrombozyten (Hunt 1990; Kuwano et al. 1994), Keratinozyten und Makrophagen (Hunt et al. 1984; Cromack et al. 1990) synthetisieren PDGF und nehmen dadurch, während aller Phasen der Wundheilung Einfluss auf Chemotaxis, Proliferation und Aktivierung der Fibroblasten sowie Makrophagen (Hunt et al. 1984, Tsuboi & Rifkin 1990) und steigern die Synthese extrazellulärer Matrix und die Granulation der Wunde.

2.5.1 TGF- β_1

Es gibt fünf unterschiedliche Formen von TGF- β (TGF- β_1 bis TGF- β_5), die in der biologisch aktiven Form alle über Disulfidbrücken verbundene Homodimere sind (Vale et al. 1990). TGF- β_1 besteht aus 290 Aminosäuren und sein Gen liegt auf dem Chromosomen 19q13.

Es wird von unterschiedlichen Zellen exprimiert, so findet man es beispielsweise in der menschlichen Muttermilch, in Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen, Chondrozyten und Leukämiezellen (Yang et al. 1999).

Freigesetzt wird überwiegend die biologisch inaktive Form, das sogenannte latente TGF- β , welches einen zusätzlichen Peptidkomplex enthält. Das latente TGF- β ist überwiegend an der Zelloberfläche lokalisiert. Das biologisch aktive TGF- β entsteht nach dem Abtrennen des Proteinkomplexes. Die Aktivierung

dieses Mechanismus ist unklar, es können direkte Zell-Zell-Kontakte, Proteasen, Plasminogen oder Transglutaminasen involviert sein (Lyons & Moses 1990).

TGF- β_1 wird direkt nach einer Gewebeverletzung von Leukozyten und Thrombozyten freigesetzt (Hunt 1990; Kuwano et al. 1994). Aber auch Endothelzellen geben große Mengen von latentem TGF- β_1 frei (Flaumenhaft et al. 1993). Während der Phase der Proliferation veranlasst TGF- β_1 die überlebenden Zellen zur Produktion von ECM und zusätzlichem TGF- β_1 . Des Weiteren stimuliert es die Migration von Mono- und Leukozyten beziehungsweise von Epidermiszellen (Wahl et al. 1987; Gold et al. 1990; Postlethwaite et al. 1987), führt zur Angiogeneseinduktion (Roberts et al. 1986), kontrolliert die Produktion von Wachstumsfaktoren und anderen Entzündungsmediatoren (Kehrl et al. 1986; Ristow 1986; Tsunawaki et al. 1988) und beeinflusst die Chemotaxis von Fibroblasten (Hunt 1988, Hunt et al. 1984, Tsuboi & Rifkin 1990). Darüber hinaus wird die Differenzierung, die in der vorliegenden Arbeit genauer betrachtet wurde, von Fibroblasten in MF durch TGF- β_1 stimuliert. Fibroblasten reagieren auf TGF- β_1 -Zugabe mit einer Zunahme des α -Smooth-muscle-actin-Gehaltes (α -SMA) und der kontraktilen Kapazität (Moulin et al. 1998).

Ein bisher unbekannter Mechanismus führt zur Beendigung der TGF- β_1 - und ECM-Produktion, wenn die Reparatur abgeschlossen ist (Border & Ruoslahti 1992). Zusammenfassend kann man sagen, dass TGF- β_1 die Wundheilung beschleunigt (Mustoe et al. 1987). Die negative Seite ist, dass die vermehrte, durch TGF- β_1 vermittelte Produktion von ECM zur Fibrose führen kann (Border & Ruoslahti 1992).

2.6 Die eigene Fragestellung

1. Ist es möglich HDMEC und NHDF zusammen in einem Co-Kultur-Wund-Modell zu kultivieren?
2. Gibt es morphologische Auffälligkeiten der Co-Kultur im Vergleich zur Mono-Kultur?
3. Kann man die Co-Kultur mit einem 2-dimensionalen in vitro Wundheilungsmodell kombinieren und ist dieser Assay dazu geeignet, verlässliche Daten bezüglich der Proliferation, Migration, Differenzierung und ET-1 bzw. Extra-Domain-A-Fibronektin (EDA-Fn) Expression zu liefern?
4. Gibt es unterschiedliche Zellantworten auf Hypoxie in Mono- und Co-Kultur?
5. Kann die TGF- β_1 -Zugabe die Effekte der Hypoxie beeinflussen?
6. Ist dieses Setup ein ideales Instrument, um die Interaktion von HDMEC mit NHDF und MF zu charakterisieren und direkt zu visualisieren?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Der Versuch im Überblick

In einem Co-Kultur-Modell wurden HDMEC und NHDF, die zuvor separat kultiviert worden waren, kombiniert (siehe 3.2).

Die Co-Kulturen wurden einem zuvor standardisierten in vitro Wundmodell (siehe 3.5) unterzogen (n = 10), um zusätzlich eine Aussage über ihre Migrationsfähigkeit in Abhängigkeit des Einflusses von Hypoxie und der zusätzlichen Gabe von TGF- β_1 zu erhalten (siehe 3.3/3.4).

Zum Vergleich wurden NHDF- und HDMEC-Mono-Kulturen (n = 3) herangezogen. Mittels immunzytochemischer Färbungen mit Antikörpern gegen Factor-VIII-related-antigen (vWF), EDA-Fn und α -SMA konnten exakte Zahlenverhältnisse der Zellen zueinander und die Differenzierung der NHDF zu MF bestimmt werden (siehe 3.6). Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (siehe 3.7). Außerdem wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) die ET-1-Konzentration im Medium bestimmt (siehe 3.8).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und anschließender post-hoc-Analyse (siehe 3.9).

3.2. Zellkultur

Sämtliche Untersuchungen mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur oder in den Inkubatoren durchgeführt. Im Brutschrank herrschte eine Temperatur von 37°C mit zusätzlicher 5% CO₂-Begasung und einer Luftfeuchtigkeit von 97%.

3.2.1 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen

Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf der HDMEC-Kultivierung zur Herstellung der Master Cell Bank.

Tag	HDMEC
0	Ansatz in 2 kleine Kulturflaschen Passage 2 (P 2)
1	½ Mediumwechsel
3	Unterkultivierung P 3 2 große Kulturflaschen
6	Mediumwechsel
8	Unterkultivierung P 4 4 große Kulturflaschen
10	Unterkultivierung P 5 12 große Kulturflaschen
14	Mediumwechsel
16	P 6 12 Kryokulturen → zur Herstellung der Master Cell Bank

Der HDMEC Kultivierungsablauf ist in Tabelle 1 (Tab.1) genau dargestellt. Das Ziel bestand im Anlegen einer Master Cell Bank, so dass ein Zellpool entstand, der gleiche Voraussetzungen für alle Versuche darstellte.

Die Aufteilung erfolgte bei den HDMEC anfangs in zwei kleine Kulturflaschen mit jeweils 5 ml Endothelzellmedium, welches bei einer Anfangsgesamtzellzahl von 650.000 HDMEC 65.000 Zellen/ml Medium entsprach. An Tag 1 erfolgte bei den

HDMEC ein halber Mediumwechsel. Das bedeutete ein vorsichtiges Abpipettieren des halben Mediums aus den Kulturflaschen und Auffüllen der fehlenden Menge. Drei Tage nach dem Ansetzen wurden die HDMEC unterkultiviert. Zuerst wurden sie dafür einer 2-maligen Spülung mit PBS unterzogen. Anschließend wurden 2,5 ml Trypsin-EDTA in jede kleine Kulturflasche pipettiert, die Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C betrug 2 1/2 min. Durch leichte Schläge an den Kulturflaschen lösten sich die Zellen vom Boden. Durch Zugabe von Medium wurde das Trypsin durch das darin enthaltene fetale Kälberserum inaktiviert.

Nach 3 minütigem Zentrifugieren mit 1000 Umdrehungen/Minute (U/min) bei Raumtemperatur setzten sich die Zellen am Boden des Reagenzröhrchens ab. Der Überstand wurde verworfen. Die folgenden Medienwechsel und die Unterkultivierungen erfolgten nach dem gleichen Prinzip.

Anlegen einer „Master-Cell-Bank“

Am 16. Tag wurden die zwölf Kulturen der P 5 als Kryokultur eingefroren. Dafür wurde die Einfrierkammer (Freezing Container) vorbereitet, indem sie mit 250 ml Isopropanol bestückt wurde. Nach Trypsinierung und Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und danach jeweils 1 ml Einfriermedium zum Zellpellet gegeben. Mit Hilfe einer Einmal-Pasteurpipette wurde das Ganze resuspendiert und in vorbereitete Kryoröhrchen gefüllt. So ergaben die zwölf großen Kulturflaschen der HDMEC zwölf Kryokulturen der P 6 mit je 1 ml Volumen.

Die Kryoröhrchen wurden für mindestens 4 h oder über Nacht bei -80°C im Freezing Container eingestellt. Danach sind die Kryoröhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt worden, wo sie lagerten.

Tabelle 2: Zeitlicher Ablauf des HDMEC-Ansatzes.

Tag	HDMEC
0	Ansetzen aus einer Kryokultur in 4 kleine Kulturflaschen (P 6)
1	Mediumwechsel
3	Unterkultivierung in 4 große Kulturflaschen (P 7)
4	Mediumwechsel
7	Mediumwechsel
8	Ansetzen Co-Kultur/Mono-Kultur
9	In vitro-Wunden

Aus einer Kryokultur der P 6 sind vier kleine Kulturflaschen mit jeweils 5 ml Medium angesetzt worden. Der Kultivierungsablauf ist in Tab. 2 genau dargestellt. Als Medium wurde in diesem Fall Endothelzellwachstumsmedium und Quantum 333 Fibroblastenmedium im Verhältnis 3:1 verwendet. Abbildung 1 (Abb.1) zeigt ein Beispiel einer konfluenten HDMEC Kultur am 2. Tag.

Zeitlich erstreckte sich das Procedere über 8 Tage. An Tag 8 begann jeweils das Ansetzen der Co-Kultur, beziehungsweise der Mono-Kultur. Mit Hilfe des CASY Zellzählsystems wurde ermittelt, dass sich in vier großen Kulturflaschen ca. 8 Mio. HDMEC befanden. Diese Zellen wurden in 14 Kulturen unterteilt, so dass sich beim Ansatz ca. 500.000 HDMEC auf jedem Objektträger befanden. Die Aufteilung erfolgte auf 14 Kulturen, da ein Versuch aus sieben Kulturen bestand. Es wurden also jeweils zwei Versuche zusammen angesetzt.

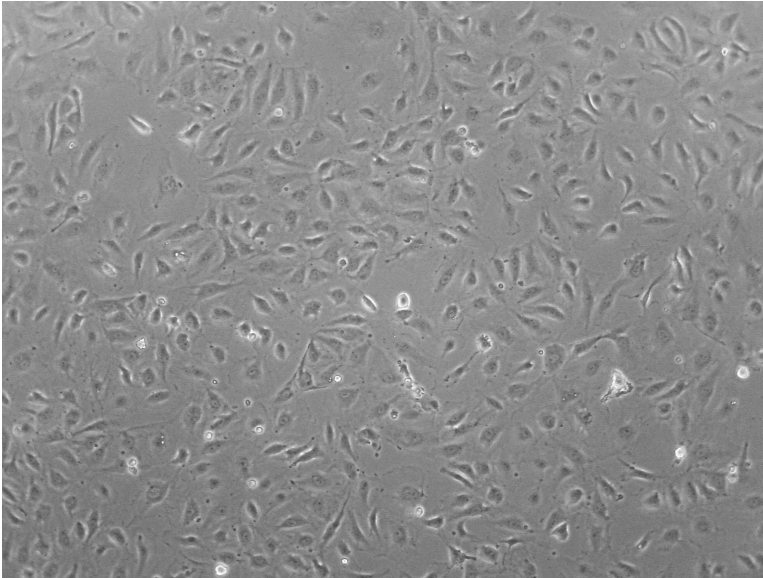


Abbildung 1:
Konfluente HDMEC-Kultur an Tag 2.

3.2.2 Normale humane dermale Fibroblasten

Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf der NHDF-Kultivierung zur Herstellung der Master Cell Bank.

Tag	NHDF
0	Ansatz in 2 große Kulturflaschen (P 2)
1	Mediumwechsel
3	Mediumwechsel
6	Mediumwechsel
8	Unterkultivierung P 3 6 große Kulturflaschen
13	Unterkultivierung P 4 18 große Kulturflaschen
16	P 5 36 Kryokulturen → zur Herstellung der Master Cell Bank

Der NHDF Kultivierungsablauf ist in Tab. 3 dargestellt.

Die Aufteilung erfolgte bei den NHDF in zwei große Kulturflaschen mit je 10 ml Quantum 333 Fibroblastenmedium. Dies entsprach bei einer Anfangsgesamtzellzahl von 600.000 NHDF 30.000 Zellen/ml Medium. An den Tagen 1, 3 und 6 erfolgte jeweils ein kompletter Mediumwechsel. Am 8. Tag nach Kulturansatz begann die erste Unterkultivierung in sechs große Kulturflaschen. 5 Tage später wurde in 18 große Kulturflaschen unterkultiviert.

Die Medienwechsel und Unterkultivierung erfolgten nach dem gleichen Prinzip wie unter 3.2.1 bei den HDMEC beschrieben.

Anlegen einer „Master-Cell-Bank“

Auch die NHDF wurden am 16. Tag kryokultiviert, nach dem gleichen Prinzip wie die HDMEC (siehe 3.2.1).

In diesem Falle ergaben die 18 großen Kulturflaschen der NHDF 36 Kryokulturen der Passage 5 mit je 1 ml Volumen.

Tabelle 4: Zeitlicher Ablauf des NHDF-Ansatzes.

Tag	NHDF
3	Ansetzen aus einer Kryokultur in 2 große Kulturflaschen (P 5)
4	Mediumwechsel
8	Ansetzen der Co-Kultur/Mono-Kultur
9	In vitro-Wunden

Aus jeweils einer Kryokultur der Passage 5 wurden zwei große Kulturflaschen mit jeweils 10 ml Medium angesetzt. Der Kultivierungsablauf ist in Tab. 4 beschrieben. Als Medium wurde in diesem Fall Endothelzellwachstumsmedium und Quantum 333 Fibroblastenmedium im Verhältnis 3:1 verwendet. Abb. 2 zeigt ein Beispiel einer konfluenten NHDF Kultur am 5. Tag.

Zeitlich erstreckte sich das Procedere über 6 Tage. An Tag 8 begann sowohl das Ansetzen der Co-Kultur als auch der Mono-Kultur. In diesem Fall ermittelte das CASY Zellzählssystem, dass sich ca. 1,3 Millionen NHDF Zellen in einer großen Kulturflasche befanden. Diese wurden auch in 14 Kulturen unterteilt, so dass beim Ansatz ca. 200.000 NHDF zu jeder Kultur zählten.

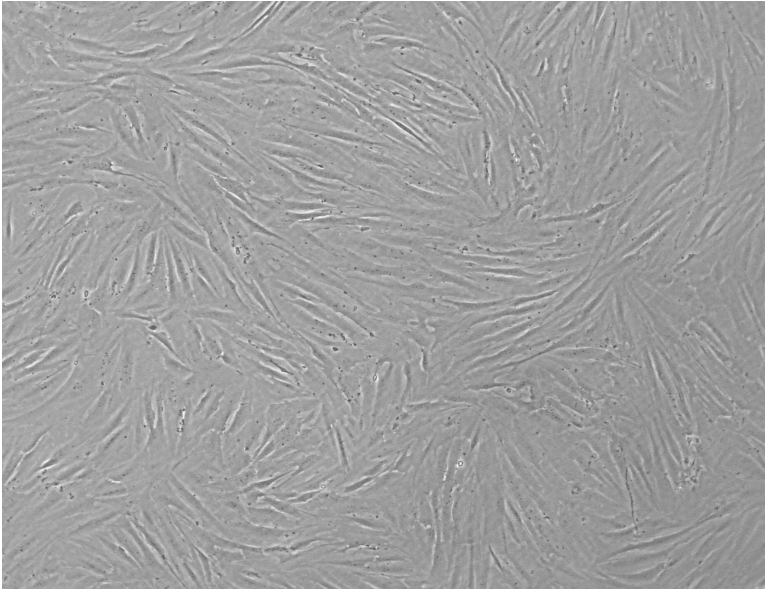


Abbildung 2:

Konfluente NHDF-Kultur an Tag 5.

3.2.3 NHDF- und HDMEC-Co-Kultur

Wie bereits bei den Mono-Kulturen beschrieben, befanden sich in vier großen Kulturflaschen ca. 8 Mio. HDMEC. Bei den NHDF waren es ca. 2,5 Mio. Zellen in zwei großen Kulturflaschen.

Diese 10,5 Millionen Zellen wurden auf 14 Kulturen verteilt, so dass beim Ansatz jeweils 750.000 Zellen zu jeder Kultur zählten. Davon waren ca. 550.000 HDMEC und ca. 180.000 NHDF, das Verhältnis HDMEC zu NHDF betrug somit ca. 3:1.

Die Kultivierung erfolgte auf Objektträgern in QuadriPERM-Schalen. Zu allen Kulturen wurden je 5 ml Medium gegeben, welches sich aus Endothelzellmedium und Quantum 333 Fibroblastenmedium im Verhältnis 3:1 zusammensetzte.

Vor Versuchsbeginn wurden auf der Rückseite der Objektträger mittels eines Diamantschreibers Markierungen auf Höhe der in vitro Wunden gemacht, die zur Orientierung dienten.

3.3 Experimentelles Setup

Tabelle 5: Übersicht über die verschiedenen Kulturen eines Versuchs.

0 h	24 h/Tag 1	48 h/Tag 2
Normoxie 0 (N0)	Normoxie 1 (N1)	Normoxie 2 (N2)
	Normoxie 1 mit TGF- β_1 (N1TGF)	Normoxie 2 mit TGF- β_1 (N2TGF)
	Hypoxie 1 (H1)	
	Hypoxie 1 mit TGF- β_1 (H1TGF)	

Jeder Versuch setzte sich aus sieben Kulturen zusammen. Tab. 5 zeigt die genaue Einteilung, die im Folgenden beschrieben wird.

Die erste Kultur wurde direkt nach Induzieren der in vitro Wunden auf dem Objektträger fixiert und diente somit zur Bestimmung der Ausgangswerte. Sie wurde als Normoxie 0 (N0) bezeichnet. Zwei weitere Kulturen wurden 24 h beziehungsweise 48 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert: Normoxie 1 (N1) und Normoxie 2 (N2). Zu zwei anderen Kulturen wurde TGF- β_1 gegeben. Die Konzentration des TGF β_1 im Medium betrug 1 ng/ml (siehe 3.12 Lösungen). Auch hier betragen die Inkubationszeiten 24 h (N1TGF) und 48 h (N2TGF) im Brutschrank bei 37°C. Zwei weitere Kulturen wurden 24 h in der Hypoxiekammer (siehe Abb. 3a und b) inkubiert. Einer dieser Kulturen wurde darüber hinaus TGF- β_1 zugefügt (H1TGF). Die Kultur Hypoxie 1 (H1) wurde ebenfalls nach 24 h fixiert. Vor jeder Fixierung wurde 2 x 1 ml des Kulturmediums jeder Kultur bei -80°C eingefroren, um die ET-1-Konzentration mittels ELISA bestimmen zu können (siehe 3.8.2)

Die Vorbereitung der Fixierung begann immer mit dem Abpipettieren des Mediums. Diesem schloss sich eine 2-malige Spülung mit PBS an. Danach wurde 0,05M Kaliumchlorid (KCl) zugegeben und 5 min bei 37°C inkubiert.

KCl ist eine hypotone Lösung und führt dazu, dass die Zellen Flüssigkeit resorbieren und quellen. Dadurch wird die Antikörperaufnahme bei der späteren Immunfärbung erleichtert. Zur eigentlichen Fixierung verweilten die Objektträger 10 min bei -20°C in Methanol.

Zuletzt trockneten sie bei Raumtemperatur, bevor sie mit einem Glycerol/PBS-Gemisch (9+1) eingedeckt wurden. Gelagert wurden die Objektträger bei -20°C .

3.4 In vitro-Hypoxie

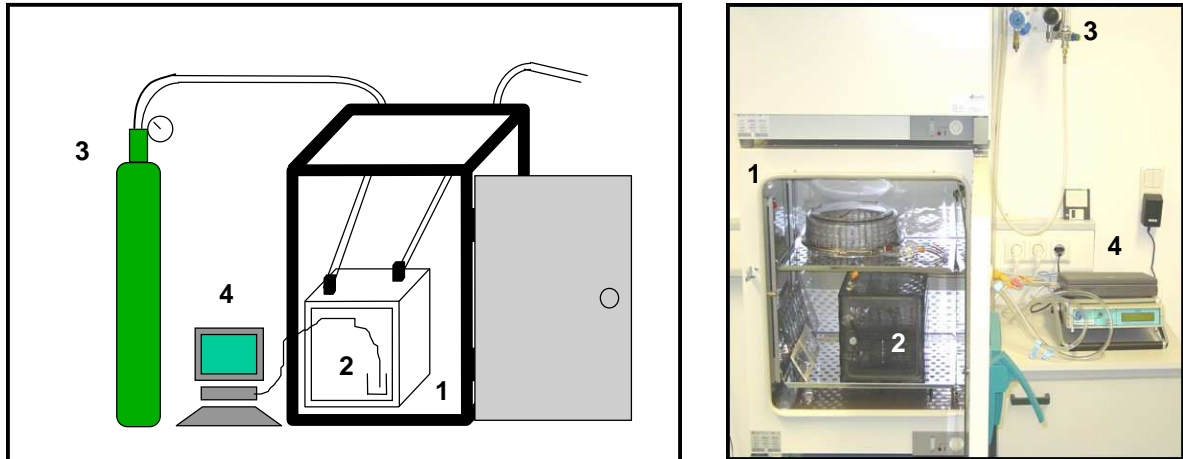


Abbildung 3A und 3B: In vitro Hypoxie Aufbau

- 1 Brutschrank
- 2 Hypoxiekammer
- 3 N_2 -/ CO_2 -Zufuhr
- 4 O_2 -Sättigungsmessung (Lycox-Sonde)

Die Hypoxiekulturen wurden für 24 h in der Hypoxiekammer, welche sich wiederum im Brutschrank bei 37°C befand, eingestellt. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abb. 3a zu sehen. Fotografisch ist er in Abb. 3b dargestellt. Die N_2 -/ CO_2 -Zufuhr betrug 1 l/h, so dass nach ca. 120 min stabile Hypoxiebedingungen von $< 5 \text{ mmHg O}_2$ erreicht wurden. Abb. 4 zeigt die Sauerstoffsättigung im Medium im zeitlichen Verlauf.

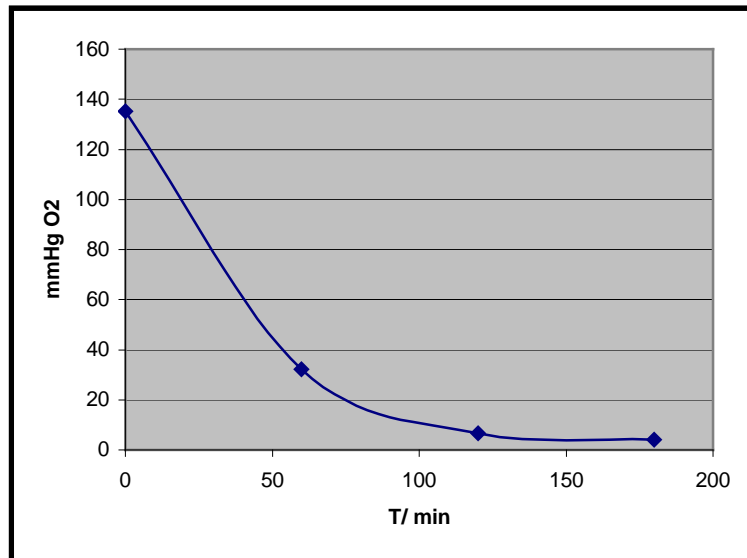


Abbildung 4:

Sauerstoffgehalt im Kulturmedium in der Hypoxiekammer bei einem Gasfluß von 1 l/min, gemessen mit einer Lycox-Sonde.

3.5 Migrationsassay

Jeder Objektträger wurde in zwei Färbereiche untergliedert.

Mit Hilfe von zwei verschiedenen Spitzen, einer 1000- μ l-Eppendorf-Pipettenspitze (Kratzer A) und einer 5er-Pipette (Kratzer B), die unterschiedliche Breiten aufweisen, wurde in jedem Bereich je ein Spalt mittels Kratzen durch den kompletten Monolayer in die Kultur gemacht. Das Vorgehen ist fotografisch in Abb. 6 dargestellt. Darüber hinaus sieht man in Abb. 7 die in vitro Wunde an Tag 0 in der Co-Kultur, die mittels einer 1000- μ l-Eppendorf-Pipettenspitze hergestellt wurde.

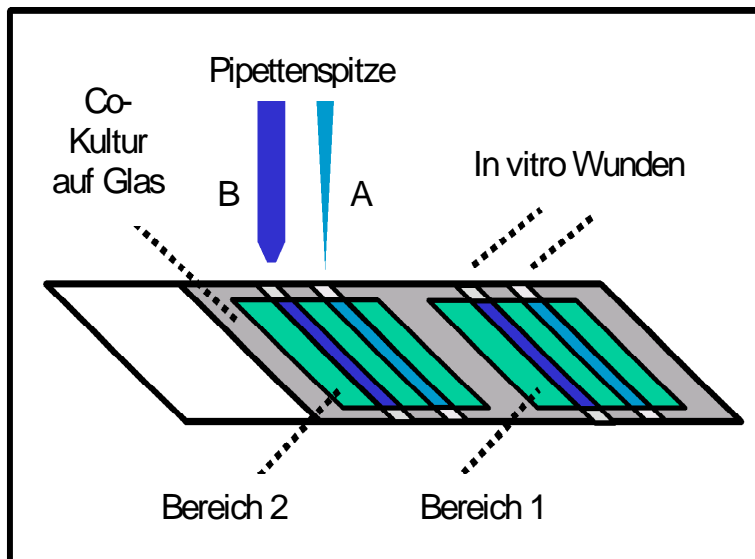


Abbildung 5:

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: zwei Färbereiche mit je zwei in vitro Wunden.

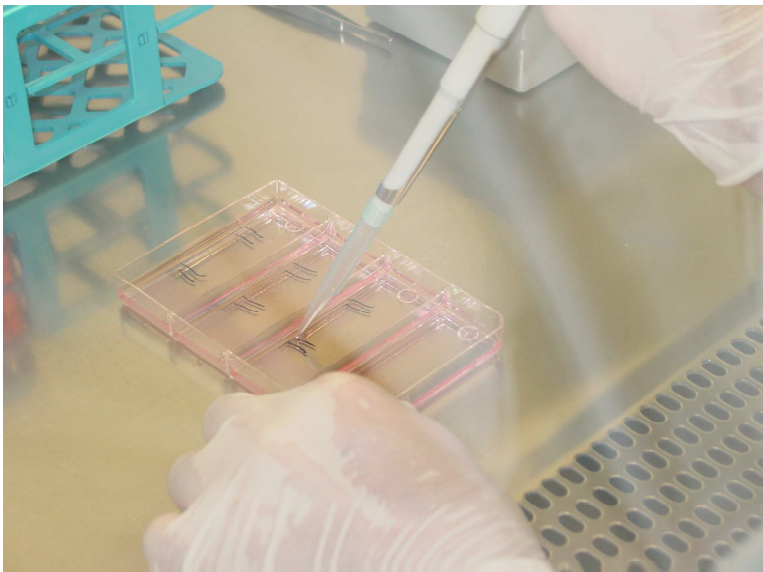


Abbildung 6:

Fotografische Darstellung des Versuchsvorgehens beim Herstellen einer in vitro Wunde: Kratzen mit der blauen Pipettenspitze durch den kompletten Monolayer.

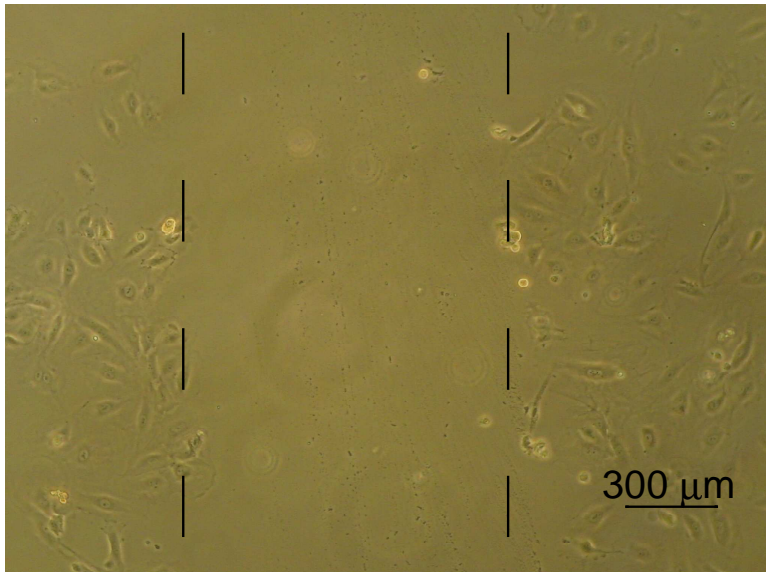


Abbildung 7:
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer Co-Kultur:
in vitro Wunde an Tag 0.

3.6 Immunzytochemische Färbung

3.6.1 Grundlagen der Immunzytochemischen Färbung

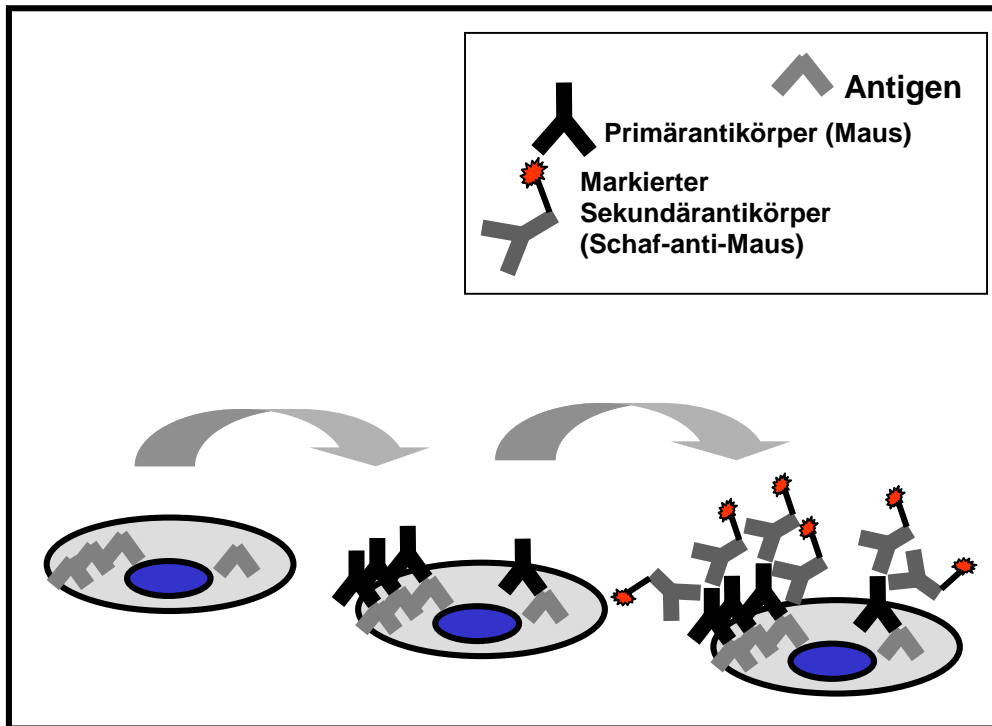


Abbildung 8:

Schematische Darstellung der immunzytochemischen Färbung mit Primär- und markiertem Sekundärantikörper.

Mittels einer immunzytochemischen Färbung können Antigen-Strukturen, meist Proteine, mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden. Damit kann beispielsweise bestimmt werden, in welchem Gewebe das Antigen vorhanden ist und auch, in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert ist. Das Gewebe oder die Zell-Präparate werden mit einem Antikörper, der das gesuchte Antigen spezifisch detektiert, inkubiert. Dieser sogenannte Primärantikörper stammt von einem bestimmten Tier, im gezeigten Beispiel von einer Maus. Nach der Inkubation werden alle überschüssigen Antikörper, die nicht an Antigen gebunden waren, ausgewaschen.

Im zweiten Schritt erfolgt eine Inkubation mit einem Sekundärantikörper. Dieser ist speziell gegen den Fc-Teil des jeweiligen Primärantikörpers gerichtet und bindet somit an ihn. Der Sekundärantikörper trägt einen Fluoreszenzfarbstoff. Nach der

Anregung unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dieser Farbstoff sichtbar und ermöglicht die Identifizierung der markierten Proteine.

Im Falle der doppelten Immunfluoreszenzfärbung erfolgt auf die gleiche Weise die Detektion eines zweiten Antigens, jedoch mit dem Unterschied, dass die Primärantikörper von einem anderen Tier stammen und die Sekundärantikörper an einen anderen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind.

3.6.2 Färbeprotokoll

Jeweils sieben, zu einem Versuch gehörige, Objektträger wurden gemeinsam gefärbt. Der erste Schritt war das Entfernen der Deckgläser. Anschließend wurden die Objektträger jeweils in einer Küvette mit 100 ml PBS/0,5% Tween 3-mal für 5 min gewaschen. Diese Schritte folgten im Anschluss an jede Antikörpergabe mit dem Ziel, alle überschüssigen Antikörper, die nicht ans Antigen gebunden haben, auszuwaschen. Zuerst wurden die Kulturen mit einem Primärantikörper, der aus Maus oder Kaninchen gewonnen wurden, inkubiert. Den Primärantikörper verwendete man in einer bestimmten Konzentration, wobei die Verdünnung mit einem PBS/0,1% BSA-Gemisch vorgenommen wurde. Die Inkubationszeit in einer abgedunkelten, feuchten Kammer bei Raumtemperatur betrug 30 min. Der Inkubation schloss sich eine erneute Waschung an. Es folgte die Detektion des ersten Antikörpers mit einem Sekundärantikörper, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Auch hier schlossen sich Inkubation und Waschung an.

Zur lokalen Fixierung der Antikörper wurden die Kulturen in 50 ml einer 4%igen Paraformaldehydlösung in PBS gegeben. Hier verweilten sie 5 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Zum letzten Mal gab es eine 3-malige Waschung, der sich eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe anschloss. Dabei blieben die sieben Objektträger jeweils für 3 min in einer Küvette mit 100ml 70%-igen, 80%-igen und 90%-igen Ethanol. Danach trockneten die Kulturen an der Luft. Die Präparate wurden mit Mounting Medium mit DAPI-Zusatz eingedeckt. Da der blau fluoreszierende DAPI-Farbstoff in die DNA interkaliert, wurden die Zellkerne sichtbar.

3.6.3 Primärantikörper

3.6.3.1 Von-Willebrand-Faktor

Das Faktor VIII-assoziierte-Antigen, der vWF, gilt als charakteristischer Marker für Endothelzellen (Weibel et al. 1964; Piper 1990). Er wird von diesen produziert und intrazellulär in den sogenannten «Weibel-Pallade-Bodies» gespeichert (Heimli et al. 1997; Zupancic et al. 2002).

Der vWF ist ein oligomeres, im Plasma zirkulierendes, Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 500 - 20.000 kD (Leyte et al. 1991). Es ist vor allem subendothelial verankert (Sehestad & Hou-Jensen 1981). Außerdem findet sich der vWF in Thrombozyten und im Blutplasma, wo er den Gerinnungsfaktor VIII gebunden hält. Er dient im Rahmen der primären Hämostase der Thrombozytenaggregation und der Adhäsion der Blutplättchen an der Gefäßwand (Schmidt & Thews 1995).

3.6.3.2 Extra-Domain-A-Fibronektin

Fibronektin ist ein ubiquitär vorkommendes Glykoprotein, welches von Fibroblasten gebildet und in ihrer extrazellulären Matrix eingelagert wird. Dadurch zeigen Fibroblasten ein charakteristisches Verteilungsmuster von EDA-Fn (Pankov et al. 2002).

Auf Grund der Aminosäurevariationen unterscheidet man Extra-Domain-A und -B und Typ III Fibronektin (Kornblihtt et al. 1984; Gutmann & Kornblihtt 1987; Schwarzbauer et al. 1987; Zardi et al. 1987).

Beim Menschen findet man über 20 verschiedene Isoformen, wobei zwei Hauptformen unterschieden werden: das Plasma- und das zelluläre Fibronektin. Sie haben ähnliche, aber nicht identische Molekulargewichte, die zwischen 220 und 240 kD liegen. Fibronektin spielt eine wichtige Rolle bei Adhäsions- und Migrationsprozessen, wie z.B. der Embryogenese, Hämostase und Wundheilung. (Hynes 1990; French-Constant 1995; Kornblihtt et al. 1996).

3.6.3.3 α -Smooth-Muscle-Actin

α -SMA ist in glatten Muskelzellen, Stammzellen und Vorläuferzellen verschiedener Gewebe lokalisiert (Hosoya et al. 2006). Es ist eine Isoform des Aktins glatter Muskelzellen und charakteristisch für Gefäßmuskelzellen. Skelett- und Herzmuskelzellen besitzen andere Isoformen.

Der Antikörper markiert auch Perizyten und MF in reaktiven fibroblastischen Läsionen, jedoch mit unterschiedlicher Intensität (Hasegawa et al. 1990; Skalli et al. 1986). Somit ermöglicht α -SMA-Expression die Identifikation der MF (Desmouliere & Gabbiani 1994). Diese Expression kann durch TGF- β_1 gesteigert werden (Vaughan et al. 2000).

3.6.3.4 Endothelin-1

Es sind vier verschiedene Endothelinformen bekannt: ET-1, -2, -3 und - β . ET-1 wird von Endothel- und Epithelzellen produziert und freigesetzt (Basilico et al. 2002). Es ist ein Peptid, das aus 21 Aminosäuren und zwei Disulfidbrücken besteht (Yanagisawa et al. 1988). Die Endothelinsynthese durch vaskuläre Endothelzellen wird durch bakterielle Endotoxine, Thrombin, Interleukin 1, TGF- β , durch vasoaktive Hormone wie Angiotensin und Vasopressin, durch ET-1 selbst und durch Hypoxie gesteigert (Wendel et al. 2004).

ET-1 entsteht in mehreren Schritten aus Prä-Proendothelin, welches die Sequenz des Endothelinpeptides und eine hoch cysteinreiche Endothelin-ähnliche Sequenz aus 15 Aminosäuren enthält. Die unmittelbare Vorstufe ist als Big Endothelin bekannt, ein Proendothelin, das aus 38 Aminosäuren besteht und Bestandteil der neutrophilen Granulocyten ist (Cui et al. 2001).

Das menschliche Endothelin-Gen liegt auf dem Chromosomen 6p24-p23. Es trägt eine mRNA mit 2026 Nukleotiden (Cui et al. 2001).

3.6.4 Verwendete Antikörper der Mono-Kulturen

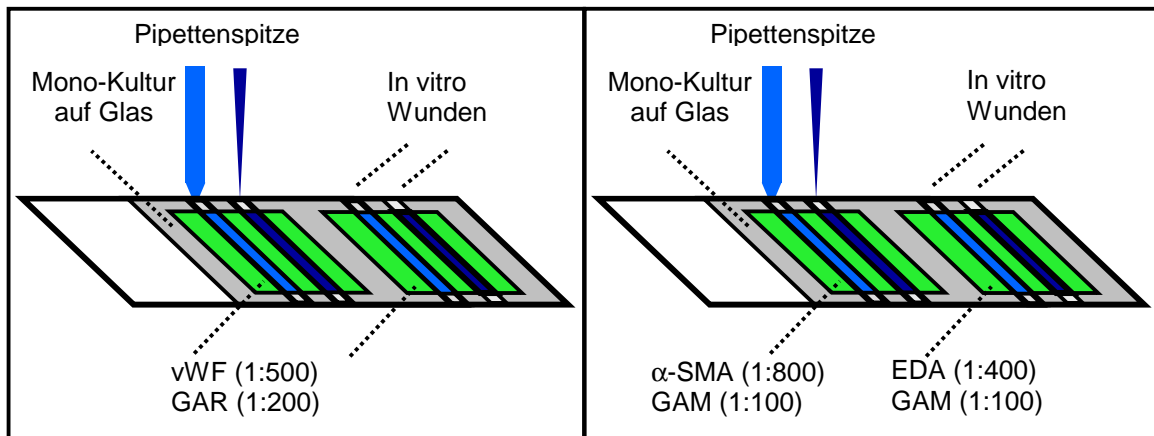


Abbildung 9 A und B:

Färbeschema der immunzytochemischen Färbung mit den verwendeten Antikörpern (und Verdünnungen).

A) Die HDMEC-Mono-Kultur wurde mittels der vWF/GAR Antikörperkombination rot dargestellt. Dies ermöglichte die Beurteilung der Proliferation und der Migration der HDMEC in die in vitro Wunde.

B) In Bereich 1 der NHDF-Mono-Kultur wurden mit Hilfe der α -SMA/GAM Antikörper die MF dargestellt. In Bereich 2 ermöglichte die EDA/GAM-Kombination die Beobachtung der NHDF. Dadurch konnte neben der Proliferation und Migration der Zellen auch die Differenzierung der NHDF beurteilt werden.

Bei den HDMEC-Mono-Kulturen wurde als Primärantikörper jeweils ein Kaninchenantikörper verwendet, der gegen ein vWF-Antigen gerichtet war. Da der Faktor von den Endothelzellen gebildet wird und für diese Zellen spezifisch ist (Weibel et al. 1964), wurde er zur Darstellung dieser genutzt. Es folgte die Detektion des ersten Antikörpers mit dem Sekundärantikörper Goat anti rabbit (GAR) Cy3 (Abb. 9 A). Es war keine Segmentierung in unterschiedliche Objektträgerbereiche nötig.

An einen rot-fluoreszierenden Sekundärantikörper gekoppelt ermöglichte der vWF eine Abgrenzung gegenüber anderen Populationen. Des Weiteren konnte durch die Interkalation von DAPI mit der Kern-DNA, die zu einer blau-fluoreszierenden Farbreaktion führte, eine genaue Bestimmung der Zellzahl erfolgen (Abb. 10).

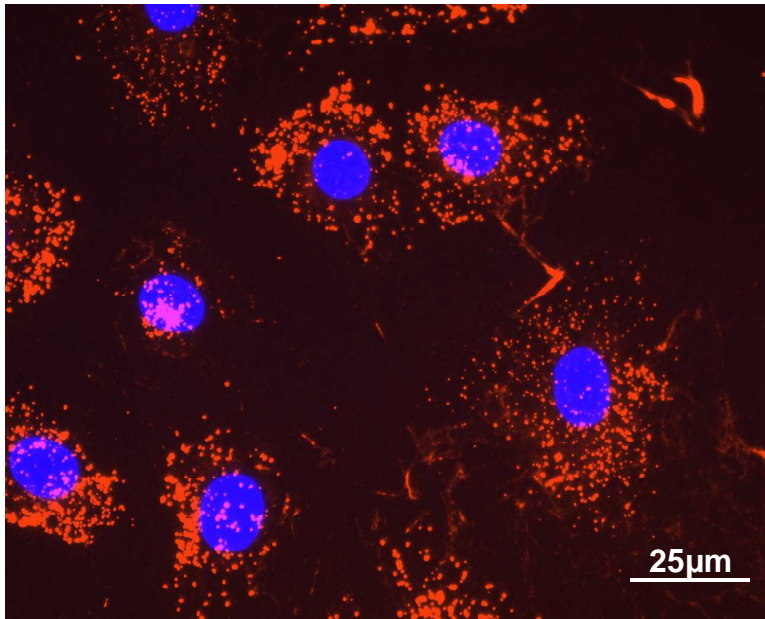


Abbildung 10:

Eine HDMEC-Monokultur nach 24 h bei der der vWF mittels eines rot (Cy 3)-fluoreszierenden Sekundärantikörpers die HDMEC zeigt und DAPI die Zellkerne blau darstellt.

Bei den NHDF-Mono-Kulturen, wurde als Primärantikörper in Bereich 1 ein α -SMA-Mausantikörper zur Darstellung der MF und in Bereich 2 ein EDA-Fn-Mausantikörper zur Darstellung der NHDF genutzt (Abb. 9 B).

Der typische Marker für MF α -SMA ist funktionell für die kontraktile Aktivität der MF wichtig. Da Fibronectin, welches in der extrazellulären Matrix vorkommt, von Fibroblasten synthetisiert wird (Pankov et al. 2002), diente es zur Darstellung dieser. Zur Detektion der ersten Antikörper wurde in diesem Fall der grün-fluoreszierende Sekundärantikörper Goat anti mouse (GAM) FITC verwendet.

Er ermöglichte die Abgrenzung von NHDF gegenüber anderen Populationen. Außerdem war eine genaue Bestimmung der Zellzahl pro Fläche möglich. Abb. 11 und 12 zeigen NHDF Monokulturen nach 48 h, beziehungsweise 24 h Kultivierung. Dabei ist ihre typische langgestreckte Wachstumsmorphologie zu erkennen. Des Weiteren werden Unterschiede der EDA-Fn Expression, abhängig von der NHDF Lokalisation zur Wunde, deutlich.

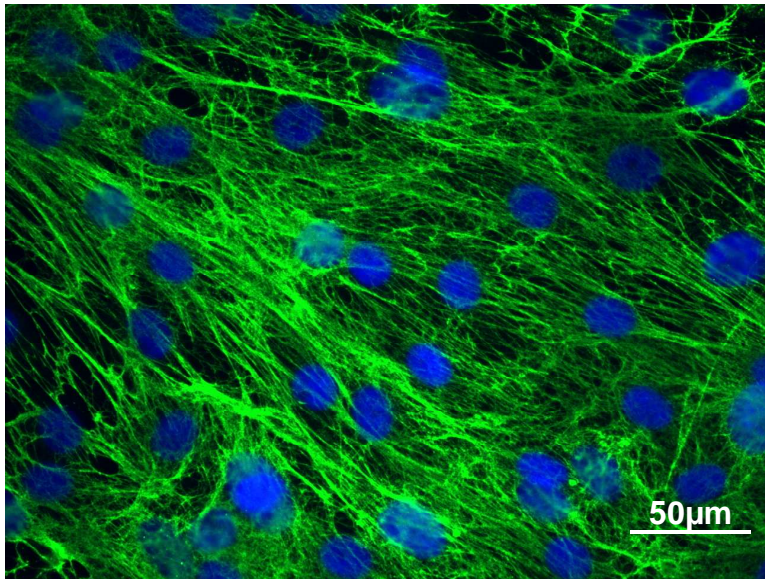


Abbildung 11:

Eine NHDF-Monokultur nach 48 h bei der EDA-Fn mittels eines grün (FITC)-fluoreszierenden Sekundärantikörpers dargestellt wird. Durch DAPI werden die Zellkerne blau dargestellt.

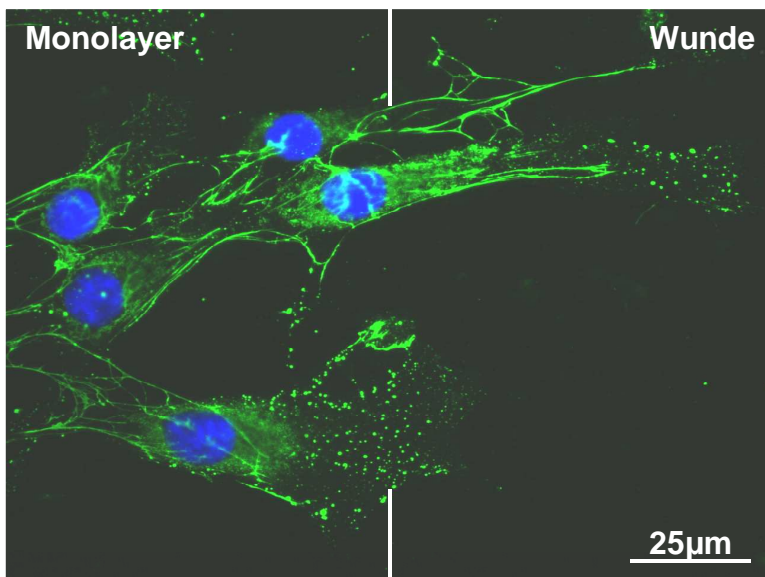


Abbildung 12:

Immunzytochemische Färbung einer NHDF Monokultur nach 24 h mit unterschiedlicher EDA-Fn Expression (grün) am Wundrand. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gegengefärbt. Die EDA-Fn Expression der zur Wunde gerichteten NHDF zeigt ein granuliertes Muster. Zum Monolayer gerichtet ist die EDA-Fn Expression regelmäßiger faserförmig.

Durch immunzytochemische Färbung gegen α -SMA wurden MF dargestellt. Mittels α -SMA-Färbung im Bereich 2 (Abb. 9 B) konnte die Differenzierung der NHDF zu MF bestimmt werden. Darüber hinaus war die Bestimmung der exakten Zahlenverhältnisse möglich. Abb. 13 zeigt Beispiele differenzierter und undifferenzierter NHDF und verdeutlicht die Abgrenzungsmöglichkeit der verschiedenen Zelltypen.

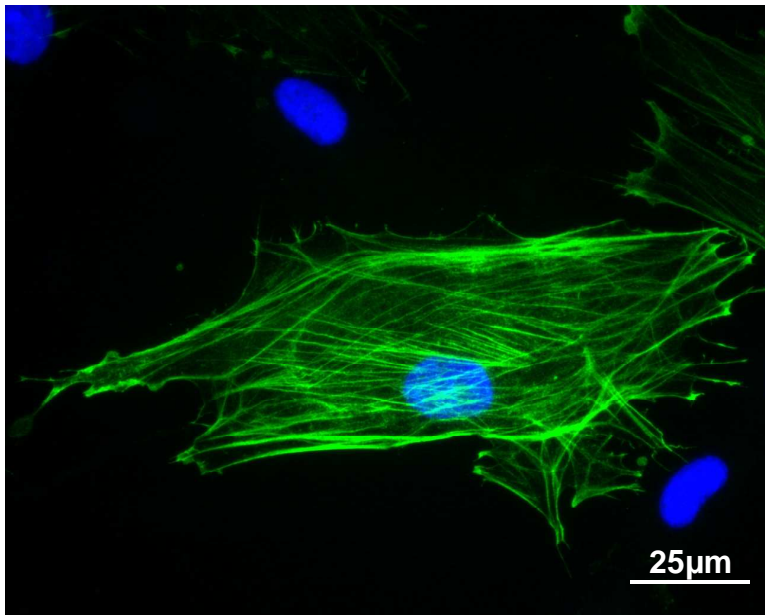


Abbildung 13:

Darstellung eines MF nach 0 h mittels α -SMA (grün), welches die Unterscheidung von undifferenzierten zu differenzierten NHDF ermöglicht. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gegengefärbt.

3.6.3 Verwendete Antikörper der Co-Kulturen

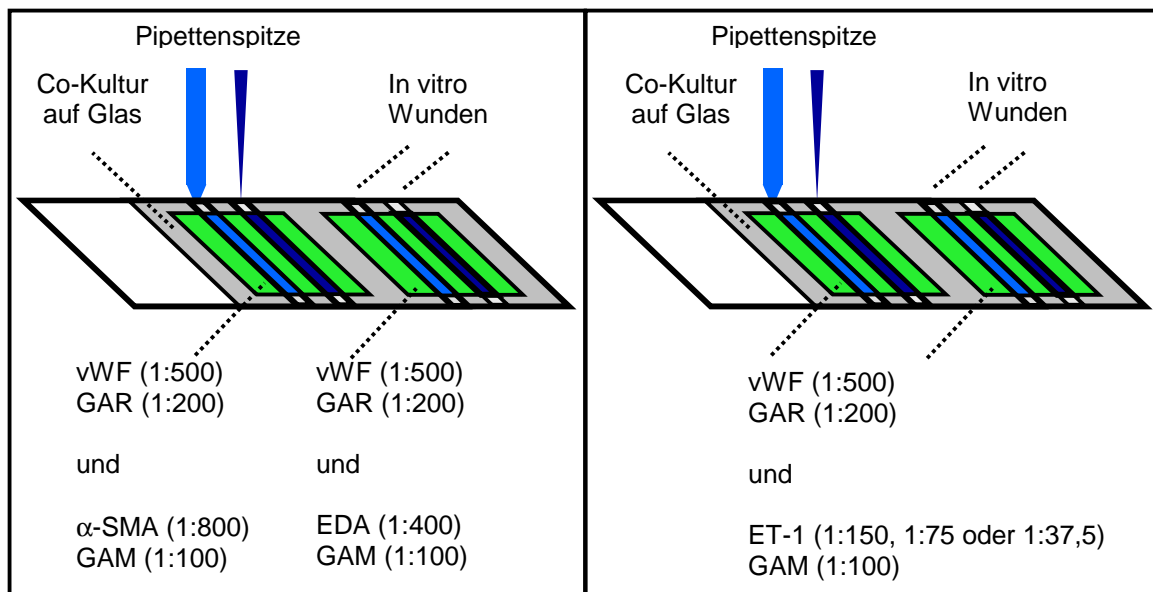


Abbildung 14 A und B:

Färbeschema der immunzytochemischen Färbung mit den verwendeten Antikörpern (und Verdünnungen).

A) Die erste Antikörperkombination (vWF/GAR) diente in beiden Bereichen zur Darstellung der HDMEC (rot). Die grüne Darstellung der MF in Bereich 1 und der NHDF in Bereich 2 mittels der zweiten Antikörperkombination (α -SMA/GAM) ermöglichte die Unterscheidung der Populationen. Des Weiteren konnte die Proliferation und auch die Migration in die in vitro Wunde beurteilt werden.

B) In beiden Bereichen wurden die HDMEC mit Hilfe der Antikörperkombination vWF/GAR rot dargestellt. Darüber hinaus ermöglichte die ET-1/GAM-Kombination die grüne Darstellung der ET-1 Expression in den HDMEC.

Die Co-Kulturen wurden wie in Abb. 14 A dargestellt gefärbt, dafür wurden zwei Färbebereiche genutzt.

Im Falle der in Abb. 14 B dargestellten Kombination wurde ein Mausprimärantikörper, der gegen ET-1 gerichtet war, verwendet. Zur Detektion dieses ersten Antikörpers diente der Sekundärantikörper GAM FITC. Da ET-1 von vielen verschiedenen Zellen gebildet und freigesetzt wird, war es das Ziel herauszufinden, welche Zellen der Co-Kultur ET-1 exprimieren. Vor der ersten Antikörpergabe wurde im Falle der Endothelinkombination ein sogenanntes Blocking durchgeführt. Dafür gab man jeweils 25 μ l PBS/0,1% BSA auf die Färbereiche und inkubierte 45 min. Zusätzlich wurde noch eine Negativkontrolle

angefertigt. Das bedeutet, eine Kultur wurde den gleichen Bedingungen ausgesetzt, mit dem Unterschied, dass ihr kein Primärantikörper zugefügt wurde, sondern anstelle dessen PBS/0,1% BSA.

Die Simultanfärbung der NHDF- und HDMEC-Co-Kulturen mit vWF und α -SMA ermöglichte die Unterscheidung zwischen HDMEC und MF. Dadurch konnten exakte Zahlenverhältnisse und auch die Lokalisation der Zellen zueinander ermittelt werden. Dabei wurde insbesondere auf die Lage der MF zu den HDMEC geachtet. Abb. 15 zeigt ein Beispiel einer solchen Simultanfärbung.

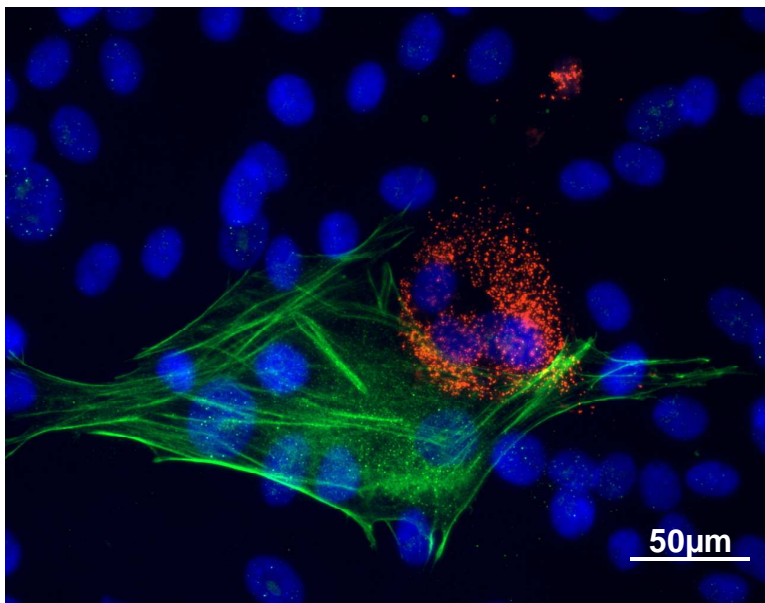


Abbildung 15:

HDMEC (vWF/rot) und MF (α -SMA/grün) nach 24 h.

Die Zellkerne sind mit DAPI blau gegengefärbt.

Die Simultanfärbung der Co-Kulturen mit vWF und EDA-Fn ermöglichte die Unterscheidung der HDMEC von den NHDF. Dadurch konnten exakte Zahlenverhältnisse und insbesondere die Proliferation der unterschiedlichen Zellpopulationen nach 24h und 48h bestimmt werden. Abb. 16 zeigt ein Beispiel einer solchen Simultanfärbung.

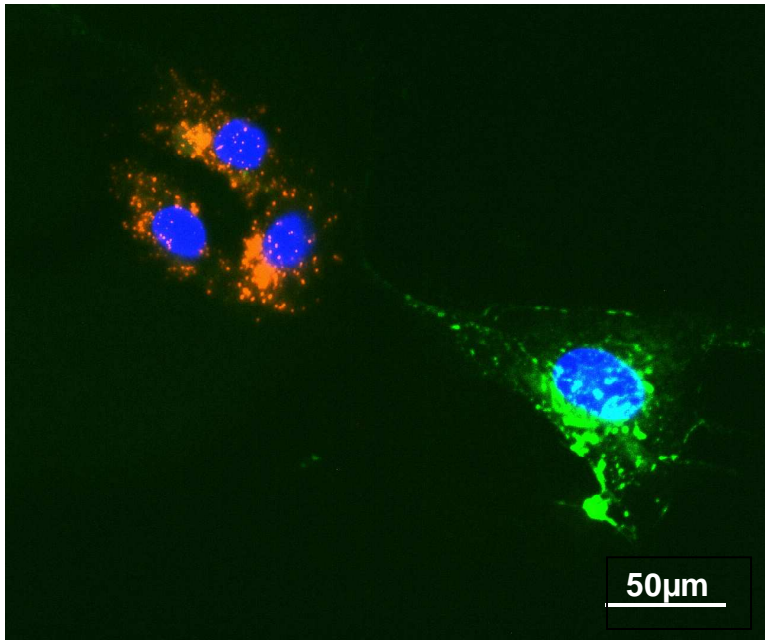


Abbildung 16:

Co-Kultur nach 0 h: HDMEC (vWF/rot) links und NHDF (EDA-Fn/grün) rechts im Bild. Durch DAPI werden die Zellkerne blau dargestellt.

Diese Simultanfärbung (Abb. 14 B) diente zur Darstellung der Zellen, die ET-1 exprimieren. Die zusätzliche Darstellung der HDMEC mittels vWF diente zur Unterscheidung der Zellen. Dadurch konnte der Anteil der ET-1-exprimierenden HDMEC ermittelt werden. Die NHDF der Co-Kulturen konnten dadurch identifiziert werden, dass sie außer der blau-fluoreszierenden Farbreaktion durch die Interkalation von DAPI mit der Kern-DNA keine weitere Farbreaktion aufwiesen (Abb. 17 und 18).

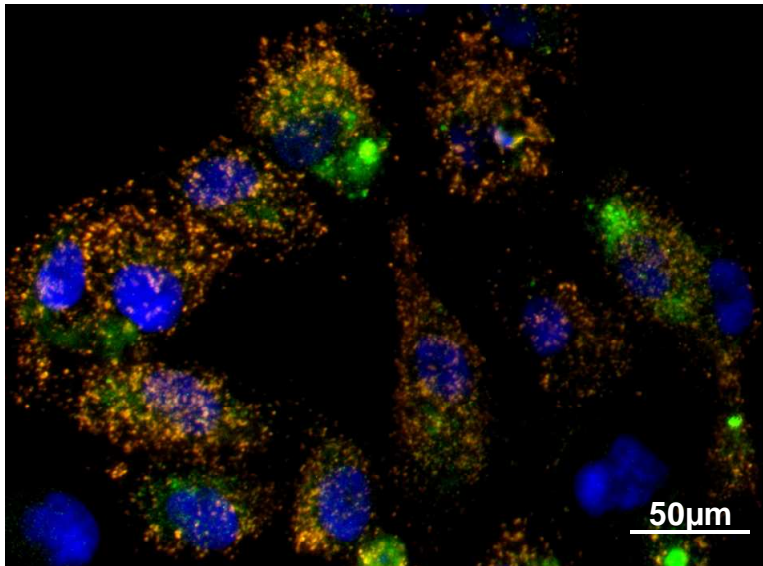


Abbildung 17:

Simultanfärbung nach 24 h: HDMEC (vWF/rot) und ET-1 (grün). Die NHDF sind nur durch die blaue DAPI Darstellung der Zellkerne zu erkennen. ET-1 ist ausschließlich bei den HDMEC zu sehen.

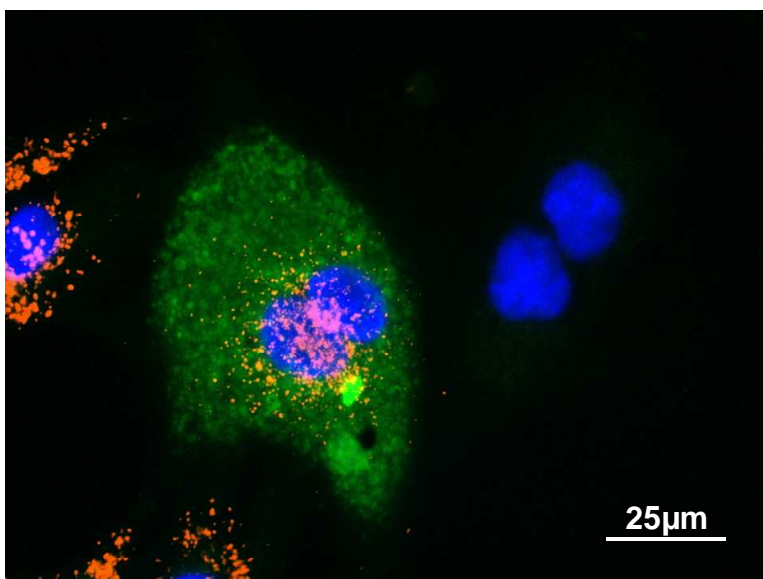


Abbildung 18:

Doppelkernige HDMEC (vWF/rot) mit ET-1-Expression (grün) (Bildmitte), HDMEC ohne ET-1- Expression (links) und NHDF (DAPI/blau) ohne ET-1-Expression (rechts) nach 24 h.

3.7 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

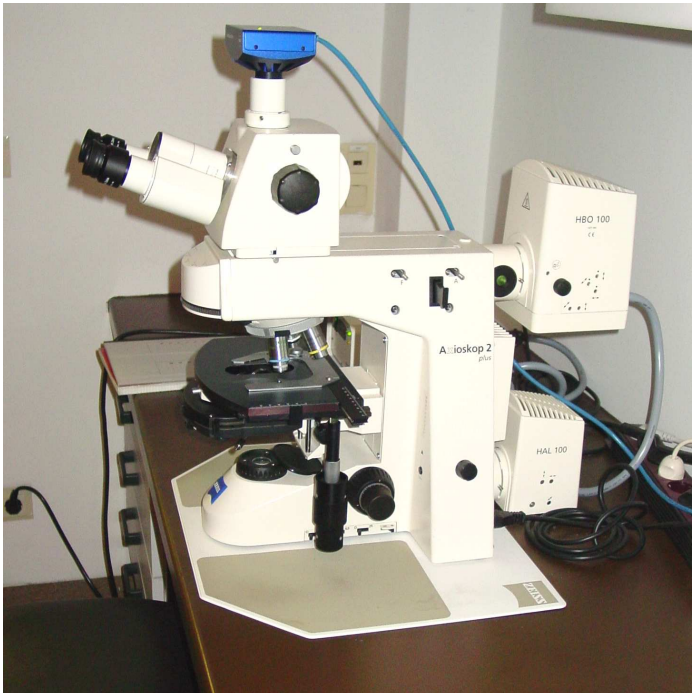


Abbildung 19:
Arbeitsplatz mit Epifluoreszenzmikroskop Axioskop 2 Plus (Zeiss).

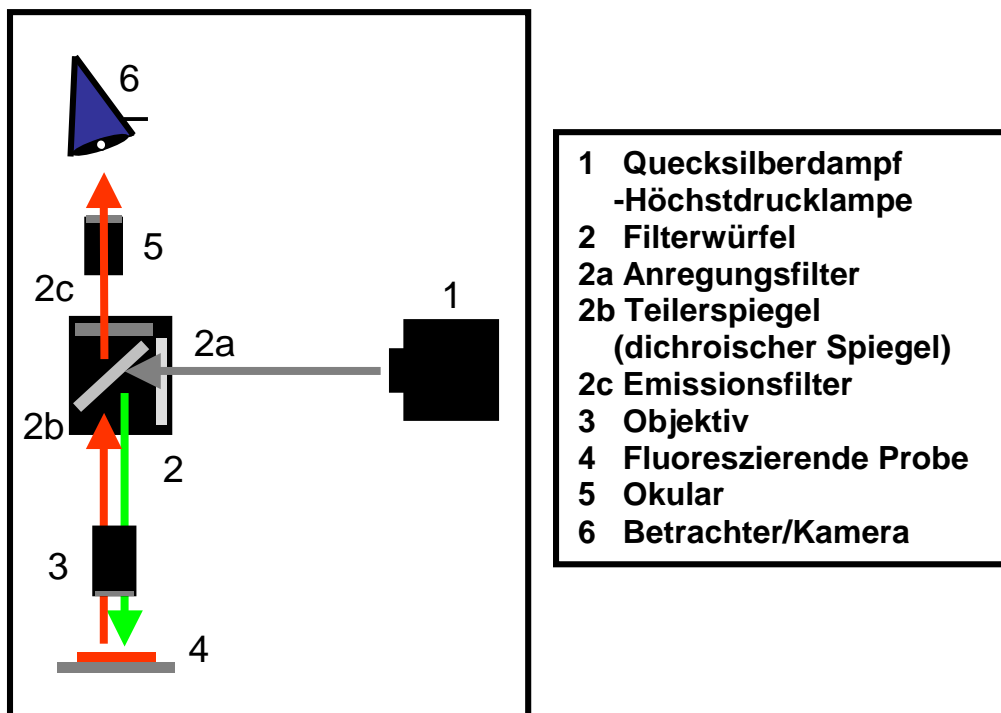


Abbildung 20:
Schematische Darstellung eines Fluoreszenzmikroskopes mit Erklärung der einzelnen Bestandteile und des Strahlenganges.

3.7.1 Aufbau des Fluoreszenzmikroskopes

Zur Auswertung wurde ein Axioskop 2 plus (Zeiss) benutzt (Abb. 19 und 20). Die Lichtquelle des Mikroskops ist eine Quecksilberhöchstdrucklampe (Abb. 20/1). Zuerst trifft der Lichtstrahl auf einen Anregungsfilter (Abb. 20/2a), anschließend auf einen dichroischen Teilerspiegel (Abb. 20/2b), der den Strahl um 90° ablenkt. Nachdem das Licht durch das Objektiv (Abb. 20/3) auf die fluoreszierende Probe trifft, werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch den Lichtstrahl angeregt und es kommt zur Lichtemission. Danach geht der Lichtstrahl durch den dichroischen Spiegel. Dieser hat die Funktion eines Filters, er reflektiert kurzwelliges Licht und lässt nur das langwellige Emissionslicht durch.

Dichroischer Spiegel, Emissionsfilter und Anregungsfilter (Abb. 20/2b, 2c und 2a) sind zusammen in einem Filterwürfel verbaut. Filterwürfel sind jeweils spezifisch für einen bestimmten Anregungs- oder Emissionswellenbereich eines Fluoreszenzfarbstoffes.

Bevor der Betrachter (Abb. 20/6) das Bild sehen kann wird, es im Okular (Abb.20/5) zehnfach vergrößert. Bei Bedarf kann eine Kamera, AxioCam, angeschlossen werden, so dass das Bild auf das Bildverarbeitungsprogramm AxioVision des Computers übertragen werden kann.

3.7.2 Auswertung

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops wurde jeder Objektträger nach einem standardisierten Schema ausgewertet. Zuerst wurde unter 400facher Vergrößerung die Gesamtzellzahl (GZ) bestimmt, dabei wurden je 20 Gesichtsfelder ausgezählt. Die Zellzahl wurde je Gesichtsfeld und in mm² ausgedrückt. Anschließend wurde sie auf den gesamten Objektträger (1976mm²) hochgerechnet.

Des Weiteren wurde die Anzahl der HDMEC, der NHDF und der MF ermittelt. Es wurde darüber hinaus der prozentuale Anteil der einzelnen Zelltypen ausgerechnet. Da sich nur HDMEC und NHDF auf den Objektträgern befanden, wurde die NHDF-Zellzahl rechnerisch als Differenz der GZ zur HDMEC-Zellzahl

bestimmt. Der Anteil der MF an der GZ wurde ebenfalls ausgezählt. Außerdem wurde darauf geachtet, ob die MF Kontakt zu HDMEC haben oder nicht.

Darüber hinaus wurde die Anzahl der HDMEC und der NHDF in den in vitro Wunden bestimmt.

Die Vermessung der Wundbreite wurde mit Hilfe des Computerprogramms AxioVision vorgenommen. Dabei wurden vom oberen Objektträgerrand ausgehend die ersten zwei Gesichtsfelder ausgelassen. Von den folgenden zehn Feldern in vertikaler Richtung wurden je unter 100facher Vergrößerung Bilder gemacht, so dass diese mitsamt einer Skalierung auf dem Computerbildschirm erschienen. Vermessen wurde der Abstand derjenigen Zellkerne, die am weitesten entfernt auf der Linie der horizontalen 300 µm-Skalierung lagen (Abb. 21).

Aus zehn Einzelwerten wurde dann der Mittelwert bestimmt.

Ferner wurde die prozentuale Abnahme der Spaltbreite der in vitro Wunden aus den absoluten Werten errechnet.

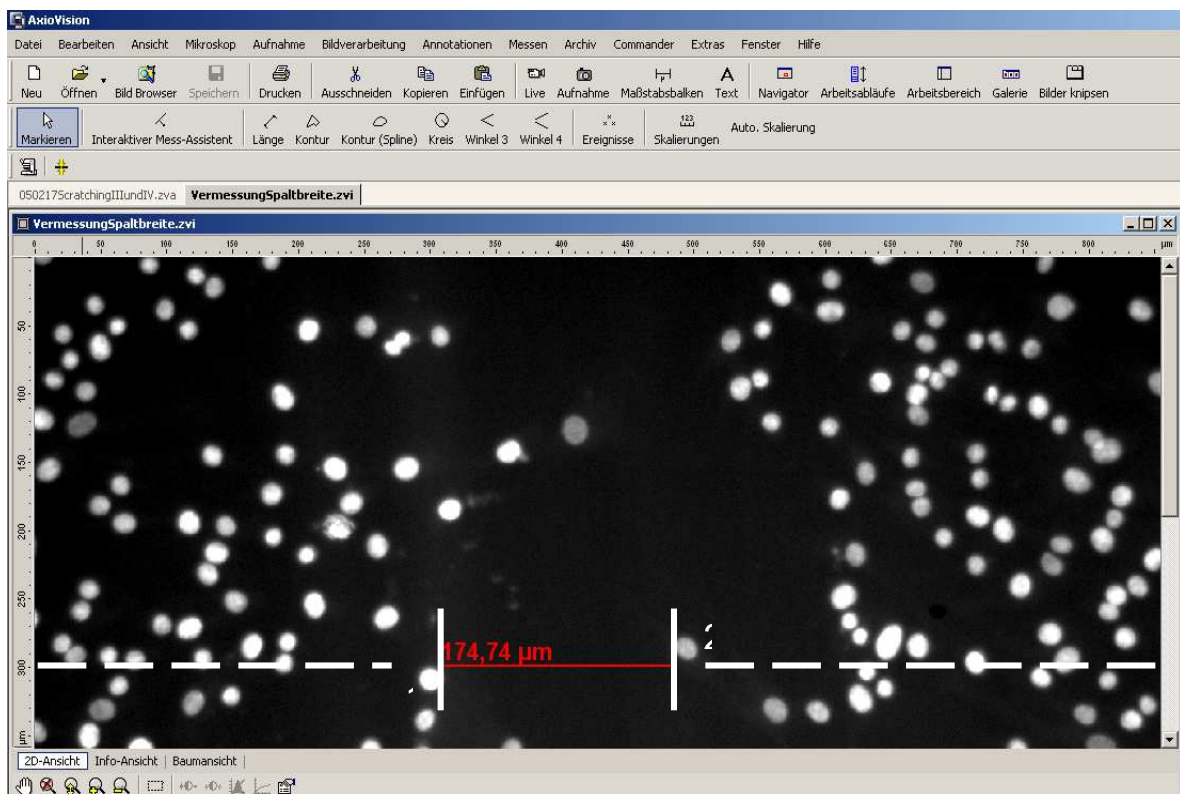


Abbildung 21:

Screenshot der Spaltvermessung mittels des Computerprogramms AxioVision: die Breite der in vitro Wunde beträgt hier 174,74 µm.

3.8 ELISA

3.8.1 Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Mittels des ELISA können spezifische Antigene, Antikörper und Haptene quantitativ nachgewiesen werden. Bei der sogenannten Sandwich-Technik, bei der zwei Antikörper verwendet werden, ist ein Antikörper an eine feste Phase (meist eine spezielle Mikrotiterplatte) gebunden. Das zu untersuchende Material mit unbekannter Antigenkonzentration wird hinzugefügt.

Im ersten Inkubationsschritt bindet das Antigen an diesen, im Überschuss vorliegenden, Antikörper. Nach Auswaschen des Überstandes wird in einem weiteren Inkubationsschritt ein zweiter Enzym-markierter-Antikörper hinzugegeben. Dieser ist gegen ein weiteres Epitop des Antigens gerichtet. Es entsteht ein Sandwichkomplex, der das Antigen von beiden Seiten umschließt.

Die enzymatische Aktivität kann im Probensatz durch Zugabe eines chromogenen Substrates bestimmt werden. Das Substrat führt zu einer Farbreaktion, die mittels Photometer gemessen werden kann. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu den Konzentrationen des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

3.8.2 ELISA zur Quantifizierung von ET-1

Mittels ELISA wurde die Konzentration des ET-1 im Medium bestimmt. So konnten Konzentrationsunterschiede zwischen Kontroll-, Hypoxie- und TGF- β_1 -Kulturen ermittelt werden.

Hierfür wurde ein Human Endothelin-1 TiterZyme Enzyme Immunometric Assay (EIA; Firma Assay Designs, Michigan, USA) verwendet. In diesem Assay wurden Standards, Kontrollen und Proben in einer 96-well Mikrotiterplatte inkubiert. Diese waren mit einem Kaninchenantikörper, der gegen menschliches ET-1 gerichtet war, beschichtet. Die Negativkontrolle und acht Standards dienten zur Erstellung der Eichkurve. In die Kammern wurden jeweils 100 μ l Medium der verschiedenen Kulturen gegeben (siehe 3.3). Nach dem Inkubieren und Waschen wurde ein

zweiter, an Meerrettichperoxidase gekoppelter, Kaninchenantikörper gegen ET-1 zugegeben. Nach der zweiten Inkubation und einem weiteren Waschschrift wurde die Mikrotiterplatte mit Tetramethylbenzidin inkubiert. Dies diente als Substrat, dessen Umsatz photometrisch bei 450 nm detektiert werden konnte.

Durch Zugabe von jeweils 100 µl Schwefelsäure wurde die Farbreaktion gestoppt und die Absorption durch Wellenlängenmessung bei 450 nm bestimmt. Die Extinktion der entstehenden Farblösung ist proportional zur ET-1 Konzentration im Medium.

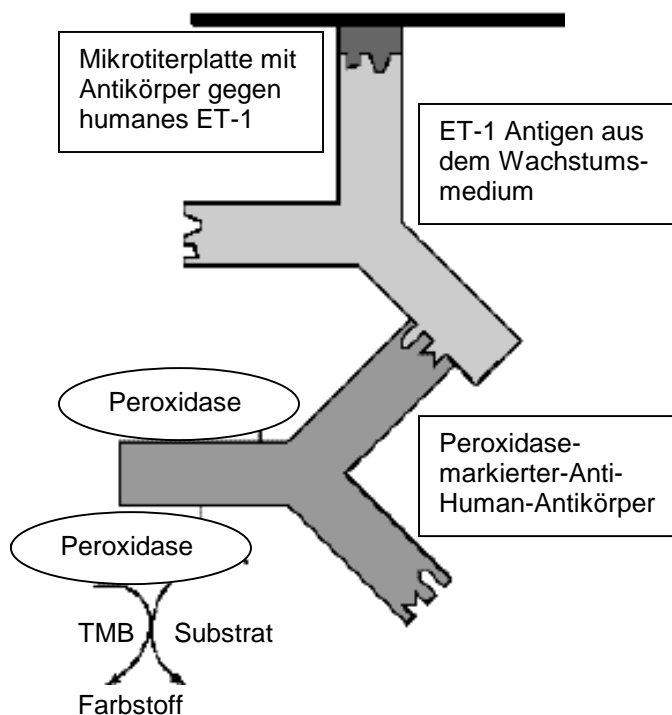


Abbildung 22:

Prinzip des ELISA mit Darstellung der verschiedenen Antikörper.

Quelle: Euroimmun.de

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung bezog sich auf die Unterschiede der Zellzahl und der Breite der in vitro Wunden zwischen den Normoxie- und Hypoxiegruppen und auf die Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne TGF- β_1 -Zusatz. Die Unterschiede der Mittelwerte der Gruppen wurden mittels ANOVA (Varianzanalyse) und anschließender post-hoc-Analyse, die die Bonferroni-Korrektur des α -Fehlers beinhaltet, auf Signifikanz überprüft.

Alle Ergebnisse wurden als arithmetische Mittel mit Standardabweichung dargestellt. Die Ergebnisse wurden bei $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3.10 Geräte

Die zur Durchführung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente benötigten Geräte sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Auflistung der benutzten Geräte und der Hersteller.

Gerät	Hersteller
Axiovert 2 Plus	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Axiovert 25	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau (D)
Brutschrank Typ B12	Heraeus, Hanau (D)
CASY Zellzählsystem, Modell TT, Ser. No. TT-2EC-1196	Schärfesystem GmbH, Reutlingen (D)
Celloshaker Variospeed Variotime	Renner GmbH, Darmstadt (D)
Einfrierkammer, Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Cat. No. 5100-0001	NALGENE, New York (USA)
ELISA: Titertek Mutiskan MCC/340 MKII Serial RS 232-C	Labsystems, Helsinki (FIN)
Eppendorf Research Pipetten 0,5 -10µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Research Pipetten 10 –100µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Research Pipetten 100 -1000µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Photometer: Titertek Multiskan MCC/340 Typ 347 Serial 3470 134018	Labsystems, Helsinki (FIN)
Pipettus-Akku Hirschmann Laboratories	Hirschmann GmbH, Eberstadt (D)
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau (D)
Wasserbad TWB12	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach (D)
Zentrifuge Hermle Z400K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen (D)

3.11 Materialien

Die zur Durchführung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente benötigten Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Auflistung der benutzten Verbrauchsmaterialien und der Hersteller.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Endothelzell-Kultivierung	
Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMEC), Cat. No. C-12210	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Endothelial Cell Growth Medium MV, Cat. No. C-22022	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
SupplementMix Endothelial Cell Growth Medium MV, Cat. No. C-39225	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Fibroblasten-Kultivierung	
Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF), Cat. No. C-12300	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Quantum 333 for Fibroblasts, Cat. No. U15-813	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Primärantikörper [anti human]	
Anti-Fibronectin Mouse Monoclonal, ab6328	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen (D)
Factor VIII Related Antigen/von Willebrand Factor Ab-1, Rabbit Polyclonal Antibody, Cat. No. 12880	dianova GmbH, Hamburg (D)
Monoclonal Anti- α Smooth Muscle Actin, Product No. A 2547	SIGMA, Saint Louis (USA)
Monoclonal Antibody to Endothelin-1, Lot 027-123	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen (D)
Sekundärantikörper	
Cy3-conjugated AffiniPure F(ab) ₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG, Code No. 111-166-045	dianova GmbH, Hamburg (D)
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Code No. 115-095-003	dianova GmbH, Hamburg (D)

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
ELISA	
Human Endothelin-1 Microtiter Plate, one plate of 96 Wells, Catalog No. 80-0215	Assay Designs, Michigan (USA)
Human Endothelin-1 Labeled Antibody Concentrate, 0,4 ml, Catalog No. 80-1371	Assay Designs, Michigan (USA)
Assay Buffer, 30 ml, Catalog No. 80-0170	Assay Designs, Michigan (USA)
Labeled Antibody Diluent, 12 ml, Catalog No. 80-0182	Assay Designs, Michigan (USA)
Wash Buffer Concentrate, 50 ml, Catalog No. 80-0171	Assay Designs, Michigan (USA)
Human Endothelin-1 Standard, 2 each, Catalog No. 80-0217	Assay Designs, Michigan (USA)
TMB Substrate, 15 ml, Catalog No. 80-1342	Assay Designs, Michigan (USA)
Stop Solution, 12 ml, Catalog No. 80-0176	Assay Designs, Michigan (USA)
Human Endothelin-1 Assay Layout Sheet, 1 each, Catalog No. 30-0055	Assay Designs, Michigan (USA)
Plate Sealer, 2 each, Catalog No. 30-0012	Assay Designs, Michigan (USA)
Aqua dest., Reinwasseranlage Arium 661	Sartorius AG, Göttingen (D)
Deckgläser 24x50 mm, Cat. No. 631-0146	VWR international, Darmstadt (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe (D)
Einmal-Pasteurpipette 1ml Kontrollnr. 10021141	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Ethanol min. 99,9% Vol., Sorte 642	Berkel, Ludwigshafen (D)
Gas, zertifiziertes 95% N ₂ , 5% CO ₂	Messer, Griesheim (D)
Glycerol, Kat. Nr. 3783.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Isopropanol, 70%	Berkel, Ludwigshafen (D)
Kulturflasche groß, steril, 75cm ² , 250ml, Cat. No. 658 170	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Kulturflasche klein, steril, 25cm ² , 50ml, Cat. No. 680 160	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Küvetten aus Glas, Kat. Nr. H 550.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Kryoröhrchen PP mit Schraubverschluss, steril Revision 01-840576	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Methanol, Kat. Nr. 4627.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid), Catalog No. H-1200	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Objektträger 76x26 mm, geschnitten mit Mattrand	Menzel-Gläser, Braunschweig (D)
PBS Phosphate Buffered Saline, Tablets, No. BR0014G	Oxoid Limited, Hampshire, (GB)
5ml Greiner Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
10ml Greiner Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
25ml Greiner Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg (D)
QuadriPERM: steril, Cat. No. 96077308,	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Reagenzröhrchen steril, PP-Test tubes, 50ml, Cat. No. 227261	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Eppendorf 1,5ml Reaktionsgefäße, Polypropylen	Eppendorf, Hamburg (D)
Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), 5 μ g	Promokine, Heidelberg (D)
Trypsin EDTA, UV-inaktiviert (1:250), 1-fach Konzentrat Kat. Nr. L11-660	PAA Laboratories GmbH, Cölbe (D)

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Tween 20, Art. Nr. 91272	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)

3.11.1 Vorbereitung der Objektträger für die Zellkultur

Die verwendeten Objektträger wurden vor Gebrauch einer besonderen Waschung unterzogen. Bei dieser wurden je 18 Objektträger in eine Glasschaukel gesetzt. Je fünf dieser Glasschaukeln passten in ein Becherglas mit 2 l Volumen. Über Nacht wurde Wasser und Glasreinigungsseife zu den Objektträgern gegeben. Am darauffolgenden Morgen erfolgte eine zweistündige Wässerung mit fließendem Leitungswasser. Danach wurden die Objektträger für 1 h mit 1% HCl versetzt.

Diesem schloss sich eine erneute einstündige fließende Wässerung an. Für eine weitere Stunde wurden die Objektträger mit 1% NaOH behandelt. Auch diesem Schritt folgte eine fließende Wässerung, in diesem Fall jedoch für 2 h. Im Anschluss erfolgte erst eine Spülung der Objektträger mit destilliertem Wasser, danach eine weitere Spülung mit 96% Ethanol.

Anschließend trockneten die Objektträger im Trockenschrank. Nachdem die Glasschaukeln in Alufolie eingepackt worden waren, wurden sie bei 200°C 2 h lang sterilisiert.

3.12 Lösungen

Die zur Durchführung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente benötigten Verbrauchslösungen mit ihren Mischungsverhältnissen sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Ansatz der Lösungen mit Verdünnungen und Mischungsverhältnissen.

Verbrauchslösungen
<p>Einfriermedium: 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde in 19 ml Endothelzellmedium gegeben. Dieses wurde in 20 Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20°C eingefroren.</p>
<p>ET-1 Antikörper Verdünnungslösung: Waschpuffer wurde mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:40 verdünnt. ET-1 Antikörper wurde zur Antikörper-Verdünnungslösung gegeben, so dass er im Verhältnis 1:30 vorlag.</p>
<p>Endothelzellmedium: 500 ml Endothelzellmedium wurde jeweils 27,3 ml EndothelzellSupplementMix zugefügt.</p>
<p>TGF-β_1: 5 μg wurden in 100 μg 4mM HCl steril filtriert. Diese Stammlösung ($c=50 \mu\text{g/ml}$) wurde bei -20°C eingefroren. Für die Vorverdünnung wurde 1 μl der Stammlösung mit 19 μl sterilem PBS gemischt. Von dieser Vorverdünnung ($c=2,5 \mu\text{g/ml}$) wurden jeweils 2 μl zu 5 ml Medium gegeben, so dass die Gebrauchskonzentration ($c=1 \text{ ng/ml}$) erreicht war.</p>

4. Ergebnisse

4.1 Wachstumsmorphologie in den Co-Kultur

Cluster

Die Interaktion von HDMEC und MF am Rande der in vitro Wunde führte zur Ausbildung von Clustern. Diese wurden aus einem Kern von HDMEC und MF in der Peripherie gebildet. Abb. 23 zeigt ein Beispiel eines solchen Clusters, in Abb. 24 A und B kann man die zeitliche Entwicklung erkennen. Nach 24 h waren bei ca. 80% der Kulturen Cluster zu finden.

Weder eine längere Kultivierungsdauer, Hypoxie oder TGF- β_1 -Zusatz, noch die Kombination führte zur verstärkten Bildung von Clustern. In den Mono-Kulturen konnte unter den gleichen Einflussgrößen die Ausbildung von Clustern allerdings nie beobachtet werden.

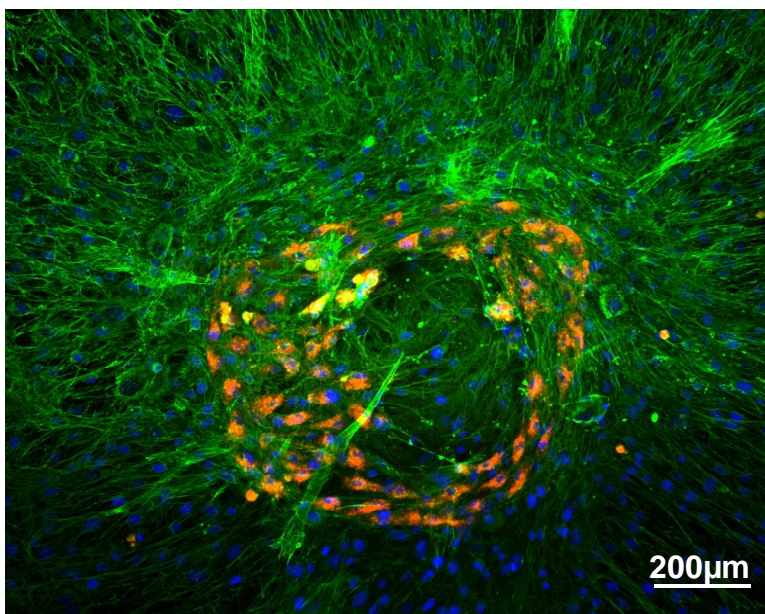


Abbildung 23:

Interaktion von HDMEC (vWF/rot) und MF (α -SMA/grün) am Wundrand, die zur Bildung von Clustern führten. Die Zellkerne sind mit DAPI blau gegengefärbt.

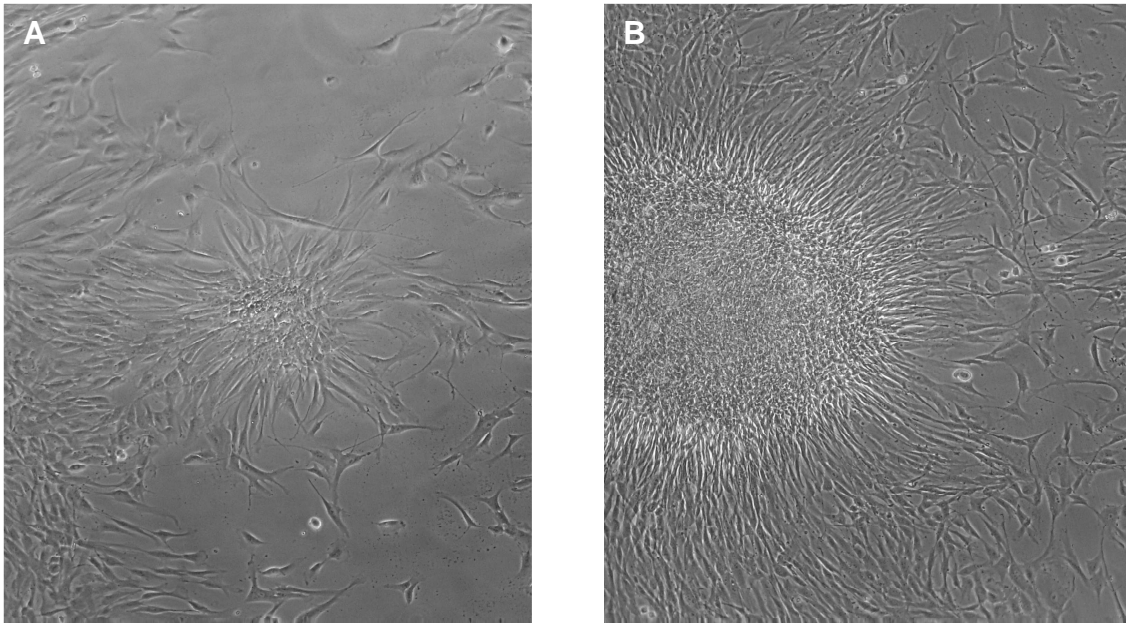


Abbildung 24:

Co-Kultur mit Clusterbildung am Wundrand nach 24h (A) und 48h (B).

4.2 In vitro Wunden

Abb. 25 A bis C zeigen Beispiele der in vitro Wunden der NHDF-HDMEC-Co-Kulturen zum Zeitpunkt 0 h und die Spaltbreitenabnahme nach 24 h und 48 h. Die genauen Unterschiede der verschiedenen Einflussgrößen (Normoxie, Hypoxie und TGF- β_1) sind den Diagrammen 4.3 zu entnehmen.

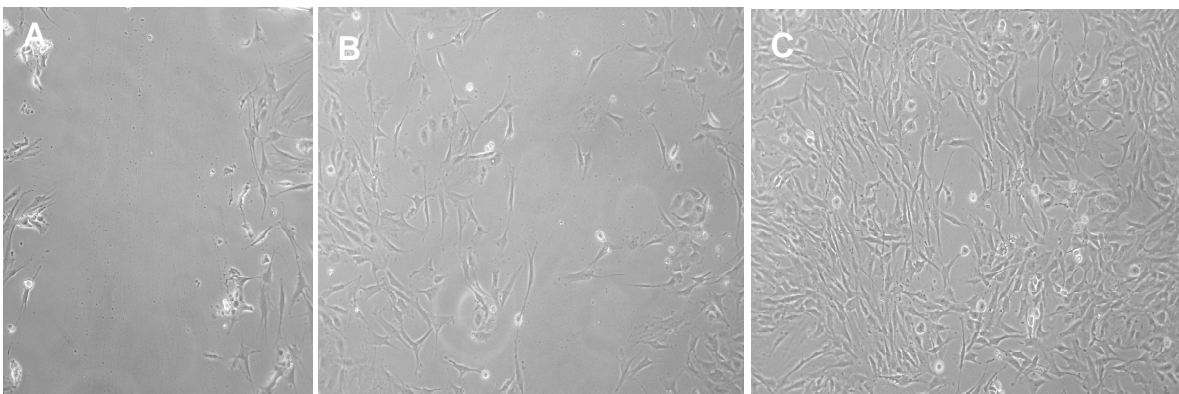


Abbildung 25:

Co-Kulturen mit in vitro Wunden zum Zeitpunkt 0 h (A), nach 24 h (B) und nach 48 h (C).

4.2 Mono-Kulturen

4.2.1 Normoxie

4.2.1.1 Populationen

Die NHDF- und HDMEC-Mono-Kulturen (n=3) zeigten bereits unter Normoxie Unterschiede in der Proliferation. Von den Ausgangswerten mit jeweils ca. 180 Zellen pro mm² bei 0 h gab es sehr unterschiedliche Entwicklungen (Abb. 26). Dabei kam es bei den NHDF innerhalb von 24 h zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahl auf 614 pro mm² (Abb. 26 B). Nach 48 h war die Zellzahl signifikant auf 2041 Zellen pro mm² gestiegen.

Die HDMEC-Zellzahl lag nach 24 h bei 257 Zellen pro mm². Dieser Unterschied war im Gegensatz zur Zellzahl nach 48 h, die bei 286 Zellen pro mm² lag, signifikant (Abb. 26 A).

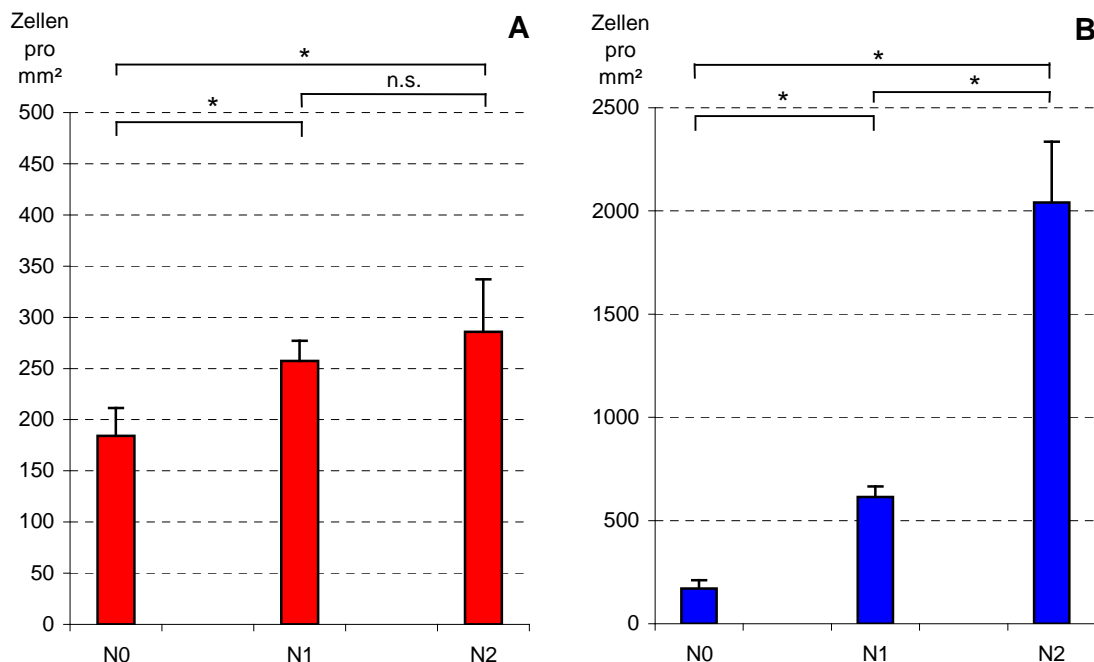


Abbildung 26: Proliferation der Mono-Kulturen

HDMEC- (A) und NHDF- (B) Mono-Kulturen und ihre Proliferation unter Normoxie nach 24 h und 48 h. Gezeigt ist der Mittelwert (n=3) der Zellzahl pro mm² mit Angabe der Standardabweichung. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. N1 entspricht der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N2 der Kultur nach 48 h unter Normoxie. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

4.2.1.2 In vitro Wunden

Die prozentuale Abnahme der Spaltbreite der in vitro Wunden zeigte Unterschiede zwischen den HDMEC- und NHDF- Mono-Kulturen (Abb. 27). Spalt A der HDMEC-Mono-Kultur nahm nach 24 h um 32% ab, bei Spalt B waren es 47%. Nach 48 h lagen die Werte bei 56% für Spalt A bzw. 63% für Spalt B.

Spalt A und B der NHDF-Mono-Kultur waren hingegen nach 48 h schon zu 100% verschlossen. Nach 24 h war Spalt A in diesem Fall um 71% verschlossen, bei Spalt B waren es 62%.

Die Absolutwerte der Spaltbreiten sind in Abb. 28 und 29 dargestellt.

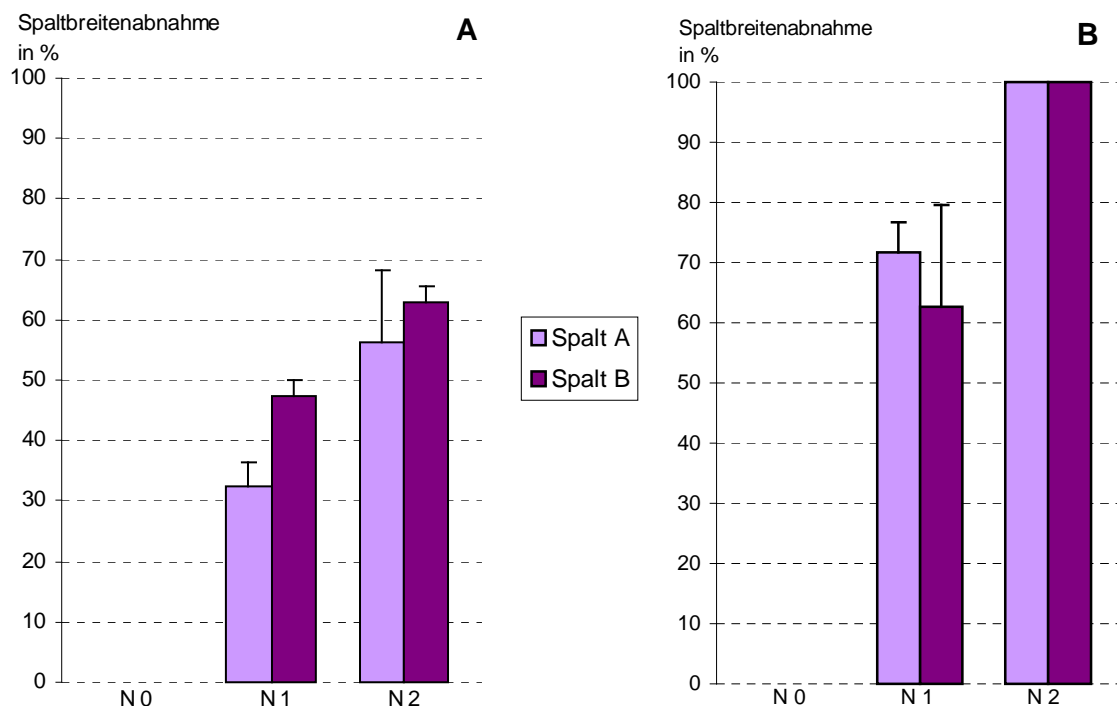


Abbildung 27: Spaltbreitenabnahme der Mono-Kulturen in %

Prozentuale Abnahme der Spaltbreite der in vitro Wunden nach 24 h und 48 h der HDMEC- (A) und NHDF- (B) Mono-Kulturen. Es ist jeweils der Mittelwert (n=3) von Spalt A und B mit Standardabweichung dargestellt. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. N1 entspricht der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N2 der Kultur nach 48 h unter Normoxie.

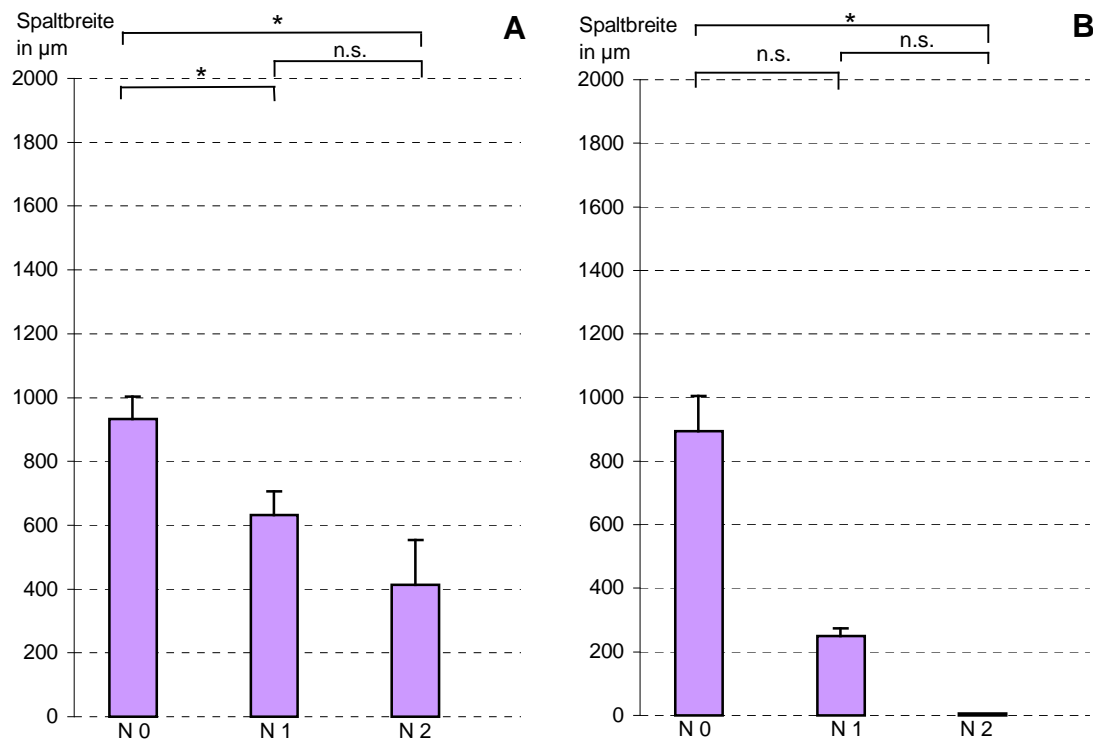


Abbildung 28: Absolute Spaltbreite von Spalt A in µm

Absolute Spaltbreite von Spalt A in µm nach 24 h und 48 h unter Normoxie. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=3$) mit Standardabweichung der HDMEC- (A) und NHDF- (B) Mono-Kulturen. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. N1 entspricht der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N2 der Kultur nach 48 h unter Normoxie. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Abb. 28 zeigt die Unterschiede der Spaltbreitenabnahme. So reduzierte sich die Breite des Spaltes A bei der NHDF-Mono-Kultur nach 24 h von 894 µm auf 250 µm. Nach 48 h war der Spalt durch die Zellmigration und -proliferation bereits komplett verschlossen.

Bei den HDMEC-Mono-Kulturen nahm die Spaltbreite innerhalb der ersten 24 h von 933 µm auf 631 µm ab (Abb. 28 A). Nach 48 h lag der Wert bei 414 µm. Diese geringere Spaltabnahme stimmt mit der geringeren Zunahme der HDMEC-Zellzahl, wie sie in 4.2.1.1 beschrieben wurde, im Vergleich zur NHDF-Mono-Kultur überein.

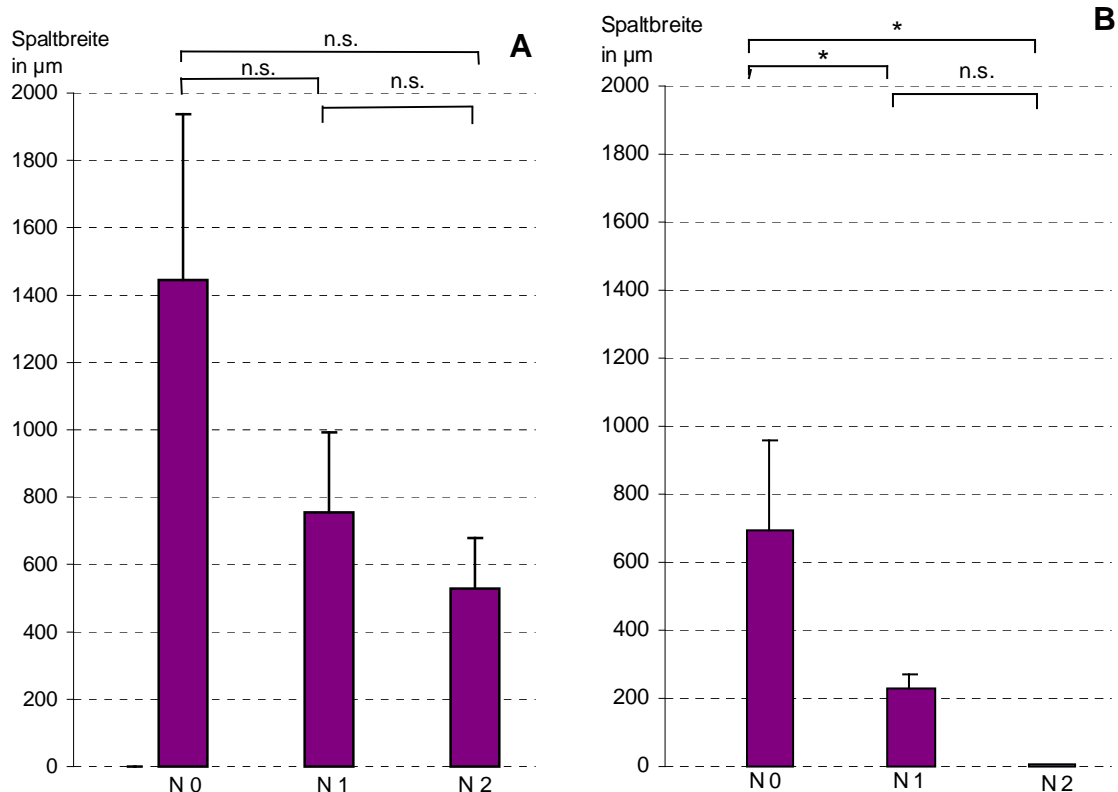


Abbildung 29: Absolute Spaltbreite von Spalt B in µm

Absolute Spaltbreite von Spalt B in µm nach 24 h und 48 h unter Normoxie. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=3$) mit Standardabweichung der HDMEC- (A) und NHDF- (B) Mono-Kulturen. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. N1 entspricht der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N2 der Kultur nach 48 h unter Normoxie. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Spalt B der Mono-Kulturen verhielt sich ähnlich wie Spalt A.

Die Spaltbreite nach 0 h betrug bei der HDMEC-Mono-Kultur 1444 µm. Bei den NHDF waren es nur 692 µm. Die NHDF haben eher die Tendenz, den Platz, der ihnen zur Verfügung steht, auszunutzen und breiteten sich daher in die in vitro Wunde aus. Nach 24 h betrug die Breite des Spaltes B bei der HDMEC-Mono-Kultur noch 754 µm bei der NHDF-Mono-Kultur waren es nur noch 228 µm. Auch Spalt B der NHDF war nach 48 h komplett verschlossen. Der Spalt B der HDMEC-Kultur hatte nach 48 h noch eine Breite von 528 µm.

4.2.2 Hypoxie

4.2.2.1 Populationen

Abb. 30 zeigt die Unterschied zwischen den Normoxie- und Hypoxiekulturen.

Die HDMEC-Mono-Kultur zeigte 140 Zellen pro mm² nach 24 h unter Hypoxie. Dies ist ein signifikanter Unterschied zur HDMEC-Mono-Kultur, die unter Normoxie kultiviert wurde. Bei dieser fanden sich nach 24 h 257 Zellen pro mm².

Auch die NHDF wurden durch Hypoxie in ihrer Proliferation gehemmt. 330 NHDF pro mm² waren nach 24 h Hypoxie vorhanden. Nach 24 h unter Normoxie waren es noch 614 NHDF pro mm².

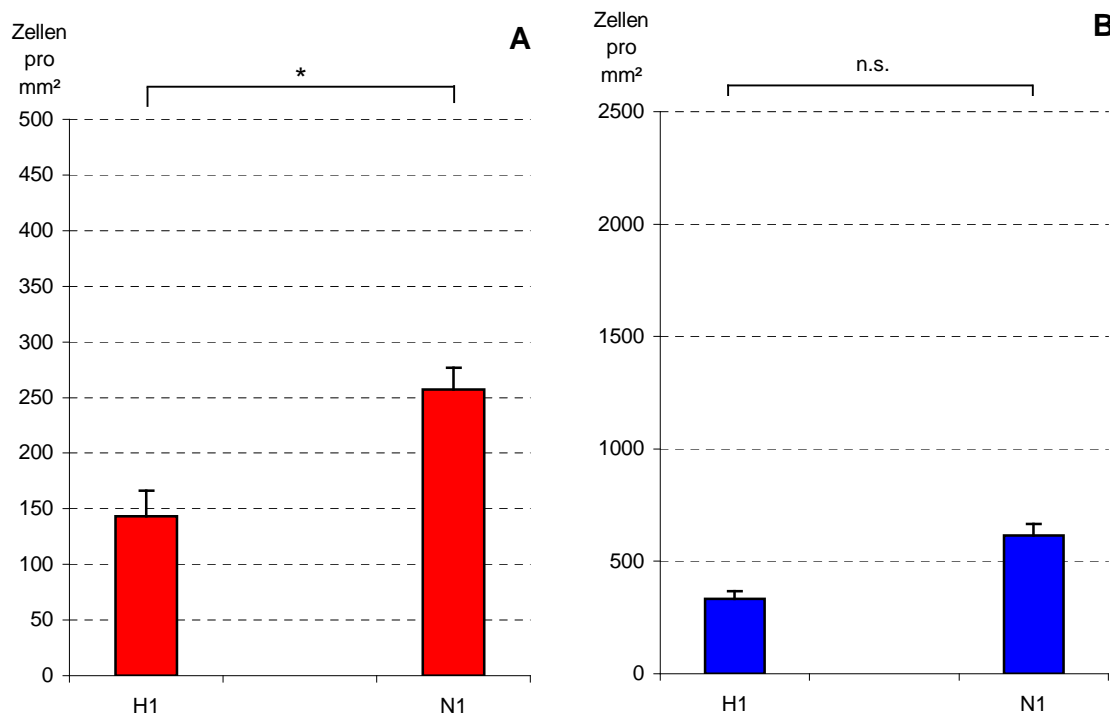


Abbildung 30: Vergleich der Proliferation der Hypoxie- und Normoxie-Mono-Kulturen

HDMEC- (A) und NHDF- (B) Mono-Kulturen und ihre Proliferation nach 24 h unter Normoxie oder Hypoxie. Gezeigt ist der Mittelwert (n=3) der Zellzahl pro mm² mit Angabe der Standardabweichung. Dabei steht H1 für die Kultur die 24 h Hypoxie ausgesetzt wurde und N1 entspricht der Kultur die 24 h unter Normoxie verweilte. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

4.2.2.2 In vitro Wunden

Unter Hypoxie nahm die Breite der in vitro Wunden nach 24 h deutlich weniger ab als unter Normoxie (Abb. 31). Bei den HDMEC-Mono-Kulturen gab es bei Spalt A nur 0,3% Abnahme unter Hypoxie im Gegensatz zu 32% Spaltbreitenverringering unter Normoxie. Bei Spalt B lagen die Werte bei 17% Spaltreduktion nach 24 h Hypoxie im Vergleich zu 47% unter Normoxie.

Bei den NHDF-Mono-Kulturen lagen die Unterschiede Spalt A betreffend bei 47% Abnahme unter Hypoxie zu 72% nach 24 h Normoxie. Spalt B wies auch in diesem Fall ähnliche Ergebnisse auf, nur 34% Spaltabnahme nach 24 h Hypoxie standen 63% unter Normoxie gegenüber.

Die genauen, absoluten Werte mit Angabe der Signifikanzen sind Abb. 32 und 33 zu entnehmen.

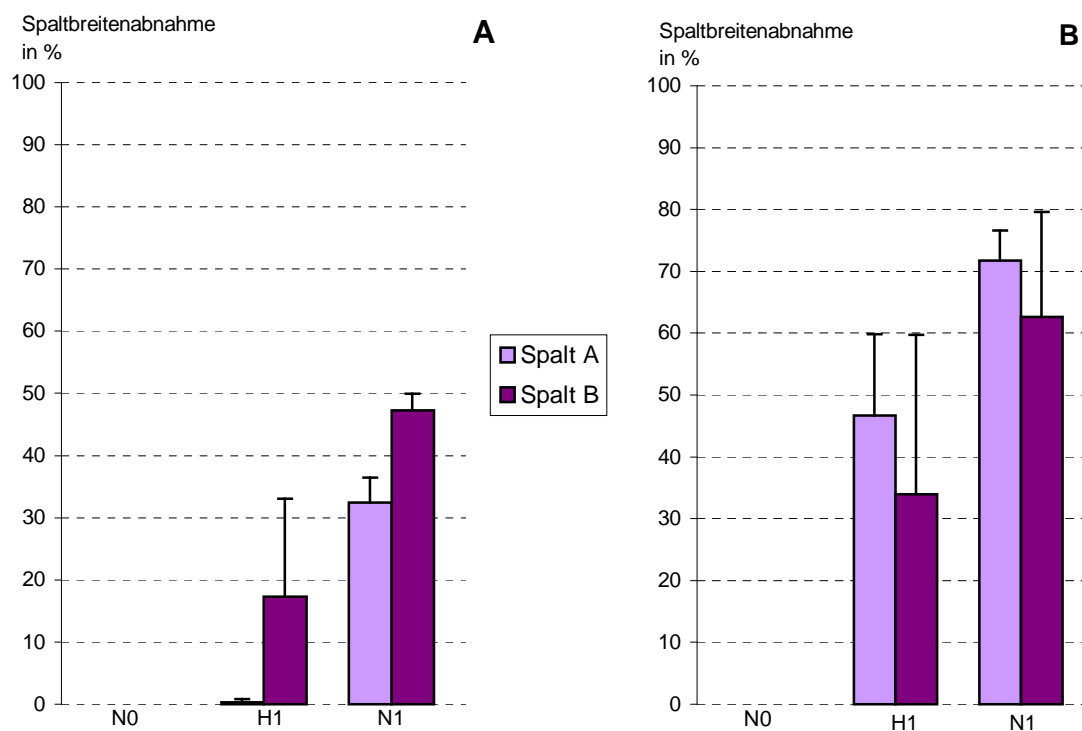


Abbildung 31: Spaltbreitenabnahme der Mono-Kulturen unter Hypoxie in %

Prozentuale Abnahme der Spaltbreite der in vitro Wunden der HDMEC- (A) und NHDF- (B) Mono-Kulturen nach 24 h unter Hypoxie oder Normoxie. Es ist jeweils der Mittelwert (n=3) von Spalt A und B mit Standardabweichung dargestellt. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. H1 entspricht der Kultur nach 24 h unter Hypoxie und N1 der Kultur nach 24 h unter Normoxie.

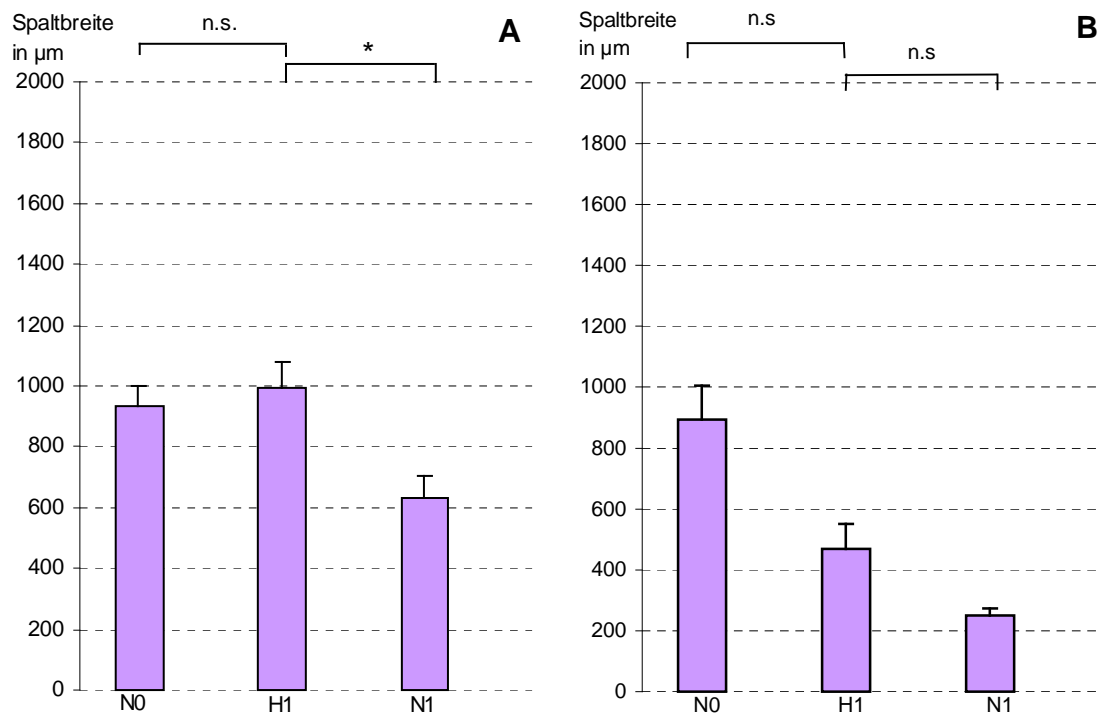


Abbildung 32: Absolute Spaltbreite von Spalt A unter Hypoxieeinfluss in µm

Absolute Spaltbreite von Spalt A in µm nach 0 h und nach 24 h unter Hypoxie oder Normoxie. Gezeigt ist der Mittelwert (n=3) mit Standardabweichung der HDMEC- (A) und NHDF- (B) Mono-Kulturen. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. H1 entspricht der Kultur nach 24 h unter Hypoxie und N1 der Kultur nach 24 h unter Normoxie. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Spalt A der HDMEC-Mono-Kultur zeigte nach 24 h unter Hypoxie eine leichte Zunahme der Spaltbreite von 933 µm bei 0 h auf 993 µm (Abb.32 A). Im Vergleich zur Normoxiekultur bei 24 h (631 µm) war ein signifikanter Unterschied der Breite der in vitro Wunden zu erkennen. Hypoxie verlangsamt somit die Migration der Zellen. Die HDMEC-Mono-Kultur ist davon stärker betroffen als die NHDF. Diese wies nach 0 h eine absolute Spaltbreite von 894 µm auf (Abb. 32 B). Nach 24 h unter Hypoxie waren es noch 470 µm und unter Normoxie noch 250 µm. Dieser Unterschied lässt eine Tendenz erkennen, ist allerdings nicht signifikant.

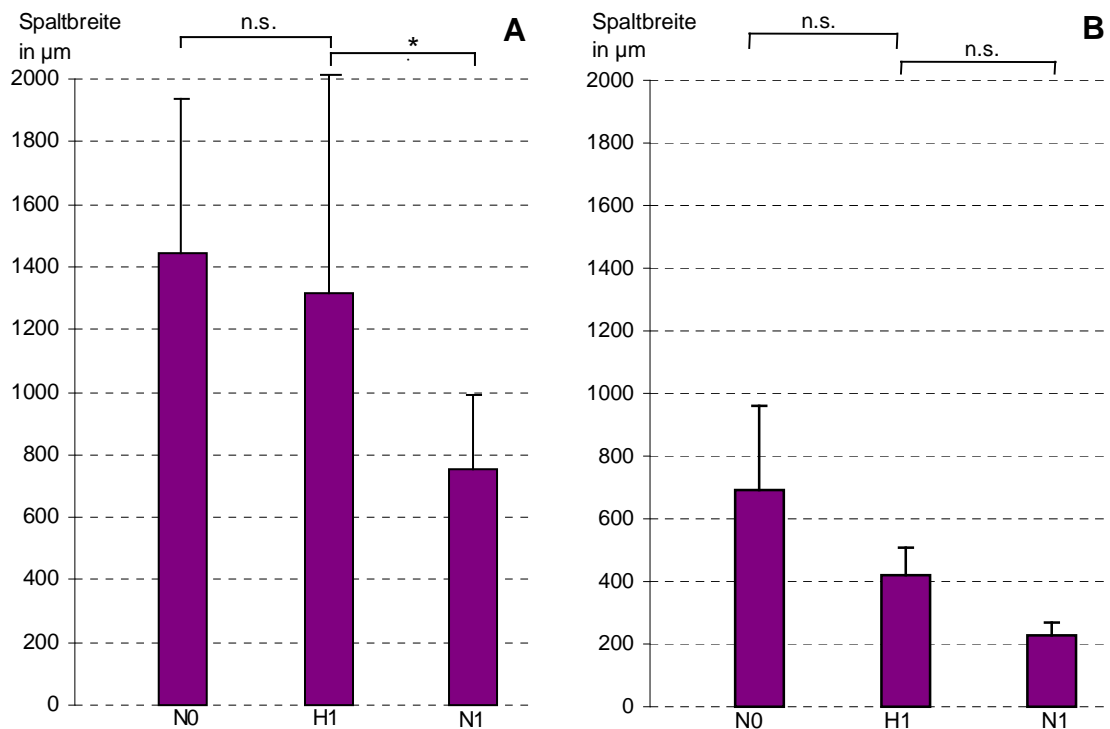


Abbildung 33: Absolute Spaltbreite von Spalt B unter Hypoxieeinfluss in µm

Absolute Spaltbreite von Spalt B in µm nach 0 h und nach 24 h unter Hypoxie bzw. Normoxie. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=3$) mit Standardabweichung der HDMEC- (A) und NHDF- (B) Mono-Kulturen. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. H1 entspricht der Kultur nach 24 h unter Hypoxie und N1 der Kultur nach 24 h unter Normoxie. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Bei Spalt B der HDMEC-Mono-Kultur war keine Zunahme der Spaltbreite (1444 µm nach 0 h) nach 24 h Hypoxie zu erkennen. Vielmehr kam es zu einer, wenn auch nicht signifikanten, Abnahme auf 1317 µm. Signifikant war jedoch auch in diesem Fall der Unterschied zur Normoxiekultur nach 24 h, deren Spaltbreite nur 754 µm betrug. Ebenso die Ergebnisse bezüglich der NHDF-Mono-Kultur und Spalt B bestätigen die Ergebnisse von Spalt A. Die Breite der in vitro Wunde (692 µm bei 0 h) nahm unter Hypoxie auf 420 µm ab. Die Spaltbreite nach 24 h Normoxie betrug 228 µm. Somit wird die Hemmung der Migration unter Hypoxie erneut bestätigt.

4.2.3 TGF- β_1

4.2.3.1 Populationen

Abb. 34 zeigt, dass die Zugabe von TGF- β_1 , sowohl bei den HDMEC- (Abb. 34 A) als auch bei den NHDF-Kulturen (Abb. 34 B) zu keiner signifikant gesteigerten Zellproliferation geführt hat. Die Zellzahl betrug bei den HDMEC unter Normoxie nach 24 h 257 Zellen pro mm² ohne TGF- β_1 -Zusatz und 253 Zellen pro mm² mit TGF- β_1 -Zusatz. Ähnlich verhielt es sich nach 48 h, mit TGF- β_1 -Zusatz lag die Zellzahl bei 286 Zellen pro mm², ohne TGF- β_1 waren nur 270 Zellen pro mm² vorhanden. Bei den HDMEC-Mono-Kulturen führte die Zugabe von TGF- β_1 also zu einer, wenn auch nicht signifikanten, Abnahme der Zellproliferation. Nach 24 h unter Hypoxie war es umgekehrt. 144 Zellen pro mm² waren ohne TGF- β_1 -Zusatz im Gegensatz zu 149 Zellen pro mm² nach TGF- β_1 -Zusatz vorhanden.

Unter Normoxie, sowohl nach 24 h als auch nach 48 h, führt ein TGF- β_1 -Zusatz zur vermehrten NHDF-Proliferation. So waren nach 24 h mit TGF- β_1 688 Zellen pro mm² vorhanden. Ohne TGF- β_1 waren es nur 614 NHDF pro mm². Nach 48 h lagen die Werte bei 2103 Zellen pro mm² mit TGF- β_1 , und 2041 Zellen pro mm² ohne TGF- β_1 . Auch wenn diese Ergebnisse nicht signifikant waren, kann man doch bei den NHDF, im Gegensatz zu den HDMEC von einem leichten proliferationsfördernden Effekt des TGF- β_1 sprechen. Nach 24 h unter Hypoxie wirkte TGF- β_1 allerdings hemmend auf die Proliferation, denn 309 NHDF pro mm² waren nach TGF- β_1 Zusatz vorhanden. Ohne TGF- β_1 waren es 332 Zellen pro mm².

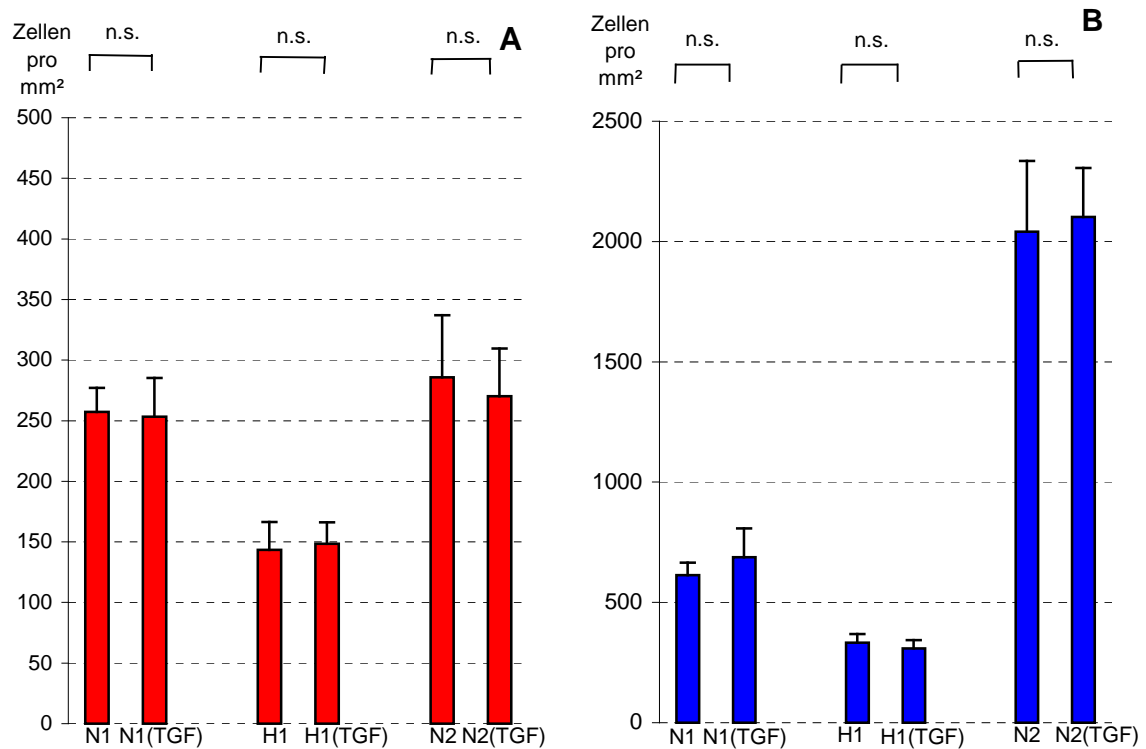


Abbildung 34: Vergleich des TGF-β₁-Einflusses auf die Proliferation der Normoxie- und Hypoxie-Mono-Kulturen

HDMEC- (A) und NHDF- (B) Mono-Kulturen und ihre Proliferation mit und ohne TGF-β₁-Zusatz nach 24 h und 48 h unter Normoxie und nach 24 h unter Hypoxie. Gezeigt ist der Mittelwert (n=3) der Zellzahl pro mm² mit Angabe der Standardabweichung. Dabei entspricht N1 der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N1(TGF) der Kultur nach 24 h unter Normoxie mit TGF-β₁ Zusatz. H1 steht für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie und H1(TGF) der Kultur nach 24 h unter Hypoxie mit TGF-β₁ Zusatz. N2 entspricht der Kultur nach 48 h unter Normoxie und N2(TGF) der Kultur nach 48 h unter Normoxie mit TGF-β₁ Zusatz. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

4.2.3.2 In vitro Wunden

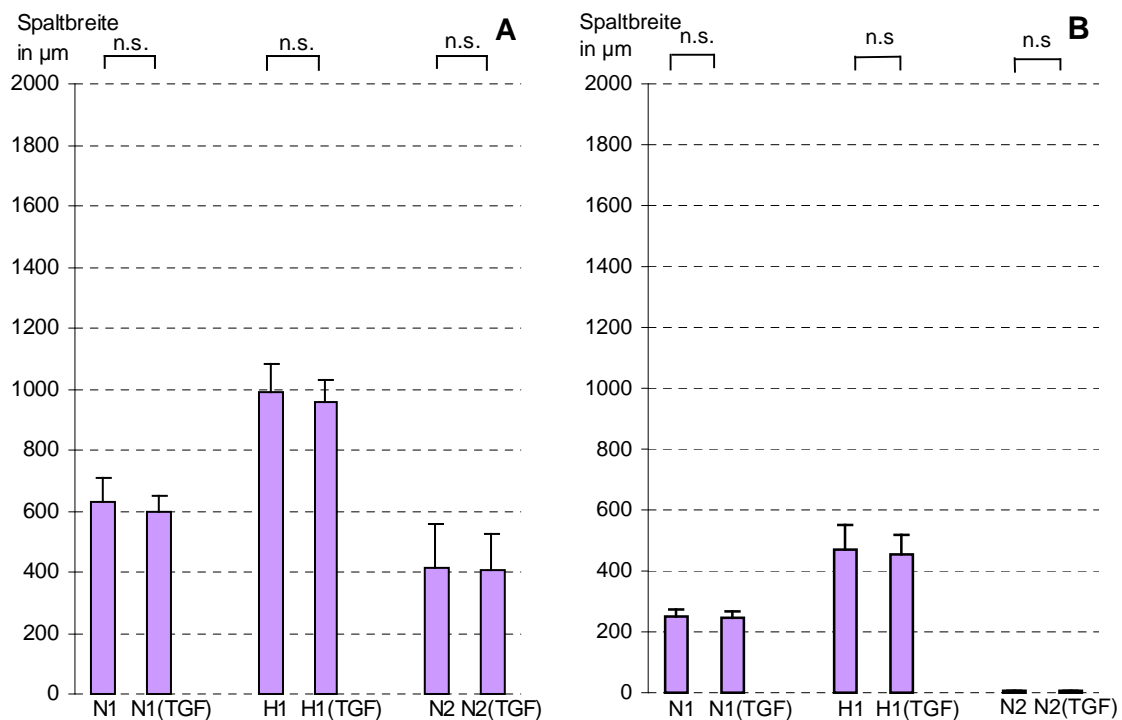


Abbildung 35: Absolute Spaltbreite von Spalt A unter TGF- β_1 -Einfluss in μm

Absolute Spaltbreite von Spalt A in μm mit und ohne TGF- β_1 -Zusatz nach 24 h und 48 h unter Normoxie und nach 24 h unter Hypoxie. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=3$) der Zellzahl pro mm^2 mit Angabe der Standardabweichung. Dabei entspricht N1 der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N1(TGF) der Kultur nach 24 h unter Normoxie mit TGF- β_1 Zusatz. H1 steht für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie und H1(TGF) der Kultur nach 24 h unter Hypoxie mit TGF- β_1 Zusatz. N2 entspricht der Kultur nach 48 h unter Normoxie und N2(TGF) der Kultur nach 48 h unter Normoxie mit TGF- β_1 Zusatz. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Abb. 35 zeigt, dass der Zusatz von TGF- β_1 , sowohl bei den HDMEC- (Abb. 35 A) als auch bei den NHDF-Mono-Kulturen (Abb. 35 B), zu einem minimal gesteigerten Spaltschluss geführt hat. Bei den HDMEC betrug die Breite der in vitro Wunde nach 24 h $631 \mu\text{m}$, mit TGF- β_1 waren es nur $600 \mu\text{m}$. Nach 48 h war es ähnlich, mit $414 \mu\text{m}$ Spaltbreite ohne und $404 \mu\text{m}$ Spaltbreite mit TGF- β_1 Zusatz. Auch die Breite der in vitro Wunde nach 24 h unter Hypoxie bestätigen, dass TGF- β_1 die Migration der Zellen verstärkt. Die absolute Spaltbreite betrug in diesem Fall ohne TGF- β_1 Einfluss $993 \mu\text{m}$, mit TGF- β_1 waren es $960 \mu\text{m}$.

Spalt B hat auch in diesem Fall die Ergebnisse von Spalt A bestätigt, denn Abb. 36 zeigt, dass TGF- β_1 die Migration der Zellen, wenn auch nicht signifikant, verstärkt. Sowohl bei den HDMEC- (Abb. 36 A) als auch bei den NHDF-Mono-Kulturen (Abb. 36 B) waren die in vitro Wunden schmaler bei TGF- β_1 -Zusatz. Für die HDMEC bedeutete das nach 24 h Normoxie eine Spaltbreite von 754 μm ohne TGF- β_1 und 617 μm mit TGF- β_1 . Nach 48 h waren es 528 μm und 461 μm . Nach 24 h unter Hypoxie betragen die Spaltbreiten 1317 μm ohne und 1256 μm mit TGF- β_1 .

Nicht so eindeutig waren die Spaltbreiten der NHDF-Mono-Kultur unter Hypoxie. Nach 24 h unter Normoxie war auch bei diesen Zellen eine verstärkte Migration durch TGF- β_1 festzustellen. Ohne TGF- β_1 betrug die Breite der in vitro Wunde nach 24h 228 μm , mit TGF- β_1 waren es nur 181 μm . Nach 48 h waren auch in diesem Fall beide Spalte verschlossen, so dass keine Unterscheidung möglich war. Nach 24 h unter Hypoxie betrug die Spaltbreite ohne Zugabe von TGF- β_1 420 μm . Mit TGF- β_1 waren es allerdings 436 μm , so dass TGF- β_1 hier nicht migrationsverstärkend, sondern eher hemmend gewirkt hat.

4.3 Co-Kulturen

4.3.1 Normoxie

4.3.1.1 Populationen

Die Gesamtzellzahl (GZ) setzte sich aus MF, HDMEC und NHDF zusammen. Welche Zellart wie stark proliferierte, ist in den folgenden Diagrammen einzeln aufgeführt (Abb. 37 bis 48). Die GZ betrug nach 0 h 150 Zellen pro mm². Nach 24 h war die Zahl auf 370, nach 48 h auf 750 Zellen pro mm² angestiegen (Abb. 37). Diese Unterschiede, sowohl zwischen 0 h und 24 h, als auch zwischen 24 h und 48 h waren beide signifikant.

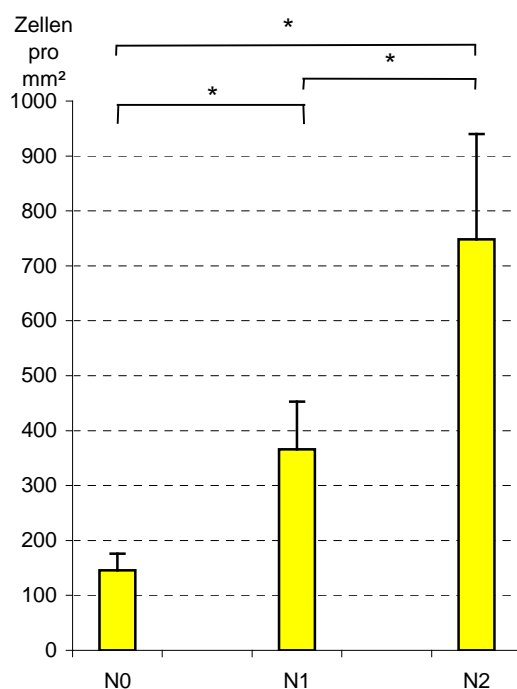


Abbildung 37: Proliferation der Co-Kultur

Die GZ der Co-Kulturen (Abb. 37) und ihre Proliferation unter Normoxie nach 24 h und 48 h. Gezeigt ist der Mittelwert (n=10) der Zellzahl pro mm² mit Angabe der Standardabweichung. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. N1 entspricht der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N2 der Kultur nach 48 h unter Normoxie. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Die Zahl der HDMEC blieb in den ersten 24 h konstant (Abb. 38 A). Sowohl nach 0 h als auch nach 24 h lag die Zellzahl bei 73 Zellen pro mm². Nach 48 h war es zu einem geringen Anstieg auf 81 Zellen pro mm² gekommen.

Die Werte der NHDF, deren Unterschiede alle signifikant sind, lagen bei 0 h bei 72 Zellen pro mm². 24 h später war die Zahl auf 193 pro mm² angestiegen. Nach 48 h waren es 667 NHDF pro mm² (Abb. 38 B).

Die Zahl der MF variierte in den 48 h nur gering (Abb. 38 C). An Tag 0 waren 20 MF pro mm² vorhanden. 24 h später war die Zahl auf 26 pro mm² angestiegen. Nach 48 h war die Zellzahl wieder auf 19 MF pro mm² gesunken.

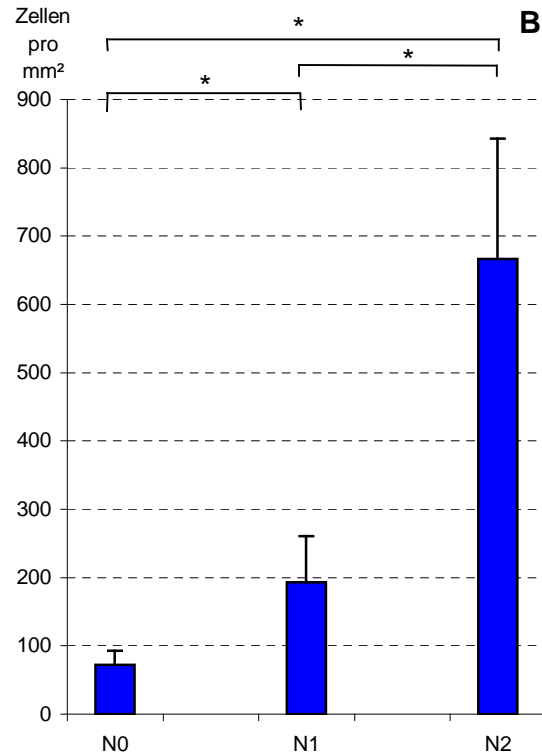
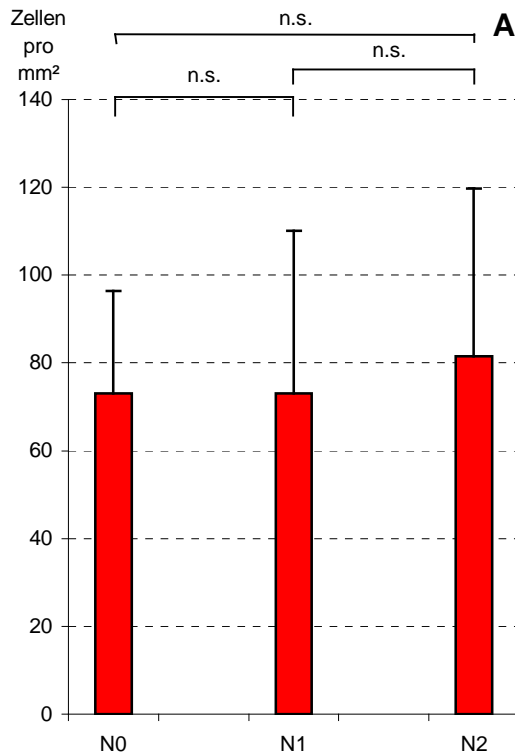
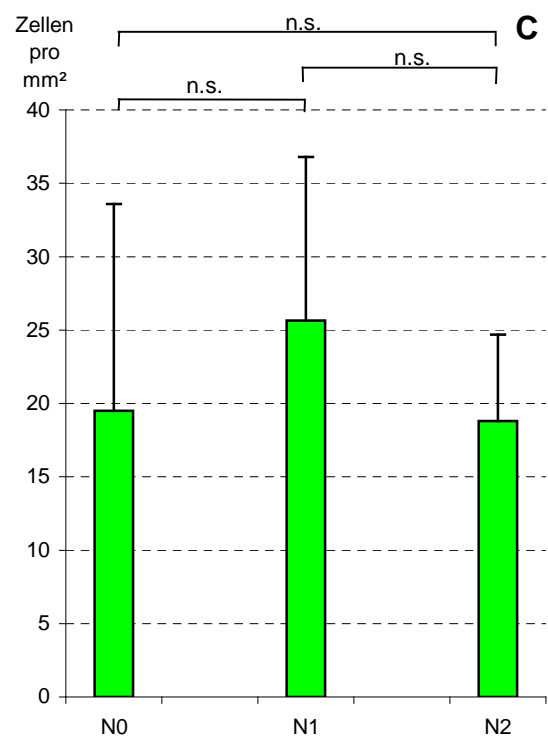


Abbildung 38: Proliferation der einzelnen Zelltypen in Co-Kultur

HDMEC (A), NHDF (B) und MF (C) der Co-Kulturen und ihre Proliferation nach 24 h und 48 h unter Normoxie.

Gezeigt ist der Mittelwert ($n=10$) der Zellzahl pro mm^2 mit Angabe der Standardabweichung. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. N1 entspricht der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N2 der Kultur nach 48 h unter Normoxie.

(* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).



4.3.1.2 In vitro Wunden

Die prozentuale Abnahme der Spaltbreiten der in vitro Wunden der Co-Kulturen ist in Abb. 39 dargestellt. Nach 24 h war Spalt A um 35% schmaler, bei Spalt B waren es 38%. Nach 48 h war Spalt A zu 82% verschlossen, Spalt B 75%.

Die absoluten Spaltangaben sind in Abb. 40 abgebildet.

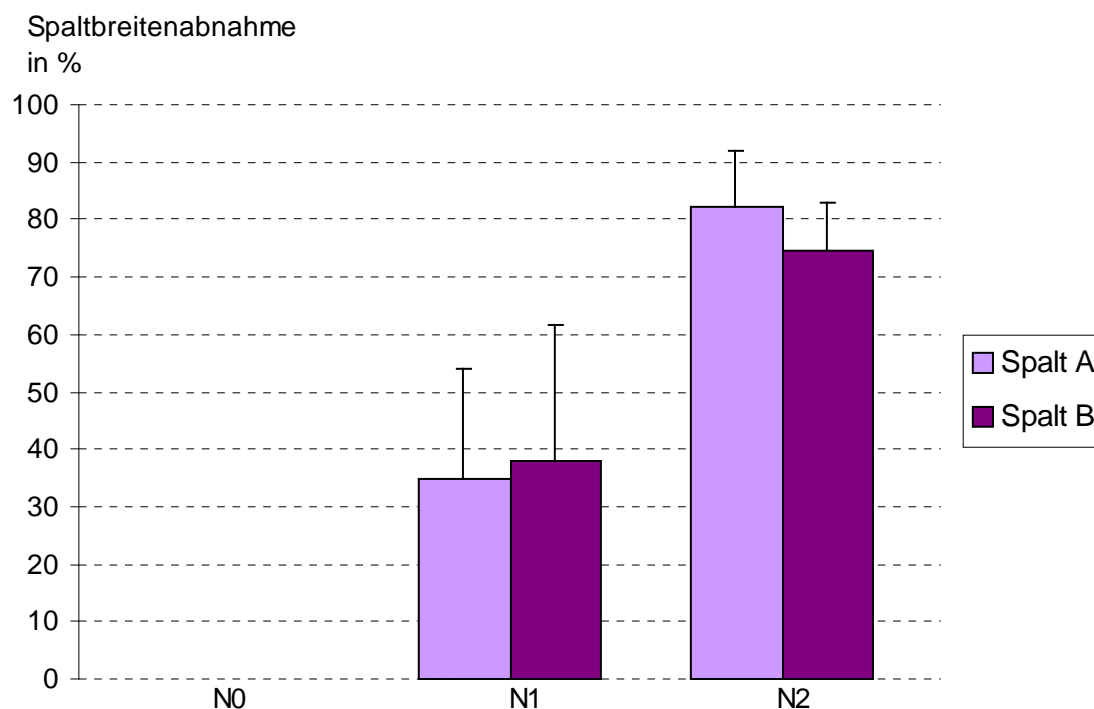


Abbildung 39: Spaltbreitenabnahme der Co-Kulturen in %

Prozentuale Abnahme der Spaltbreite der in vitro Wunden der Co-Kulturen nach 24 h und 48 h. Es ist jeweils der Mittelwert (n=10) von Spalt A und B mit Standardabweichung dargestellt. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. N1 entspricht der Kultur nach 24 h und N2 der Kultur nach 48 h unter Normoxie.

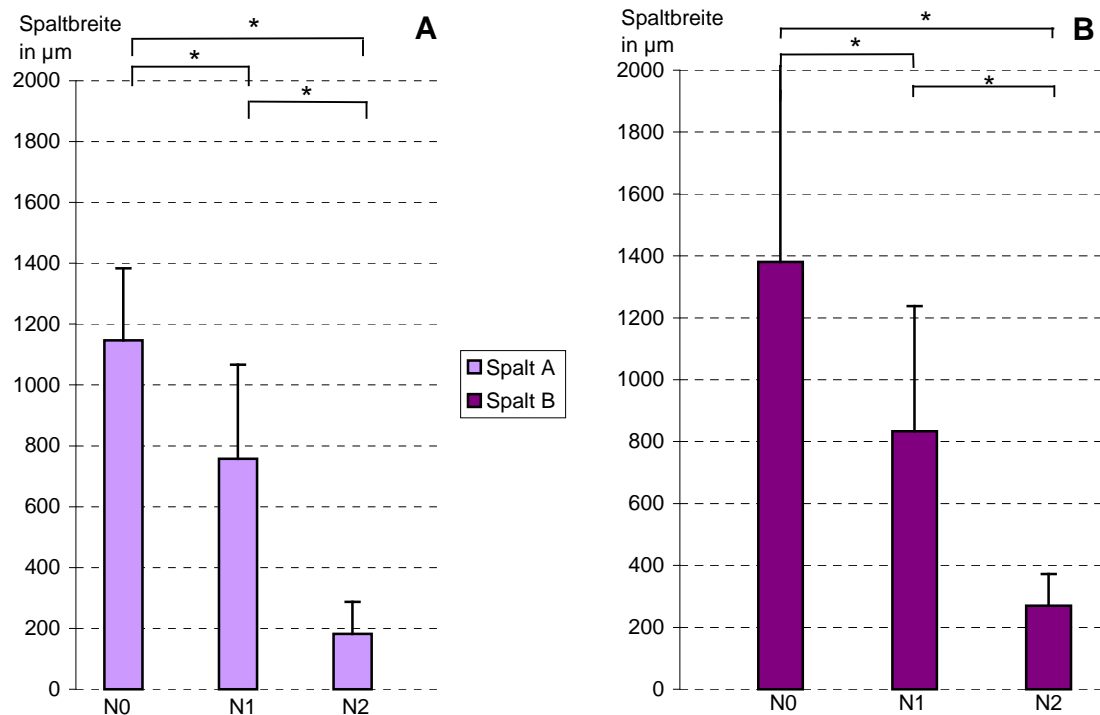


Abbildung 40: Absolute Spaltbreiten von Spalt A (A) und Spalt B (B) in µm

Absolute Spaltbreite der Spalte A (A) und B (B) der Co-Kulturen in µm nach 24 h und 48 h unter Normoxie. Absolute Spaltbreite von Spalt A in µm nach 24 h und 48 h unter Normoxie. Gezeigt ist der Mittelwert (n=10) mit Standardabweichung. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. N1 entspricht der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N2 der Kultur nach 48 h unter Normoxie.

(* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Abb. 40 zeigt die absolute Breite der in vitro Wunden A und B der Co-Kultur. Beide in vitro Wunden zeigten sowohl nach 24 h als auch nach 48 h signifikante Abnahmen ihrer Breiten. Bei Spalt A (Abb. 40 A) betrug der Ausgangswert bei 0 h 1147 µm. Nach 24 h war dieser Wert auf 757 µm zurückgegangen. Weitere 24 h später maß der Spalt nur noch 182 µm in der Breite. Bei Spalt B verhielt es sich ähnlich (Abb. 40 B). Der Ausgangswert lag an Tag 0 bei 1380 µm. 24 h später waren es nur noch 834 µm. An zweiten Tag betrug die Spaltbreite in diesem Fall nur noch 270 µm.

4.3.2 Hypoxie

4.3.2.1 Populationen

Die Co-Kultur, die 24 h Hypoxie ausgesetzt war, zeigte, wie in Abb. 41 dargestellt, einen deutlichen Unterschied zur Normoxiekultur. Auch wenn die Differenz nicht signifikant war, so war sie bei einem Wert von 170 Zellen pro mm² nach 24 h Hypoxie einerseits und 370 Zellen pro mm² nach 24 h Normoxie andererseits doch eindeutig. Hypoxie verlangsamt also die Vermehrung der Zellen der Co-Kultur.

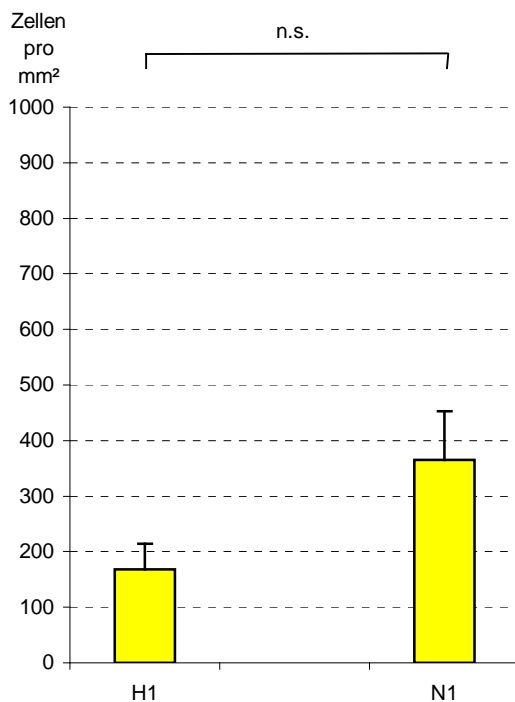


Abbildung 41: Vergleich der Proliferation der Hypoxie- und Normoxie-Co-Kulturen

GZ der Co-Kulturen und ihre Proliferation nach 24 h unter Normoxie oder Hypoxie. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=10$) der Zellzahl pro mm² mit Angabe der Standardabweichung. Dabei steht H1 für die Kultur die 24 h Hypoxie ausgesetzt wurde und N1 entspricht der Kultur die 24 h unter Normoxie verweilte. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Die HDMEC und NHDF der Co-Kulturen zeigten nach 24 h Hypoxie ähnliche Ergebnisse. Die Unterschiede zwischen den Normoxie- und Hypoxiekulturen der HDMEC waren signifikant (Abb. 42 A). 36 Zellen pro mm² nach 24 h unter Hypoxie standen 73 Zellen nach 24 h Normoxie gegenüber. Hypoxie verlangsamt die Proliferation der HDMEC.

Aber auch die NHDF wurden durch Hypoxie in ihrer Proliferation gehemmt (Abb.42 B). 132 NHDF pro mm² waren nach 24 h Hypoxie vorhanden. Nach 24 h unter Normoxie waren es 193 NHDF pro mm². Dieser Unterschied zeigt eine Proliferationshemmung durch Hypoxie bei NHDF.

Auch die alleinige Betrachtung der MF macht den proliferationshemmenden Einfluss von Hypoxie deutlich (Abb. 42 C). 19 MF pro mm² waren nach 24 h Hypoxie vorhanden. Nach 24 h unter Normoxie waren es 26 MF pro mm². Diese Differenz war ebenfalls nicht signifikant.

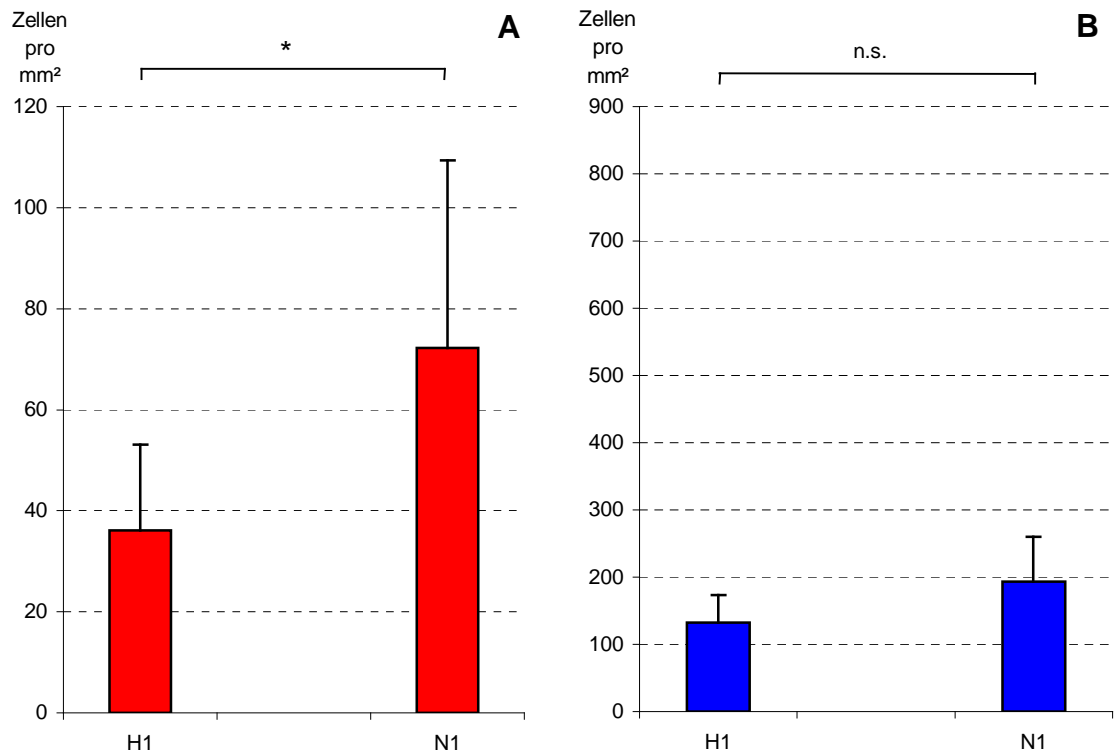
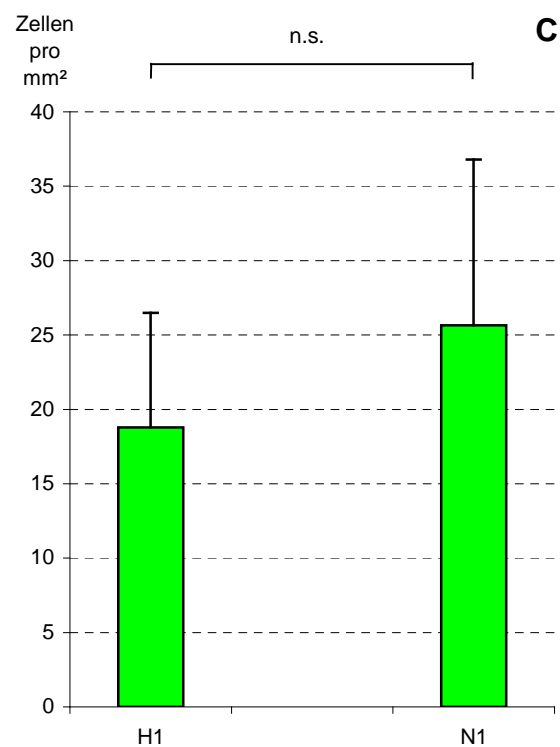


Abbildung 42: Vergleich der Proliferation der Hypoxie- und Normoxie- Co-Kulturen

HDMEC (A), NHDF (B) und MF (C) der Co-Kulturen und ihre Proliferation nach 24 h unter Normoxie oder Hypoxie. Gezeigt ist der Mittelwert (n=10) der Zellzahl pro mm² mit Angabe der Standardabweichung. Dabei steht H1 für die Kultur die 24 h Hypoxie ausgesetzt wurde und N1 entspricht der Kultur die 24 h unter Normoxie verweilte.

(* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).



4.3.2.2 In vitro Wunden

Der bei den Populationen aufgetretene proliferationshemmende Effekt von Hypoxie wird bei den in vitro Wunden bestätigt. Denn die prozentuale Spaltabnahme betrug nach 24 h unter Hypoxie nur 28% bei Spalt A und 19% bei Spalt B (Abb. 43). Unter Normoxie lagen die Werte bei 35% Spaltabnahme bei Spalt A und 38% bei Spalt B. Hypoxie hat einen negativen Einfluss auf die Migration der Zellen in die Wunde.

Die absoluten Spaltwerte mit Angabe der Signifikanzen sind in Abb. 44 zu sehen.

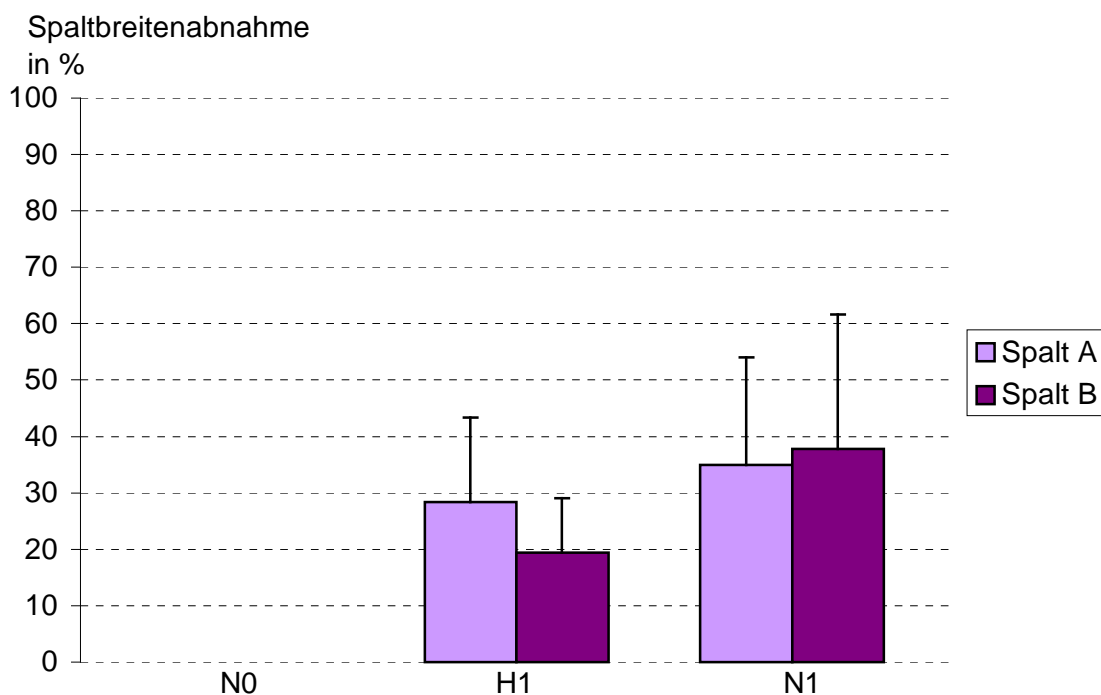


Abbildung 43: Spaltbreitenabnahme der Co-Kultur unter Hypoxie in %

Prozentuale Abnahme der Spaltbreite der in vitro Wunden der Co-Kulturen nach 24 h unter Hypoxie bzw. Normoxie. Es sind jeweils der Mittelwert (n=10) von Spalt A und B mit Standardabweichung dargestellt. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. N1 entspricht der Kultur nach 24 h und N2 der Kultur nach 48 h unter Normoxie.

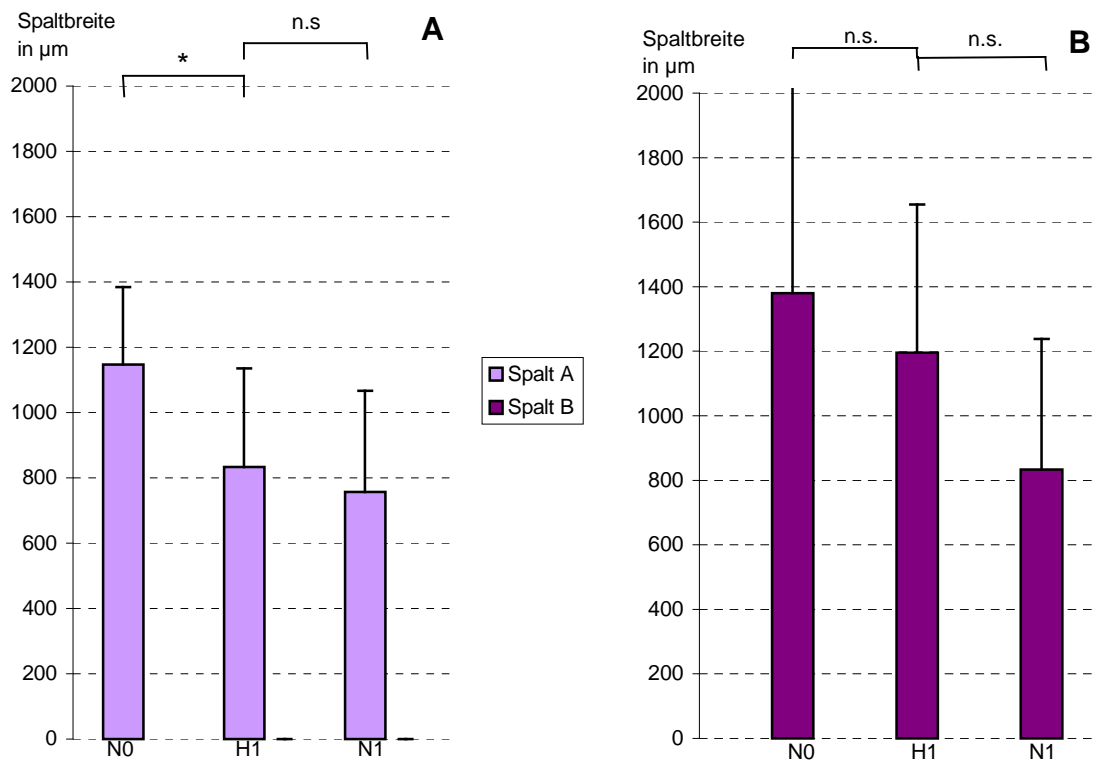


Abbildung 44: Absolute Spaltbreite von Spalt A und B unter Hypoxieeinfluss in µm

Absolute Spaltbreite der Spalte A (A) und B (A) der Co-Kulturen in µm nach 0 h und nach 24 h unter Hypoxie bzw. Normoxie. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=10$) mit Standardabweichung. Dabei steht N0 für die Normoxiekultur nach 0 h. H1 entspricht der Kultur nach 24 h unter Hypoxie und N1 der Kultur nach 24 h unter Normoxie. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Abb. 44 zeigt die absoluten Spaltbreiten mit und ohne Hypoxieeinfluss. Bei Spalt A fällt auf, dass es trotz Hypoxie nach 24 h zu einer signifikanten Spaltabnahme (834 µm) im Vergleich zu 0 h, an dem die Spaltbreite 1147 µm betrug, kam (Abb. 44 A). Unter Normoxie war die Spaltabnahme allerdings größer. Der Wert lag hier bei nur 757 µm. Diese Unterschiede zwischen Hypoxie- und Normoxiekulturen, die allerdings nicht signifikant waren, bestätigen den negativen Einfluss auf die Migration der Zellen in den Spalt durch Hypoxie.

Dies ist auch bei Spalt B zu erkennen (Abb. 44 B). Nach 24 h unter Hypoxie war die in vitro Wunde in diesem Fall nur noch 1196 µm breit. Der Ausgangswert bei 0 h lag bei 1380 µm. Nach 24 h unter Normoxie hatte sich die Spaltbreite auf 834 µm verkleinert. Diese Differenzen waren ebenfalls nicht signifikant.

4.3.3 TGF- β

4.3.3.1 Populationen

Die Zugabe von TGF- β_1 zeigte bei den Co-Kulturen, wie in den folgenden Diagrammen dargestellt, sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Populationen. So kam es bei der GZ nach 24 h unter Normoxie zu einer deutlichen, wenn auch nicht signifikanten, Abnahme der Zellzahl pro mm² (Abb. 45). Ohne TGF- β_1 -Zusatz waren es nach 24 h 366 Zellen pro mm². Das Hinzufügen von TGF- β_1 führte zu 254 Zellen pro mm². Nach 48 h unter Normoxie (748 Zellen pro mm²) war der Unterschied zur TGF- β_1 Kultur, bei der nur 611 Zellen pro mm² zu finden waren, signifikant. Man kann also von einem negativen Einfluss des TGF- β_1 auf die Proliferation der Co-Kulturen sprechen.

Komplett anders verhielten sich die Co-Kulturen nach 24 h unter Hypoxie. Denn die Zellzahl lag bei 168 pro mm² ohne, bzw. 165 pro mm² mit TGF- β_1 -Zusatz.

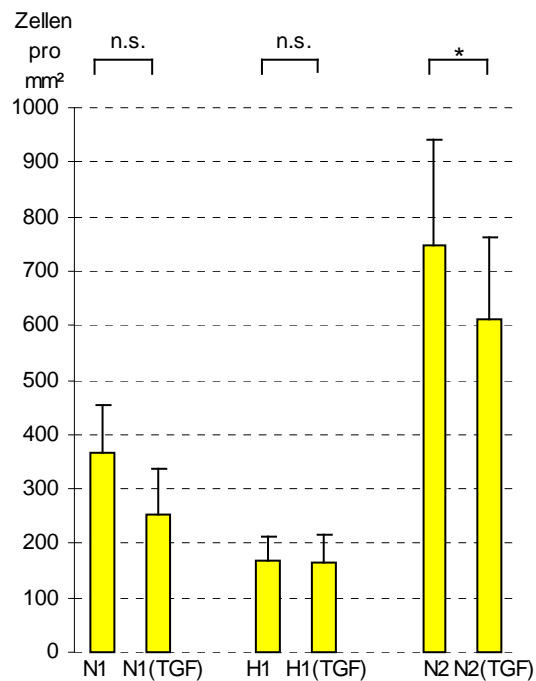


Abbildung 45: Vergleich des TGF- β_1 -Einfluss auf die Proliferation der Co-Kultur

GZ der Co-Kulturen und ihre Proliferation mit und ohne TGF- β_1 -Zusatz nach 24 h und 48 h unter Normoxie und nach 24 h unter Hypoxie. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=10$) der Zellzahl pro mm² mit Angabe der Standardabweichung. Dabei entspricht N1 der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N1(TGF) der Kultur ist die Kultur nach 24 h unter Normoxie mit TGF- β_1 -Zusatz. H1 steht für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie und H1(TGF) für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie mit TGF- β_1 -Zusatz. N2 entspricht der Kultur nach 48 h unter Normoxie und N2(TGF) der Kultur nach 48 h unter Normoxie mit TGF- β_1 -Zusatz. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Bei den HDMEC der Co-Kultur zeigte sich unter Normoxie ebenfalls ein hemmender, wenn auch nicht signifikanter, Einfluss von TGF- β_1 . So fanden sich nach 24 h ohne TGF- β_1 73 HDMEC pro mm², mit TGF- β_1 waren es nur 62 Zellen pro mm². Nach 48 h Normoxie lagen die Werte bei 81 MF pro mm² ohne TGF- β_1 , bzw. 60 pro mm² mit TGF- β_1 . Diese Tendenz war auch bei den MF (Abb. 46 B) und den NHDF (Abb. 46 C) zu erkennen. Anders verhielt es sich unter Hypoxie, wo TGF- β_1 proliferationsfördernd wirkte. Allerdings war dieser Unterschied, der bei 36 Zellen pro mm² ohne TGF- β_1 und 38 Zellen pro mm² mit TGF- β_1 lag, nicht signifikant.

Bei den NHDF der Co-Kultur waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen mit und denen ohne TGF- β_1 -Zusatz festzustellen (Abb. 46 B). Nach 24 h unter Normoxie fand sich ein minimaler Unterschied zwischen der Kultur ohne TGF- β_1 , die 193 Zellen pro mm² aufwies, und der mit TGF- β_1 , bei der 192 NHDF pro mm² vorlagen. Anders verhielt es sich unter Hypoxie. Dort bestätigten die NHDF das Ergebnis der GZ unter Abb. 45. Bei den NHDF lag nach 24 h Hypoxie bei der Kultur mit TGF- β_1 -Zusatz die Zellzahl niedriger (127 NHDF pro mm²) als bei der Kultur, der kein TGF- β_1 zugefügt worden war (132 Zellen pro mm²).

Nach 48 h mit TGF- β_1 wurde auch die NHDF Zellproliferation gehemmt, so dass nach 48 h 667 Zellen pro mm² bei der Kultur ohne TGF- β_1 -Zusatz vorlagen. Bei der Kultur mit TGF- β_1 waren nur 551 Zellen pro mm² vorhanden. Auch wenn dieser Unterschied zwischen den Kulturen nicht signifikant war, so kann man doch von einem deutlichen proliferationshemmenden Einfluss von TGF- β_1 nach 48 h Kultivierung sprechen.

Bei den MF hat TGF- β_1 unter Normoxie auch eine hemmende Wirkung auf die Zellvermehrung (Abb. 46 C). 26 Zellen pro mm² waren nach 24 h Normoxie ohne TGF- β_1 zu finden. Mit TGF- β_1 -Zusatz waren 22 Zellen pro mm² vorhanden. Diese proliferationshemmende Wirkung bestätigen die Werte nach 48 h, die bei 19 MF pro mm² ohne TGF- β_1 und 16 Zellen pro mm² mit TGF- β_1 lagen.

Auch die proliferationsfördernde Tendenz von TGF- β_1 unter Hypoxie, die bei den HDMEC zu finden war, liegt bei den MF vor. Das bedeutete 19 Zellen pro mm² ohne und 22 pro mm² mit TGF- β_1 -Zusatz. Es ist also davon auszugehen, dass TGF- β_1 unter Hypoxie zur vermehrten Bildung von MF führt.

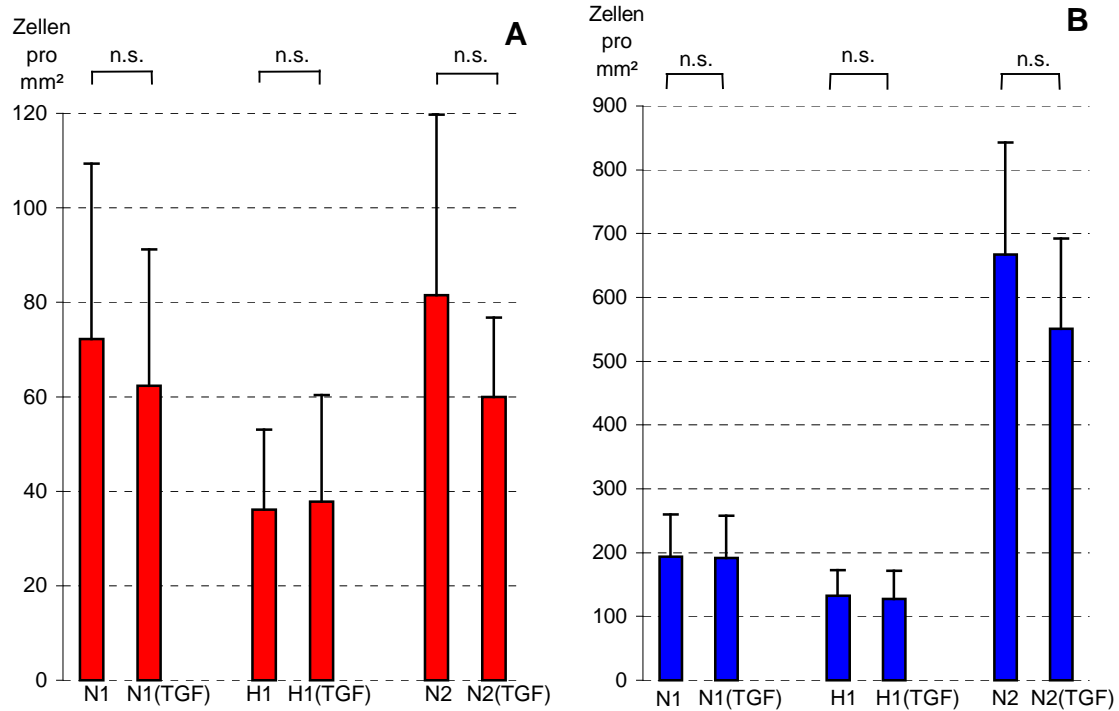
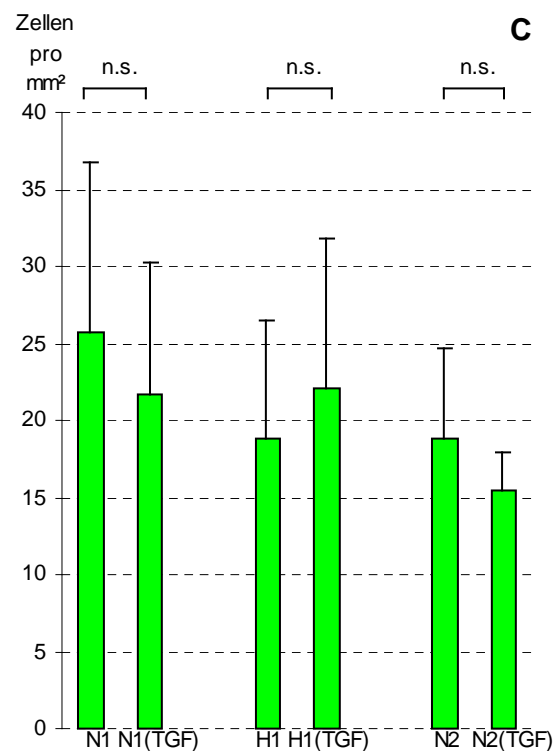


Abbildung 46: Vergleich des TGF- β_1 -Einflusses auf die Proliferation der Normoxie- und Hypoxiekulturen

HDMEC (A), NHDF (B) und MF (C) der Co-Kulturen und ihre Proliferation mit und ohne TGF- β_1 -Zusatz nach 24 h und 48 h unter Normoxie und nach 24 h unter Hypoxie. Gezeigt ist der Mittelwert (n=10) der Zellzahl pro mm² mit Angabe der Standardabweichung. Dabei entspricht N1 der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N1(TGF) der Kultur nach 24 h unter Normoxie mit TGF- β_1 -Zusatz.

H1 steht für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie und H1(TGF) für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie mit TGF- β_1 -Zusatz. N2 entspricht der Kultur nach 48 h unter Normoxie und N2(TGF) der Kultur nach 48 h unter Normoxie mit TGF- β_1 -Zusatz. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).



4.3.3.2 In vitro Wunden

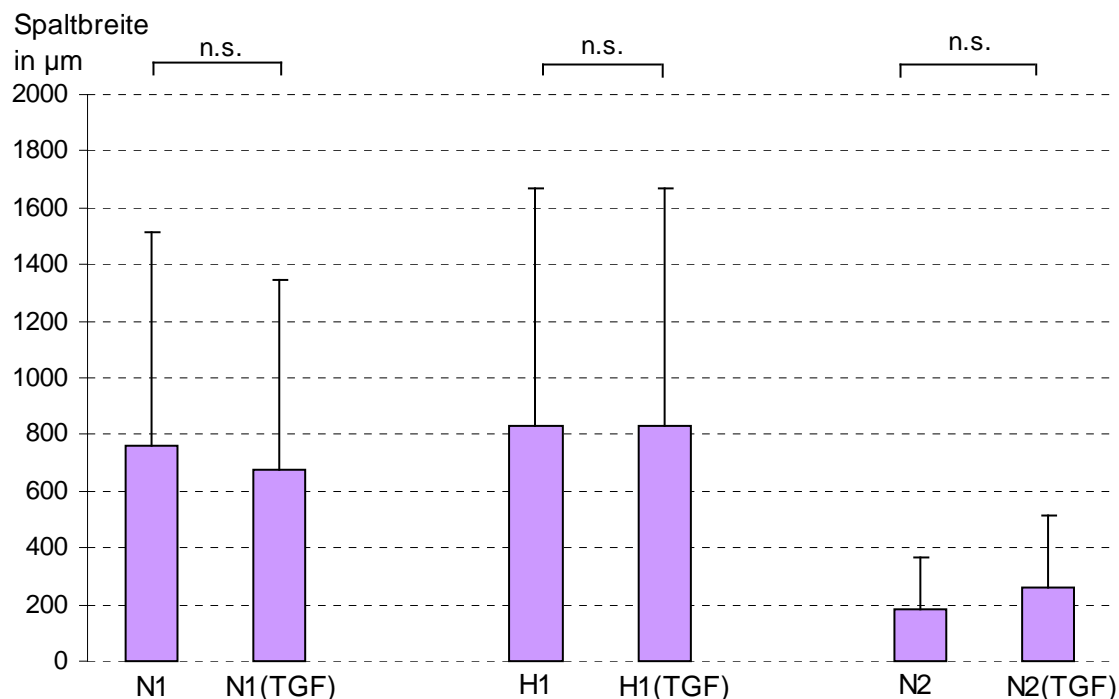


Abbildung 47: Absolute Spaltbreite von Spalt A unter TGF- β_1 -Einfluss in μm

Absolute Spaltbreite von Spalt A der Co-Kultur in μm mit und ohne TGF- β_1 -Zusatz nach 24 h und 48 h unter Normoxie und nach 24 h unter Hypoxie. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=10$) der Zellzahl pro mm^2 mit Angabe der Standardabweichung. Dabei entspricht N1 der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N1(TGF) der Kultur nach 24 h unter Normoxie mit TGF- β_1 -Zusatz. H1 steht für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie und H1(TGF) für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie mit TGF- β_1 -Zusatz. N2 entspricht der Kultur nach 48 h unter Normoxie und N2(TGF) der Kultur nach 48 h unter Normoxie mit TGF- β_1 -Zusatz. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Die in vitro Wunden der Co-Kultur zeigen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des TGF- β_1 Einflusses. Die absolute Breite des Spaltes A zeigte nach 24 h unter Normoxie leichte Unterschiede zwischen den Kulturen mit TGF- β_1 und ohne TGF- β_1 (Abb. 47). So betrug die Breite der Kultur mit TGF- β_1 nur 673 μm . Im Gegensatz dazu war die Kultur ohne Zugabe von TGF- β_1 weniger verschlossen (757 μm). In dem Fall kann man von einer Migrationsförderung der Zellen in die Wunde durch TGF- β_1 sprechen. Dieser Effekt konnte nach 48 h allerdings nicht mehr beobachtet werden, denn die Kultur ohne TGF- β_1 war in diesem Falle auf 182 μm verschlossen. Der TGF- β_1 -Zusatz hatte eine Spaltbreite von 258 μm zur Folge.

Unter Hypoxie war bei Spalt A bezüglich TGF- β_1 kein hemmender oder fördernder Einfluss auf den Spaltschluss festzustellen, da die Spaltbreite sowohl mit als auch ohne TGF- β_1 834 μm betrug.

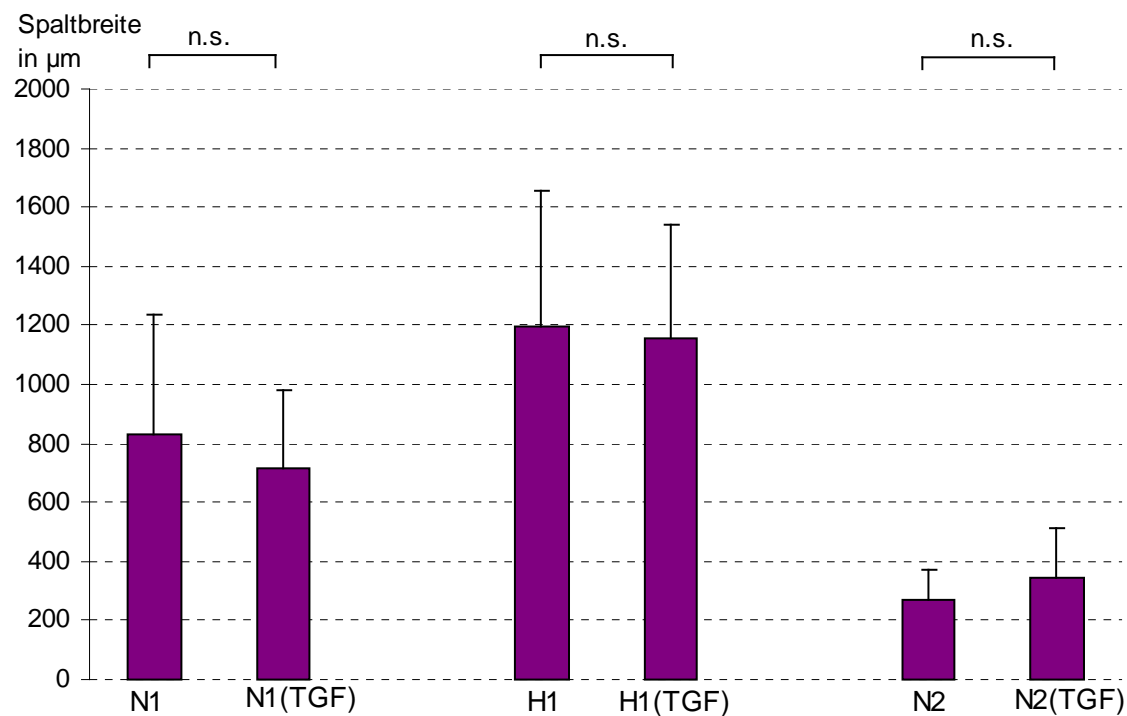


Abbildung 48: Absolute Spaltbreite von Spalt B unter TGF- β_1 -Einfluss in μm

Absolute Spaltbreite von Spalt B der Co-Kultur in μm mit und ohne TGF- β_1 -Zusatz nach 24 h und 48 h unter Normoxie und nach 24 h unter Hypoxie. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=10$) der Zellzahl pro mm^2 mit Angabe der Standardabweichung. Dabei entspricht N1 der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N1(TGF) der Kultur nach 24 h unter Normoxie mit TGF- β_1 -Zusatz. H1 steht für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie und H1(TGF) für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie mit TGF- β_1 -Zusatz. N2 entspricht der Kultur nach 48 h unter Normoxie und N2(TGF) der Kultur nach 48 h unter Normoxie mit TGF- β_1 -Zusatz. (* = $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant).

Spalt B bestätigte auch in diesem Fall die Ergebnisse von Spalt A (Abb. 48). TGF- β_1 verstärkte die Migration der Zellen nach 24 h Normoxie, wenn auch nicht signifikant. Zu sehen war dies an einer Spaltbreite von 834 μm ohne TGF- β_1 und 716 μm mit TGF- β_1 . Nach 48 h lag das gleich Phänomen wie bei Spalt A vor. Die in vitro Wunde mit TGF- β_1 Zusatz ist breiter (346 μm) als die Wunde ohne Zusatz (270 μm). Hier kann man von einem, wenn auch nicht signifikantem, hemmenden Einfluss des TGF- β_1 auf die Migration der Zellen in die in vitro Wunde ausgehen.

Nach 24 h unter Hypoxie war bei Spalt B, ähnlich wie bei A (Abb.47), kein Unterschied bezüglich des Spaltschlusses durch TGF- β_1 festzustellen. Die Spaltbreite ohne Zugabe von TGF- β_1 betrug 1196 μm . Mit TGF- β_1 waren es 1155 μm , so dass auch in diesem Fall von keinem migrationsverstärkenden oder hemmenden Einfluss des TGF- β_1 gesprochen werden kann.

4.3.4 Endothelin-1

Mit Hilfe der immunzytochemischen Färbung war festgestellt worden, dass nur die HDMEC ET-1 sowohl in den Mono- als auch in den Co-Kulturen exprimieren. NHDF wiesen keine ET-1 Expression auf (Abb. 23). Die mittels ELISA ermittelten Werte der ET-1 Freisetzung pro HDMEC übernahmen wir von den Mono-Kulturen für die Co-Kulturen und errechneten aus der Differenz von gemessener zu errechneter Menge die ET-1 Aufnahme der NHDF.

Mono-kultivierte HDMEC gaben zur Stunde 0 4,00 fg ET-1 pro Zelle ab (Abb. 49). Die ET-1 Werte lagen nach 24 h bei 4,15 fg/Zelle und nach 48 h bei 5,27 fg/Zelle. Auch wenn die Unterschiede nicht signifikant waren, so kann man nach 24 h unter Hypoxie eine Abnahme der HDMEC ET-1-Expression feststellen (3,73 fg/Zelle). Durch zusätzliche TGF- β_1 -Zugabe lagen die ET-1 Werte unter Hypoxie etwas höher (3,97 fg/Zelle). Die Freisetzung wurde durch TGF- β_1 auch unter Normoxie nach 24 h (4,59 fg/Zelle) und nach 48 h (5,70 fg/Zelle) erhöht.

Die errechnete ET-1 Aufnahme durch NHDF lag nach 0 h bei 2,94 fg/Zelle und nahm nach 24 h auf 1,12 fg/Zelle und nach 48 h auf 0,63 fg/Zelle ab. Hypoxie führte zu einer nicht signifikanten Abnahme der Resorption (0,63 fg/Zelle im Vergleich zu 1,12 fg/Zelle). TGF- β_1 -Zugabe hatte unter Hypoxie einen positiven Einfluss auf die ET-1-Resorption der NHDF (0,68 fg/Zelle zu 0,63 fg/Zelle). Nach 24 h (0,92 fg/Zelle im Vergleich zu 1,12 fg/Zelle) und auch nach 48 h (0,54 fg/Zelle zu 0,63 fg/Zelle) unter Normoxie hemmte es hingegen die Aufnahme von ET-1 durch NHDF.

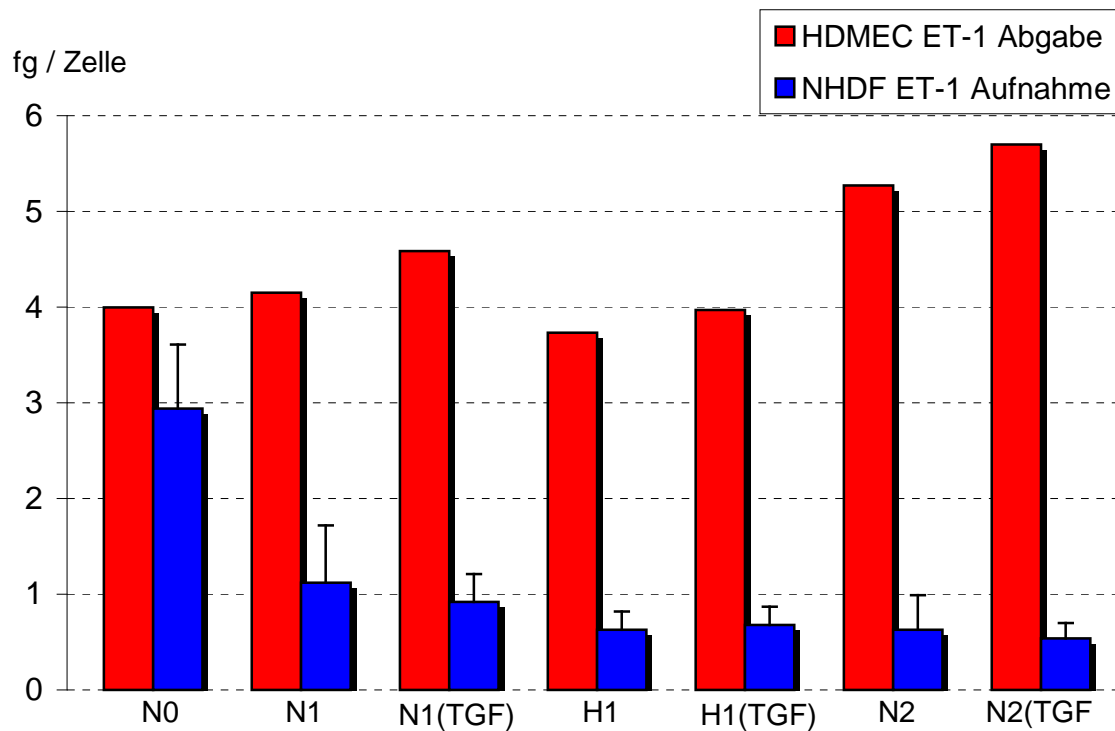


Abbildung 49: ET-1-Abgabe durch HDMEC und -Aufnahme durch NHDF

Mittelwerte der ET-1-Abgabe durch HDMEC und ET-1-Aufnahme durch NHDF in der Co-Kultur (n=6) in fg/Zelle in Abhängigkeit von der Zeit, Hypoxie und TGF- β_1 -Zugabe. Die Unterschiede sind alle nicht signifikant. Dabei entspricht N0 der zur Stunde 0 fixierten Kultur, N1 der Kultur nach 24 h unter Normoxie und N1(TGF) der Kultur nach 24 h unter Normoxie mit TGF- β_1 Zusatz. H1 steht für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie und H1(TGF) für die Kultur nach 24 h unter Hypoxie mit TGF- β_1 Zusatz. N2 entspricht der Kultur nach 48 h unter Normoxie und N2(TGF) der Kultur nach 48 h unter Normoxie mit TGF- β_1 Zusatz.

5. DISKUSSION

Diese Arbeit zeigt, dass NHDF und HDMEC in einem Co-Kultursystem gemeinsam kultiviert und darüber hinaus mit einem zweidimensionalen in vitro Wundheilungsassay kombiniert werden können (CCSWMA). Diese Kombination bietet die Grundlage, um die Interaktion von HDMEC mit NHDF und MF über einen Zeitraum von 48 h darzustellen und zu untersuchen.

Co-Kultur-Wund-Modell

Zahlreiche Studien beschäftigten sich bereits mit der Migration und Proliferation der an der Wundheilung beteiligten Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen (Hunt et al. 1984; Gottrup et al. 2000).

Auch an unserem Modell können die Parameter Proliferation, Migration und Differenzierung untersucht werden.

Fraglich bleibt allerdings die Entstehung des Granulationsgewebes und die ECM-Synthese, aus denen die Narbenbildung resultiert (Bennett & Schultz 1993), die Produktion von ECM konnte nicht untersucht werden, da das Zeitfenster von 48 h nicht ausreichte.

Generelle Effekte der Co-Kultivierung wurden bereits in anderen Studien untersucht. So wurden beispielsweise humane kardiale Fibroblasten mit HUVEC (Zhao & Eghbali-Webb 2001) oder Perizyten mit Endothelzellen (Orlidge & D'Amore 1987) gemeinsam kultiviert.

Bei der Entwicklung eines Modells aus NHDF und HDMEC musste zunächst die optimale Zelldichte ermittelt werden, die eine Proliferations- und Migrationsanalyse aller Zelltypen ermöglichte. Andere Studien wählten beispielsweise eine wesentlich geringere Zelldichte (5 Zellen pro mm²) (Masur et al. 1996). Wir benötigten allerdings für unser Setup eine höhere Zelldichte, so dass man zur Stunde 0 die in vitro Wunde im Monolayer erkennen konnte und nach 24 h beziehungsweise 48 h eine Änderung der Wundbreite feststellbar war.

In vorangegangenen Studien wurde die mechanische Erzeugung von Wunden in vitro mit Hilfe von Plastikpipetten (Cha et al. 1996), Rasierklingen (Burk 1973),

Silikonspitzen (Watanabe et al. 1994) oder chemisch mit Lauge (Buisson et al. 1996) bereits gezeigt. Dabei wurde festgestellt, dass es zu einem Wundschluss durch eine Kombination aus Migration und Proliferation in den zellfreien Bereich kommt (Calderon et al. 1996). Die Schwierigkeit liegt darin, eine Konstellation zu schaffen, die möglichst genau der menschlichen Wundheilung entspricht. Unsere *in vitro* Wunden wurden durch Pipettenspitzen hergestellt. Dafür wurden unterschiedlich große Pipettenspitzen verwendet, die verschiedene Wundbreiten mit unterschiedlichen Migrationsdistanzen imitierten.

Darüber hinaus mussten die Wundbreiten ebenso wie die Zelldichte, in das Zeitfenster, welches in unserem Setup 48 h betrug, passen. Eine Änderung der Wundbreite der *in vitro* Wunden musste sowohl nach 24 h als auch nach 48 h beurteilbar sein.

In der Co-Kultur produzierte der mit einer 1000 μl -Eppendorf-Pipettenspitze hergestellte Spalt A eine Wunde mit einer mittleren Breite von 1150 μm , was annähernd dem Durchmesser der verwendeten Spitze entsprach. Hingegen produzierte die 5 ml-Einmal-Plastikpipette, die für Spalt B verwendet wurde, nur eine geringgradig weitere Wunde (1380 μm), obwohl der Pipettendurchmesser 2 mm betrug. Diese Abweichung zwischen Wunde und Spitzendurchmesser kam durchs Kratzprocedere selbst zustande, denn die Spitze wurde in einem Winkel von ungefähr 55° angesetzt und manuell über das Glas gezogen. Spalt B ist durch eine größere Standardabweichung der Spaltbreiten charakterisiert, so dass Spalt A für zukünftige Anwendungen geeigneter scheint, da die Werte der Wundbreiten kleinere Standardabweichungen aufweisen.

Bei den Mono-Kulturen waren die Abweichungen Spalt B betreffend am deutlichsten. Die Wunde der HDMEC-Mono-Kulturen maß im Mittel 1400 μm im Gegensatz zur Wunde der NHDF-Mono-Kulturen, die nur 690 μm betrug. Entweder war es bei den HDMEC im Gegensatz zu den NHDF zu einem Zurückweichen vom Wundrand gekommen oder der Monolayer wurde beim Kratzprocedere stärker beschädigt und mitgerissen.

Das Modell bietet demnach eine gute experimentelle Basis, um den Einfluss heilungsrelevanter Parameter auf unterschiedliche Zelltypen zu überprüfen.

Die Parameter dieser Studie waren:

1. Die Migration und Proliferation der verschiedenen Zelltypen und die MF Differenzierung.
2. Hypoxie, die zu Beginn der Wundheilung ein essentieller Faktor ist (Trabold et al. 2003).
3. TGF- β_1 , welches einer der Wachstumsfaktoren ist, der intensiv in die Wundheilung involviert ist (Border & Ruoslahti 1992).

Morphologische Charakteristika

Eine auffällige räumliche Organisation mit Endothelzellen im Zentrum und peripher lokalisierten Fibroblasten war bereits in anderen Studien festgestellt worden (Wenger et al. 2005). In dem Fall waren HUVEC mit humanen Fibroblasten co-kultiviert worden. Unsere Ergebnisse ließen ebenfalls nach 24 h in fast allen Co-Kulturen eine entsprechende Anordnung der HDMEC und MF, welche als Clusteranordnung bezeichnet werden kann, erkennen. Dieses weist auf eine direkte Kommunikation der Zellen hin. Die Interaktion zwischen Endothelzellen und MF ist für die Gefäßentwicklung und -funktion von zentraler Bedeutung (Williams & Wick 2005). In einer vorherigen Studie führte die Co-Kultivierung von Endothelzellen und MF zu einer signifikanten Zunahme der Zellproliferation und Abnahme der Kollagen- und Proteoglykanproduktion. Des Weiteren nahm die Kontraktilität der MF unter Co-Kultivierung zu (Williams & Wick 2005).

Darüber hinaus entdeckten wir strukturelle, zeitabhängige Unterschiede der Clusterformation. So lag nach 24 h eine eher scheibenähnliche Struktur und nach 48 h eine ringförmigere Struktur vor.

ET-1, welches die MF-Differenzierung und -Migration hauptsächlich über den ET-A Rezeptor triggert, wird insbesondere durch HDMEC freigesetzt (Shi-Wen et al. 2004). Unsere Ergebnisse bestätigten dies dadurch, dass wir eine ET-1-Expression nur bei den HDMEC zeigen konnten. In den Clustern waren diejenigen HDMEC, die ET-1 stark exprimierten überwiegend in der Peripherie und somit in der Nähe der MF lokalisiert.

ET-1 scheint damit in unserem Modell maßgeblich für die Differenzierung zu MF verantwortlich zu sein.

Proliferation

Unter Nutzung der Möglichkeit, Zellproliferation durch Zellzählung festzustellen (Calderon et al. 1996), fanden wir große Unterschiede bei den mono-kultivierten Zelltypen.

Einerseits ist die Proliferation der NHDF bereits als dichteabhängig beschrieben worden, wobei die Proliferation der NHDF in vitro um so größer ist, je geringer die Dichte ist (Powell et al. 1999, Masur et al. 1996). Dies bestätigten auch unsere mono-kultivierten NHDF, da wir innerhalb der ersten 24 h unter Normoxie die stärkste Proliferation fanden.

Andererseits wurde neben der dichteabhängigen Proliferation der NHDF auch bereits ein Einfluss durch Co-Kultivierung beschrieben. Dabei zeigten menschliche kardiale Fibroblasten eine Zunahme der DNA-Synthese bei Co-Kultivierung mit HUVEC und unterdrückten gleichzeitig die Proliferation der HUVEC (Zhao & Eghbali-Webb 2001). Unsere Ergebnisse zeigten bei den co-kultivierten NHDF eine 7-fach höhere Proliferationsaktivität als bei den HDMEC. Bei diesen führte die Co-Kultivierung sogar zur Abnahme der Proliferation verglichen mit der Mono-Kultur. Die Co-Kultur scheint die NHDF in ihrer Proliferation positiv zu beeinflussen. Demgegenüber scheinen die NHDF die HDMEC in ihrer Proliferation zu hemmen, dabei können es nicht die generellen Kulturbedingungen sein, die unterschiedlich Einfluss ausmachen, da sowohl die Co-Kultur als auch die Mono-Kultur mit Endothelzell- und Fibroblastenmedium im Verhältnis 3:1 versorgt worden sind. Der positive Proliferationseffekt der NHDF kann, wie Zhao es 2001 bereits beschrieben hat, durch die HDMEC zustande gekommen sein. Die gleichzeitig beobachtete Proliferationshemmung der HDMEC durch die NHDF stimmt mit den Ergebnissen der vorherigen Studie überein.

Des Weiteren fand man schon eine Unterdrückung der Endothelzellproliferation in Co-Kultur mit Perizyten, welche durch direkte Zell-Zell-Kontakte zustande kam (Orlidge & D`Amore 1987). Da es bei uns, auf Grund der hohen Zelldichte zu Versuchsbeginn, auch zu direkten Zell-Zell-Kontakten kam, kann man hier ebenfalls von einem negativen, die Proliferation der HDMEC unterdrückenden Effekt, der NHDF ausgehen.

Migration

Neben der Proliferation ist die Migration der Zellen essentiell für die Wundheilung, damit es zu einem Wundschluss kommen kann.

In unserem Modell fanden wir nicht nur nach 24 h, sondern auch nach 48 h, eine signifikante Abnahme der Wundbreite. Dies betraf sowohl die Co-Kulturen als auch beide Mono-Kulturen. Der Vergleich der Mono-Kulturen und Co-Kulturen zeigte, dass der Wundschluss der HDMEC-Mono-Kulturen langsamer war als der der Co-Kulturen. Insbesondere wegen der nur konstant bleibenden Zellzahl der HDMEC in der Co-Kultur können diese dort nicht wesentlich zum Wundschluss beitragen.

Des Weiteren scheint in der Co-Kultur die Migration der NHDF durch die Anwesenheit der HDMEC gehemmt zu werden. Im Gegensatz dazu waren die NHDF-Mono-Kulturen durch einen schnelleren und nach 48 h sogar kompletten Wundschluss charakterisiert.

Ein anderer Grund für den besseren Wundschluss der NHDF in Mono-Kultur könnte die initial schmalere Wundbreite beider Spalte ($894 \pm 111 \mu\text{m}$ und $692 \pm 269 \mu\text{m}$) sein.

An den Wundrändern, den vorherrschenden Orten der Migration, konnte man Unterschiede der EDA-Fn-Expression der NHDF erkennen. Dabei fiel das unterschiedliche Expressionsmuster von Fibronectin auf (Serini et al. 1998). Wir fanden eine eher granuläre Expression des Fibronectins bei Fibroblasten im Wundrandbereich. Im übrigen Monolayer überwog eher eine faserförmige Fibronectinform.

Dies legt nahe, dass sich die faserförmige Struktur des EDA-Fn während der Zellmigration auflöst, als granuläre zu sehen ist, bis die Zelle aufhört zu migrieren und dann wieder EDA-Fn Faserform organisiert.

Myofibroblasten-Differenzierung

Bereits im frühen Stadium der Wundheilung kommt es zur Differenzierung von Fibroblasten zu MF (Moulin et al. 1998). Sie ist essentiell für das Granulationsgewebe und einen effizienten und schnellen Wundschluss (Serini et al. 1998). In unserem Setup fanden wir zu jedem Zeitpunkt differenzierte Fibroblasten. Ihr prozentualer Anteil nahm mit der Zeit ab.

Die Anzahl der MF war in der NHDF-Mono-Kultur während 48 h stabil, was in Anbetracht der starken Zunahme nicht differenzierter NHDF einer prozentualen Abnahme entspricht. Deshalb korreliert bei uns, wie in anderen Studien bereits beschrieben (Masur et al. 1996), die MF-Zahl umgekehrt zur Zelldichte der Kultur. Auch in der Co-Kultur war die MF-Anzahl stabil. Das lässt darauf schließen, dass die Differenzierung der MF eher durch die generellen Kulturbedingungen, die Dichte der Zellen und die Kulturmedien beeinflusst wurde, als durch HDMEC.

Drei Faktoren sind wichtig für die Differenzierung von Fibroblasten zu MF: der Verlust der Zell-Zell-Kontakte, mechanischer Stress und TGF- β_1 (Masur et al. 1996; Gabbiani 2003; Powell et al. 1999).

TGF- β_1 wurde bereits mehrfach als Hauptinduktor der MF-Differenzierung beschrieben (Shepard et al. 2004; Moulin et al. 1998; Serini et al. 1998). Diesen differenzierungsinduzierenden Einfluss von TGF- β_1 in vitro (Desmouliere et al. 1993; Ronov-Jessen & Petersen 1993) fanden wir auch bei den normoxisch kultivierten NHDF. Allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant, welches eine Folge der hohen Zelldichte sein könnte.

Die Anwesenheit von HDMEC in der Co-Kultur könnte einen Einfluss auf die MF-Differenzierung haben. In der Mono-Kultur mit TGF- β_1 manifestiert sich sowohl nach 24 h, als auch nach 48 h, unter TGF- β_1 -Zugabe eine leichte Zunahme der MF-Proliferation. Unter zusätzlicher Hypoxie entdeckten wir eine leichte Populationsabnahme. Die Zellzahl der co-kultivierten MF war wesentlich konstanter, so dass wir durch TGF- β_1 -Zugabe keine Proliferationsunterschiede fanden. Andere Studien bestätigten bereits den positiven Einfluss auf die Differenzierung von Fibroblasten zu MF durch die Co-Kultivierung mit verschiedenen anderen Zellarten (Powell et al. 1999).

Einfluss von ET-1

Vorherige Studien zeigten, dass es nach Verletzungen durch aktivierte Endothelzellen zur ET-1-Synthese kommt (Serini & Gabbiani 1999). In der Co-Kultur wurde ET-1 nur von HDMEC freigesetzt.

Es wird vermutet, dass ET-1 den Einfluss der HDMEC auf die Fibroblasten-Differenzierung vermittelt (Sun et al. 1997; Kernochan et al. 2002; Shi-Wen et al. 2004). Dies bestätigt unsere Studie mit der Clusteranordnung, welche aus einem Kern von HDMEC und MF in der Peripherie besteht. Auffällig ist bei dieser Anordnung die ET-1-Expression, die bei den peripher und somit näher an den MF gelegenen HDMEC höher war als bei den zentral gelegenen HDMEC.

Außerdem wurden synergistische Effekte von ET-1 und TGF- β_1 beschrieben (Shepard et al. 2004). Unsere Ergebnisse bestätigen dies, denn unter TGF- β_1 fanden wir sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine ET-1-Zunahme im Überstand des HDMEC Mediums.

Darüber hinaus fanden wir einen Zusammenhang zwischen ET-1 und Hypoxie. Nach 24 h Hypoxie stellten wir eine ET-1-Abnahme im Überstand des HDMEC-Mediums fest. Viele andere Studien belegen eine Zunahme der ET-1-Sekretion durch Endothelzellen nach 24 h und nach 48 h Hypoxie (Kourembanas et al 1991; Basilico et al. 2002), aber es gibt auch Studien, die die Abnahme von ET-1 in Abhängigkeit von Hypoxie zeigen (Saito et al. 1998).

Die ET-1-Expression wird durch den Hypoxie induzierten Faktor-1 (HIF-1) reguliert (Minchenko & Caro 2000). Es gibt einerseits Beweise dafür, dass der HIF-1 das ET-1-Gen Hypoxie-abhängig bindet (Bodi et al. 1995), andererseits belegen Studien, dass diese Bindung sowohl durch Normoxie als auch durch Hypoxie aktiviert wird (Spinella et al. 2002).

Des Weiteren verstärkt ET-1 die Proliferation der Fibroblasten (Kernochan et al. 2002; Gallelli et al. 2005) und die Differenzierung zu MF (Sun et al. 1997; Gallelli et al. 2005). Basierend auf unserem Setup müssen wir annehmen, dass geringe ET-1-Konzentrationen in Kombination mit TGF- β_1 und Hypoxie zu einer gesteigerten Differenzierung von MF führten. Ein stimulierender Effekt von ET-1 auf die Migration (Kernochan et al. 2002; Shi-Wen et al. 2004) und Proliferation (Mallat et al. 1995; Kernochan et al. 2002) von MF wurde bereits beschrieben. Wir fanden unterschiedliche Effekte von ET-1, einerseits den Phasen der Wundheilung

entsprechend und andererseits konzentrationsabhängig (siehe auch Abb. 50). Während der frühen Wundheilung liegen nur geringe ET-1-Konzentrationen vor, die vor allem die Differenzierung zu MF beeinflussen. Die späte Wundheilung ist hingegen eher durch hohe ET-1-Konzentrationen gekennzeichnet, welche auf die Fibroblasten-Proliferation und -Migration Einfluss nehmen. Diese Einflussnahme erfolgt über den Endothelin-A- (ET-A) Rezeptor, der sich auf der Oberfläche der Fibroblasten befindet (Shi-Wen et al. 2004).

Einfluss von Hypoxie

Hypoxie ist entscheidend, um die frühe Phase der Wundheilung zu triggern. Chronische Hypoxie ist hingegen ein Grund für verminderte Heilung und kann zur Fibrose führen (Chen et al. 1995). Der Einfluss von Hypoxie auf die Proliferation von adhärennten Zellen in vitro ist unterschiedlich beschrieben.

Unsere Ergebnisse zeigten bei hypoxisch kultivierten Co-Kulturen deutliche Unterschiede bezüglich der Abnahme der Zelldichte. So betrug die Abnahme der NHDF nur 32% in der Co-Kultur, im Unterschied zu den HDMEC, deren Dichte in der Co-Kultur um 50% geringer war als unter Normoxie. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die NHDF-Proliferation von der Co-Kultivierung profitierte, wohingegen die HDMEC Hypoxie schlechter tolerieren.

Im Falle unserer Mono-Kulturen fanden wir unter Hypoxie eine um 12% höhere Abnahme der NHDF-Zelldichte als bei den Co-Kulturen. Bei den HDMEC war die Abnahme unter Hypoxie in der Mono-Kultur um 6% geringer als in der Co-Kultur. Dies bestätigt, dass die Proliferation der NHDF unter Hypoxie mehr von der Co-Kultivierung profitiert hat, als die Proliferation der HDMEC.

Andere Studien zeigen sogar eine Proliferationszunahme von Fibroblasten unter akuter Hypoxie (Falanga & Kirsner, 1993), wohingegen die Proliferation unter chronischer Hypoxie abnimmt (Siddiqui et al. 1996). Dies ist allerdings schwierig zu beurteilen, da die Termini akute und chronische Hypoxie unterschiedlich definiert und interpretiert werden.

Zur reduzierten Proliferation der co-kultivierten Zellen kam eine reduzierte Zellmigration mit einem entsprechend schlechteren Wundschluss hinzu. Die Migration von mono-kultivierten HDMEC nahm unter Hypoxie signifikant ab. Auch

die NHDF-Migration wird durch Hypoxie vermindert, allerdings nicht signifikant. Dies ist ein Ergebnis, welches von der vorliegenden Literatur abweicht, denn dort wurde ein migrationsfördernder Effekt von Hypoxie auf Fibroblasten beschrieben (Li et al. 2007). Andere Studien zeigten aber auch einen schützenden Einfluss von Fibroblasten auf Endothelzellen in Co-Kultur unter Hypoxie (Zhao & Eghbali-Webb 2001). Unsere Ergebnisse zeugen eher von einem schützenden Effekt der HDMEC auf die NHDF in der Co-Kultur. Dieser Effekt betrifft sowohl die Migration als auch die Proliferation.

Einfluss von TGF- β_1

Es gibt bezüglich der Wirkung von TGF- β_1 auf die Zellen im Rahmen der Wundheilung unterschiedliche Ergebnisse der in vitro Studien.

Einerseits fand man nach TGF- β_1 -Zugabe eine reduzierte Proliferation der NHDF (Ronnov-Jessen & Petersen 1993) und HDMEC (Merwin et al. 1991; Sankar et al. 1996; Grotendorst et al. 2004), andererseits wurde auch schon ein proliferationsfördernder Effekt von TGF- β_1 auf NHDF beschrieben (Grotendorst et al. 2004). Die primäre TGF- β_1 -Quelle stellen Thrombozyten dar.

Die Funktion von TGF- β_1 während der Wundheilung wurde bereits als zeit- (Moulin et al. 1998) und konzentrationsabhängig (Chambers et al. 2003) beschrieben. Bei hoher TGF- β_1 -Konzentration zu Beginn kommt es zur Migration von Fibroblasten ins Wundgebiet, danach kommt es zur vermehrten Differenzierung zu MF und am Ende zu einer starken Abnahme der TGF- β_1 -Konzentration (Border & Ruoslahti 1992; Desmouliere 1995).

In unserem Setup wurde die Proliferation der mono-kultivierten NHDF und HDMEC durch TGF- β_1 unter Normoxie nicht signifikant beeinflusst. Die nicht vorhandene Effektivität von TGF- β_1 auf die Proliferation in unserem Setup könnte in die relativ hohe initiale Zelldichte, welche notwendig ist, um adäquate in vitro Wunden zur Verfügung zu haben, begründet sein. Die Co-Kultivierung von HDMEC und NHDF ließ unter Normoxie ebenfalls keine signifikanten Effekte von TGF- β_1 auf die Proliferation oder Migration der Zellen erkennen. Allerdings war sowohl nach 24 h als auch nach 48 h ein proliferationshemmender Einfluss von

TGF- β_1 festzustellen. Bei beiden Zelltypen zeigte sich nach 48 h sogar ein signifikanter, die Proliferation hemmender, Einfluss von TGF- β_1 .

TGF- β_1 wurde bereits sowohl bei Fibroblasten (Postlethwaite et al. 1987) als auch bei Endothelzellen (Saito et al. 2003) in vorherigen Studien als migrationssteigernd beschrieben. In unserem Setup bestätigten dies sowohl die mono-kultivierten HDMEC als auch die NHDF mit einer, wenn auch nicht signifikanten, Migrationszunahme unter TGF- β_1 .

Die mono-kultivierten HDMEC zeigten erst nach 48 h eine Abnahme des migrationsfördernden Effektes von TGF- β_1 . Dies könnte durch Zell-Zell-Kontakte, die auf der hohen Zelldichte nach 48 h basieren, zustande kommen. Bei Endothelzellen beeinflussen diese Zell-Zell-Kontakte die Zellmigration negativ (Stahl et al. 2004). Zusammenfassend kann man somit auch hier von einem den Wundschluss beschleunigenden Effekt von TGF- β_1 sprechen (Sankar et al. 1996).

Einfluss von TGF- β_1 und Hypoxie

Auffällig war das unterschiedliche Verhalten der hypoxisch kultivierten Zellen, die unter TGF- β_1 -Einfluss standen. Bei den mono-kultivierten HDMEC fanden wir einen leichten, nicht signifikanten, proliferationshemmenden Einfluss von TGF- β_1 , verglichen mit den Normoxiekulturen. Dies bestätigt den bereits in mehreren Studien beschriebenen proliferationshemmenden Einfluss von TGF- β_1 auf Endothelzellen (Sankar et al. 1996; Roberts et al. 1986; Merwin et al. 1991).

Fraglich ist allerdings, warum unter hypoxischen Bedingungen mit TGF- β_1 -Zugabe der erwartete additive proliferationshemmende Effekt nicht zu deutlicheren Unterschieden geführt. Darüber hinaus wurde bereits eine vermehrte Produktion von TGF- β_1 durch Hypoxie beschrieben (Chen et al. 1995; Falanga et al. 1991). Dies sollte ebenfalls zu einem additiven proliferationshemmenden Effekt führen, was unsere Ergebnisse allerdings nicht bestätigen.

Die mono-kultivierten NHDF verhielten sich nicht wie die HDMEC. In vorherigen Studien wurde unter anderem bereits beschrieben, dass TGF- β_1 unter Normoxie die Proliferation von NHDF stimuliert (Grotendorst et al. 2004). Unsere Ergebnisse bestätigen dies, auch wenn die Unterschiede der normoxischen NHDF Kulturen

mit, bzw. ohne TGF- β_1 -Zugabe nicht signifikant waren. Die hypoxischen NHDF-Mono-Kulturen mit TGF- β_1 -Zugabe zeigten allerdings gegensätzliche Ergebnisse, es kam zur Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Hypoxiekultur ohne TGF- β_1 . Man könnte vermuten, dass Hypoxie die wachstumsfördernde Wirkung von TGF- β_1 in diesem Fall aufhebt. Dies steht jedoch im Widerspruch zu der Tatsache, dass O₂-Entzug die TGF- β_1 Produktion erhöht (Chen et al. 1995; Falanga et al. 1991). Auch wenn diese Ergebnisse nicht signifikant sind, so ist doch das prinzipiell konträre Verhalten der mono-kultivierten NHDF und HDMEC nach Hypoxie auffällig.

Die Migrationsabnahme von mono-kultivierten NHDF wurde durch TGF- β_1 unter Hypoxie nicht signifikant gemindert. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von anderen Studien, bei denen ein additiver stimulierender Effekt von TGF- β_1 und Hypoxie festgestellt worden war (Mogford et al. 2002). Ein Grund für dieses unterschiedliche Verhalten könnte die Tatsache sein, dass unterschiedliche Mangelbedingungen in den Modellen vorliegen, die die Effektivität von TGF- β_1 maßgeblich beeinflussen (Li et al. 2007). Wir nutzten ein komplettes Medium für die Zellkultur.

Wundheilung

Aus den oben diskutierten Ergebnissen der Studie haben wir folgendes Modell abgeleitet (Abb. 50) (Oberringer et al. 2007, *Biology of the Cell*). Es zeigt die Interaktion von Endothelzellen, Fibroblasten und MF während der Wundheilung (Oberringer et al. 2007, *Journal of Molecular Histology*). Darüber hinaus ist der Verlauf der zellulären Mediatoren und molekularer und physiologischer Parameter während der Wundheilung *in vivo* dargestellt (Thiemermann & Corder 1992).

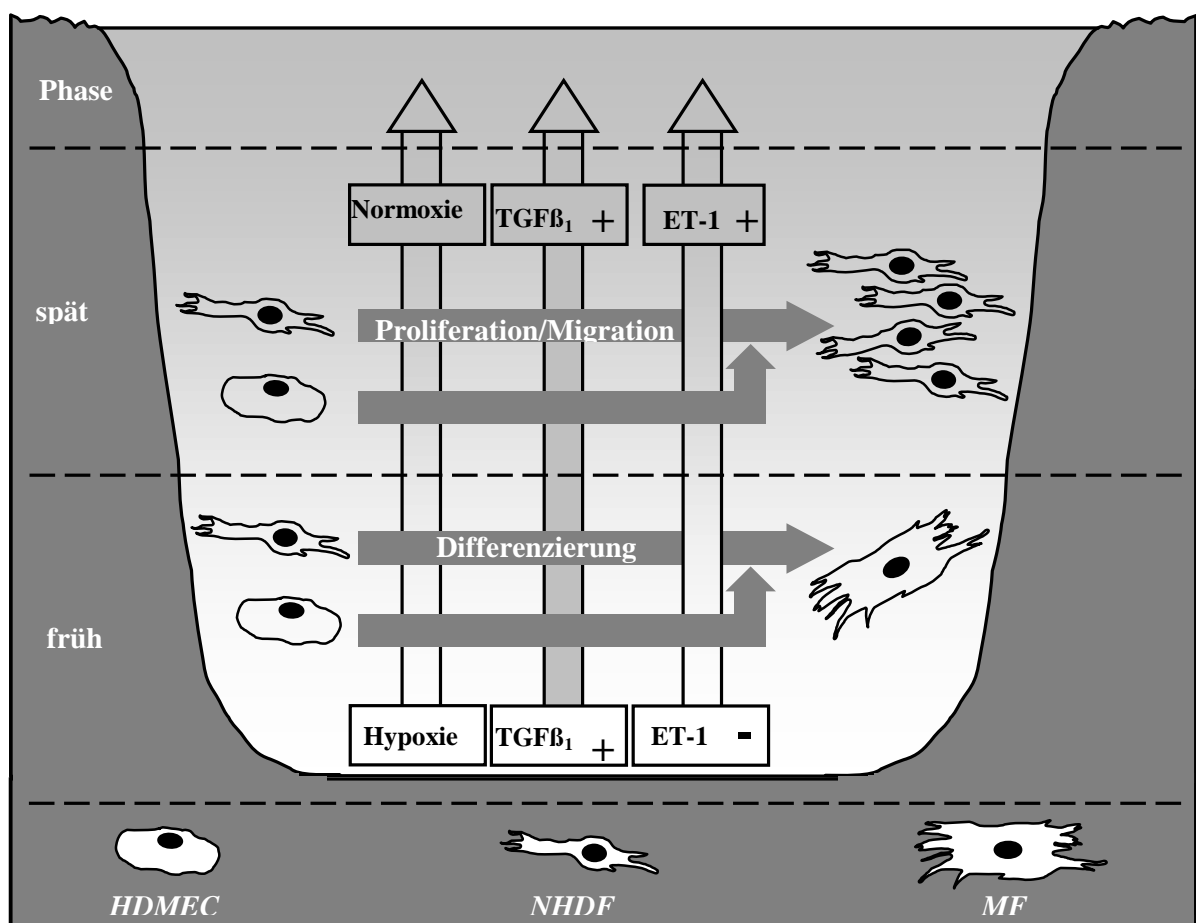


Abbildung 50: Wundheilung

Zelluläre, molekulare und physiologische Zellinteraktionen in der frühen und späten Proliferationsphase der Wundheilung (Oberringer et al. 2007, *Journal of Molecular Histology*).

Der primären Blutstillung direkt nach einer Verletzung folgt die Entzündungsphase. Die Auffüllung des Wunddefektes erfolgt erst in der Proliferationsphase (Hunt 1988). Durch die Gefäßverletzung liegen in der frühen Proliferationsphase hypoxische Verhältnisse vor. Das Wundmilieu ist durch die Freisetzung von TGF- β_1 aus Blutplättchen und außerdem durch geringe ET-1-Konzentrationen gekennzeichnet (Moulin et al. 1998). Hypoxie und auch mechanische Stimuli sind wichtig für die Entstehung von MF aus den ins Wundgebiet einwandernden Fibroblasten (Serini & Gabbiani 1999; Tomasek et al. 2002).

Geringe ET-1-Konzentrationen bewirken eine Zunahme der Differenzierung zu MF, welche durch Auflagerung auf die Mikrogefäße deren Kontraktilität und damit die Vasoaktivität steigern. Bei großen Gefäßen übernehmen Pericyten diese Aufgabe (Powell et al. 1999). In unserem Co-Kultur-Setup manifestierten sich die Interaktionen der MF und HDMEC in einer Anordnung, bei der die MF generell in unmittelbarer Umgebung der HDMEC peripher um sie lokalisiert waren.

Während der späten Proliferationsphase ändert sich das Milieu, welches zuvor die Migration und Proliferation der NHDF zu einem gewissen Grad unterdrückt hat. Dieses Milieu ist durch Normoxie, eine höhere Menge an ET-1 und eine konstant hohe Menge an TGF- β_1 gekennzeichnet. Dadurch fällt der hemmende Effekt von Hypoxie weg, was zur verstärkten Migration und Proliferation der NHDF führt (Kernochan et al. 2002; Postlethwaite et al. 1987). Neben der Zellmasse tragen die Ablagerung von Kollagen und ECM-Proteinen zur Defektfüllung bei.

Fazit und Perspektiven

Die Ergebnisse des CCSWMA zeigen, dass dieser neue Ansatz insbesondere dazu geeignet ist, Abläufe der humanen Wundheilung *in vitro* zu analysieren und auf die Verhältnisse *in vitro* zu übertragen.

Die *in vivo*-Wundsituation wird im CCSWMA *in vitro* gut dargestellt, da zum einen die mengenmäßige Verteilung der Zellen zueinander gut mit der Situation in einer Wunde *in vivo* vergleichbar ist: die am stärksten vertretene Population der Fibroblasten wird von einer geringeren Anzahl von Endothelzellen, welche für die Angiogenese der Mikrovaskulatur von zentraler Bedeutung sind, begleitet.

Zum anderen bietet das Modell eine ideale Basis dafür, das Auftreten, das Proliferationsverhalten und die zytomorphologischen Charakteristika von MF auf der Basis der charakteristischen MF-Endothelzell-Cluster zu untersuchen. Es erlaubt damit Rückschlüsse auf die Einflussnahme der MF im Rahmen der Neubildung der Mikrovaskulatur in regenerativem Gewebe.

Die Methodik des Modells ist aufgrund der direkten Visualisierung der zellulären Interaktion mittels immunzytochemischer Färbung und der Analyse der ins Medium abgegebenen Mediatoren sehr variabel gestaltbar. Sie bietet daher eine ideale Ausgangsbasis, Regenerations-spezifische (patho-) physiologische Parameter (z.B. Hypoxie) ebenso wie Modulatoren des Heilungsprozesses (z.B. TGF- β_1 , ET-1) *in vitro* an den Schlüsselzellen der humanen Wundheilung zu untersuchen.

Unter Vermeidung von Tierexperimenten können im Rahmen weiterer Studien andere relevante Parameter und Modulatoren mit Hilfe des CCSWMA gescreent werden. Ebenso bietet das Modell eine gute Basis, die Funktion weiterer Zelltypen, wie z.B. Keratinozyten, vor dem Hintergrund der Wundheilung zu analysieren, was durch das Anlegen von Kulturen mit anderer Zelltypkombination und durch Dreifach-Kulturen aussichtsreich erscheint. Die Erweiterung des Modells auf eine dreidimensionale Kultur auf der Basis der beobachteten Clusterbildung scheint in Zukunft ebenso möglich.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AREY LB (1936)
Wound healing, a physiological review.
Physiological Review 16: 327-406
2. ASSOIAN RK, SPORN MB (1986)
Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells.
Journal of Cell Biology 102: 1217-1223
3. BASILICO N, SPECIALE L, PARAPINI S, FERRANTE P, TARAMELLI D (2002)
Endothelin-1 production by a microvascular endothelial cell line treated with Plasmodium falciparum parasitized red blood cells.
Clinical Science 103: 464-466
4. BENNETT NT, SCHULTZ GS (1993)
Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors.
American Journal of Surgery 165: 728-736
5. BHORA FY, DUNKIN BJ, BATZRI S, ALY HM (1995)
Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin.
The Journal of Surgical Research 59: 236-244
6. BODI I, BISHOPRIC NH, DISCHER DJ, WU X, WEBSTER KA (1995)
Cell-specificity and signaling pathway of endothelin-1 gene regulation by hypoxia.
Cardiovascular Research 30: 975-984
7. BORDER WA, RUOSLAHTI E (1992)
Transforming growth factor- β in disease: The dark side of tissue repair.
The American Society for Clinical Investigation 90: 1-7
8. BRÄNDSTEDT S, RANK F, OLSON PS (1980)
Wound healing and formation of granulation tissue in normal and defibrinogenated rats. An experimental model and histological study.
European Surgical Research 12: 12-21
9. BRUNNER G; BLAKYTTY R (2004)
Extracellular regulation of TGF- β activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury.
Thrombosis and Haemostasis 92: 253-261
10. BUISSON AC, ZAHM JM, POLETTE M, PIERROT D, BELLON G, PUCHELLE E, BIREMBAUT P, TOURNIER JM (1996)
Gelatinase B is involved in the in vitro repair of human respiratory epithelium.
Journal of Cellular Physiology 166: 413-426

11. BURK RR (1973)
A factor from a transformed cell line that affects cell migration.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 70: 369-373
12. CALDERON M, LAWRENCE WT, BANES AJ (1996)
Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro.
The Journal of Surgical Research 61: 343-347
13. CALVIN JE (1998)
Clinical trial networks: a unique opportunity for critical care.
Critical Care Medicine 26(4): 625-626
14. CHA D, O'BRIEN P, O'TOOLE EA, WOODLEY DT, HUDSON LG (1996)
Enhanced modulation of keratinocyte motility by transforming growth factor- α (TGF- α) relative to epidermal growth factor (EGF).
The Journal of Investigative Dermatology 106: 590-597
15. CHAMBERS RC, LEONI P, KAMINSKI N, LAURENT GJ, HELLER RA (2003)
Global expression profiling of fibroblasts responses to transforming growth factor- β reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching.
American Journal of Pathology 162: 533-546
16. CHEN JD, LAPIERE JC, SAUDER DN, PEAVEY C, WOODLEY DT (1995)
Interleukin-1 alpha stimulates keratinocyte migration through an epidermal growth factor/transforming growth factor-alpha-independent pathway.
The Journal of Investigative Dermatology 104: 729-733
17. CLARK RAF (1985)
Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations.
Journal of the American Academy of Dermatology 306: 42-48
18. CLARK RAF (1993)
Regulation of fibroplasias in cutaneous wound repair.
The American Journal of the Medical Sciences 306: 42-48
19. CROMACK DT, PORRAS RB, MUSTOE TA (1990)
Current concepts in wound healing: growth factor and macrophage interaction.
The Journal of Trauma 30: 129-133
20. CUI P, TANI K, KITAMURA H, OKUMURA Y, YANO M, INUI D, TAMAKI T, SONE S, KIDO H (2001)
A novel bioactive 31-amino acid endothelin-1 is a potent chemotactic peptide for human neutrophils and monocytes.
Journal of Leukocyte Biology 70: 306-312
21. DESMOULIERE A, GEINOZ A, GABBIANI F, GABBIANI G (1993)
Transforming growth factor- β_1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts.
The Journal of Cell Biology 122: 103-111

22. DESMOULIERE A, GABBIANI G (1994)
Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during pathological situations:
The role of extracellular matrix and cytokines.
Cell Motility and the Cytoskeleton 29: 195-203
23. DESMOULIERE A (1995)
The healing of wounds. *Biology and Physiopathology*.
Soins 595: 5-9
24. DIEGELMANN RF, EVANS MC (2004)
Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing.
Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Liberty 9: 283-289
25. ENEROTH M, PERSSON BM (1993)
Risk factors for failed healing in amputation for vascular disease. A
prospective, consecutive study of 177 cases.
Acta Orthopaedica Scandinavica 64: 369-372
26. EUL B, ROSE F, KRICK S, SAVAI R, GOYAL P, KLEPETKO W,
GRIMMINGER F, WEISSMANN N, SEEGER W, HÄNZE J (2005)
Impact of HIF-1 α and HIF-2 α on proliferation and migration of human
pulmonary artery fibroblasts in hypoxia.
FASEB Journal 20(1): 163-165
27. FALANGA V, QIAN SW, DANIELPOUR D, KATZ MH, ROBERTS AB, SPORN
MB, (1991)
Hypoxia up regulates the synthesis of TGF-beta 1 by human dermal fibroblast.
The Journal of Investigative Dermatology 97: 634-637
28. FALANGA V, KIRSNER RS (1993)
Low oxygen stimulates proliferation of fibroblasts seeded as single cells.
Journal of Cellular Physiology 154: 506-510
29. FASSLER R, SASAKI T, TIMPL R, CHU ML, WERNER S (1996)
Differential regulation of fibulin, tenascin-C and nidogen expression during
wound healing of normal and glucocorticoid-treated mice.
Experimental Cell Research 222: 111-116
30. FLAUMENHAFT R, ABE M, SATO Y, MIYAZONO K, HARPEL J, HELDIN CH,
RIFKIN DB (1993)
Role of the latent TGF- β binding protein in the activation of latent TGF- β by the
co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells.
The Journal of Cell Biology 120: 995-1002
31. FRENCH-CONSTANT C (1995)
Alternative splicing of fibronectin – many different proteins but few different
functions.
Experimental Cell Research 221: 261-271

32. GABBIANI G (2003)
The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases.
Journal of Pathology 200: 500-503
33. GALLELLI L, PELAIA G, D'AGOSTINO B, CUDA G, VATRELLA A, FRATTO D, GIOFFRE V, GALDERISI U, DE NARDO M, MASTRUZZO C, SALINARO ET, MANISCALCO M, SOFIA M, CRIMI N, ROSSI F, CAPUTI M, CASTANZO FS, MASELLI R, MARSICO SA, CANCHERI C (2005)
Endothelin-1 induces proliferation of human lung fibroblasts and IL-11 secretion through an ET(A) receptor-dependent activation of MAP kinases.
Journal of Cellular Biochemistry 96(4): 858-868
34. GOLD LI, LEE TC, REIBMAN J, CRONSTIEN R, WEISSMANN G (1990)
TGF- β selectively induces neutrophil chemotaxis.
Journal of Cellular Biochemistry 14C: 294
35. GOTTRUP F, AGREN MS, KARLSMARK T (2000)
Models for use in wound healing research: A survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue.
Wound Repair and Regeneration 8: 83-96
36. GRINNELL F (1994)
Fibroblasts, myofibroblasts and wound contraction.
The Journal of Cell Biology 124: 401-404
37. GROTENDORST GR, MARTIN GR, PENCEV D, SODEK J, HARVEY AK (1985)
Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats.
The Journal of Clinical Investigation 76: 2323-2329
38. GROTENDORST GR, RAHMANIE H, DUNCAN MR (2004)
Combinatorial signaling pathways determine fibroblasts proliferation and myofibroblasts differentiation.
FASEB Journal 18: 469-479
39. GUTMANN A, KORNBLIHTT AR (1987)
Identification of a third region of cell-specific alternative splicing in human fibronectin mRNA.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 84: 7179-7182
40. HANSELMANN RG, MUTSCHLER WE (1998)
Significance of molecular biology research for trauma surgery exemplified by wound and bone healing.
Langenbecks Archiv für Chirurgie 115: 86-89
41. HASEGAWA T, HIROSE T, KUDO E, ABE J, HIZAWA K (1990)
Cytoskeletal characteristics of myofibroblasts of benign and reactive fibroblastic lesions.
Virchows Arch 416: 375-382

42. HATZ R (1993)
The central role of the cellular immune system in wound healing.
Krankenpflege Journal 31(9): 367-368
43. HEIMLI H, KAHLER H, ENDRESEN MJ, HENRIKSEN T, LYBERG T (1997)
A new method for isolation of smooth muscle cells from human umbilical cord arteries.
Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 57(1): 21-29
44. HERTLE MD, KUBLER MD, LEIGH IM, WATT FM (1992)
Aberrant integrin expression during epidermis wound healing and in psoriatic epidermis.
The Journal of Clinical Investigation 89: 1892-1901
45. HOCHMAN E, CASTIEL A, JACOB-HIRSCH J, AMARIGLIO N, IZRAELI S (2006)
Molecular pathways regulating pro-migratory effects of hedgehog signalling.
The Journal of Biological Chemistry 281(45): 33860-33870
46. HOSOYA A, NAKAMURA H, NINOMIYA T, YOSHIBA K, YOSHIBA N, NAKAYA H, WAKITANI S, YAMADA H, KASAHARA E, OZAWA H (2006)
Immunohistochemical Localization of α -Smooth Muscle Actin during rat molar Tooth Development.
Actin Journal of Histochemistry and Cytochemistry 54(12): 1371-1378
47. HUNT TK, NIINIKOSKI J, ZEDERFELDT B (1972)
Role of oxygen in repair processes.
Acta Chirurgica Scandinavica 138: 109-110
48. HUNT TK, KNIGHTON DR, THAKRAL KK, GOODSON WH, ANDREWS WS (1984)
Studies on inflammation and wound healing: Angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages.
Surgery 96: 48-54
49. HUNT TK (1988)
The physiology of wound healing.
Annals of Emergency Medicine 17(12): 1265-1273
50. HUNT TK (1990)
Basic principles of wound healing.
The Journal of Trauma 30: 122-128
51. HYNES RO (1990)
Fibronectins.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
52. JYUNG RW, MUSTOE JA, BUSBY WH, CLEMMONS DR (1994)
Increased wound-breaking strength induced by insulin-like growth factor I in combination with insulin-like growth factor binding protein-1.
Surgery 115: 233-239

-
53. KANNON GA, GARRETT AB (1995)
Moist healing with occlusive dressings. A clinical review.
Dermatology Surgery 21: 583-590
54. KEHRL JH, WAKEFIELD LM, ROBERTS AB, JAKOWLEW S, ALVAREZ-MON M, DERYNCK R, SPORN MB, FAUCI AS (1986)
Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth.
The Journal of Experimental Medicine 163: 1037-1050
55. KERNOCHAN LE, TRAN BN, TANGKIJVANICH P, MELTON AC, TAM SP, YEE HF (2002)
Endothelin-1 stimulates human colonic myofibroblast contraction and migration.
Gut 50: 65-70
56. KIMURA Y, TORIMURA T, UENO T, INUZUKA S, TANIKAWA K (1995)
Transforming growth factor beta 1, extracellular matrix and inflammatory cells in wound repair using a closed duodenal loop pancreatitis model rat. Immunohistochemical study.
Scandinavian Journal of Gastroenterology 30: 707-714
57. KIRCHBERG K, LANGE TS, KLEIN EC, JUNGTAUBL H (1995)
Induction of beta 1 integrin synthesis by recombinant platelet-derived growth factor (PDGF-AB) correlates with an enhanced migratory response of human dermal fibroblasts to various extracellular matrix proteins.
Experimental Cell Research 220: 29-35
58. KNIGHTON DR, HUNT TK, THAKRAL KK, GOODSON WH (1982)
Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis.
Annals of Surgery 196: 379-388
59. KOLE TP, TSENG Y, JIANG I, KATZ JL, WIRTZ D (2005)
Intracellular Mechanics of Migrating Fibroblasts.
Molecular Biology of the Cell 18(3): 910-918
60. KORNBLIHTT AR, VIBE-PETERSEN K, BARALLE FE (1984)
Human fibronectin: molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structural domain.
EMBO Journal 3: 221-226
61. KORNBLIHTT AR, PESCE CG, ALONSO CR, CRAMER P, SREBROW A, WERBAJH S, MURO AF (1996)
The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies.
FASEB Journal 10: 248-257
62. KOUREMBANAS S, MARSDEN PA, MCQUILLAN LP, FALLER DV (1991)
Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium.
The Journal of Clinical Investigation 88: 1054-1057

63. KRATZ G, JANSSON K, GIDLUND M, HAEGERSTRAND A (1995)
Keratinocyte conditioned medium stimulates type IV collagenase synthesis in cultured human keratinocytes and fibroblasts.
The British Journal of Dermatology 133: 842-846
64. KUWANO H, YANO K, OENO S, IKEBE M (1994)
Dipyrimadole inhibits early wound healing in rat skin incisions.
The Journal of Surgical Research 56: 267-270
65. LAVAN FB, HUNT TK (1990)
Oxygen and wound healing.
Clinics in Plastic Surgery 17(3): 463-472
66. LAZARUS GS, COOPER DM, KNIGHTON DR, PERCORARO RE, RODEHEAVER G, ROBSON MC (1994)
Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing.
Wound Repair and Regeneration 2(3): 165-170
67. LERMAN OZ, GALIANO RD, ARMOUR M, LEVINE JP, GURTNER GC (2003)
Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia.
American Journal of Pathology 162: 303-312
68. LEYTE A, VOORBERG J, VAN SCHIJNDEL HB, DUIM B, PANNEKOEK H, VAN MOURIK JA (1991)
The pro-polypeptide of von Willebrand factor is required for the formation of a functional Factor VIII-binding site on mature von Willebrand Factor.
Biochemical Journal 274: 257-261
69. LI W, LI Y, GUAN S, FAN J, CHENG CF, BRIGHT AM, CHINN C, CHEN M, WOODLEY DT (2007)
Extracellular heat shock protein-90a: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing.
The EMBO Journal 2007: 1-13
70. LYONS RM, MOSES HL (1990)
Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation.
European Journal of Biochemistry 187: 467-473
71. LYNCH SE (1991)
Interactions of growth factors in tissue repair.
Progress in Clinical and Biological Research 365: 341-357
72. MALLAT A, FOUASSIER L, PRAEAUX AM (1995)
Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway.
The Journal of Clinical Investigation 96: 42-49
73. MASUR SK, DEWAL HS, DINH TT, ERENBURG I, PETRIDOU S (1996)
Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 93: 4219-4223

74. MERWIN JR, NEWMAN W, BEALL LD, TUCKER A, MADRI J (1991)
Vascular cells respond differentially to transforming growth factors beta 1 and beta 2 in vitro.
American Journal of Pathology 138(1): 37-51
75. MINCHENKO A, CARO J (2000)
Regulation of Endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: Role of hypoxia responsive element.
Molecular and Cellular Biochemistry 208: 53-62
76. MOGFORD JE, TAWIL N, CHEN A, GIES D, XIA Y, MUSTOE TA (2002)
Effect of age and hypoxia on TGFbeta1 receptor expression and signal transduction in human dermal fibroblasts: impact on cell migration.
The Journal of Cellular Physiology 190: 259-265
77. MOULIN V, CASTILLOUX G, AUGER FA, GARREL D, O'CONNOR-MCCOURT MD, GERMAIN L (1998)
Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblasts.
Experimental Cell Research 238: 283-293
78. MUELLER RV, HUNT TK, TOKUNAGA A, SPENCER EM (1994)
The effect of insulin like growth factor I on wound healing variables and macrophages in rats.
Archives of Surgery 129: 262-265
79. MUSTOE TA, PIERCE GF, THOMASON A, GRAMATES P (1987)
Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta.
Science 237: 1333-1336
80. OBERRINGER M, MEINS C, BUBEL M, POHLEMANN T (2007)
A new in vitro wound model based on the co-culture of human dermal microvascular endothelial cells and human dermal fibroblasts.
Biology of the Cell 99(4): 197-207
81. OBERRINGER M, MEINS C, BUBEL M, POHLEMANN T (2007)
In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor β_1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model.
Journal of Molecular Histology PMID: 17786573
82. ORLIDGE A, D'AMORE PA (1987)
Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells.
The Journal of Cell Biology 105: 1455-1462
83. O'TOOLE EA, MARINKOVICH MP, PEAVEY CL, AMIEVA MR, FURTHMAYR H, MUSTOE TA, WOODLEY DT (1997)
Hypoxia increases human keratinocyte motility on connective tissue.
The Journal of Clinical Investigation 100: 2881-2891

84. PANKOV R, YAMADA KM (2002)
Fibronectin at a glance.
Journal of Cell Science 115: 3861-3
85. PETERS KM, KOBERG K, ROSENDAHL T, KLOSTERHALFEN B (1996)
Macrophage reactions in septic arthritis.
Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery 115: 347-350
86. PIPER HM (1990)
Cell culture techniques in heart and vessel research.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
87. POSTLETHWAITE AE, KESKI-OJA J, MOSES HL, KANG AH (1987)
Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor β .
The Journal of Experimental Medicine 165: 251-256
88. POWELL DW, MIFFLIN RC, VALENTICH JD, CROWE SE, SAADA JI, WEST AB (1999)
Myofibroblasts. I Paracrine cells important in health and disease.
American Journal of Physiology 277: C1-C19
89. RAPPOLEE DA, MARK D, BANDA MJ, WERB Z (1988)
Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: Analysis by mRNA phenotyping.
Science 241: 708-712
90. RISTOW HJ (1986)
BSC-1 growth inhibitor/type β transforming growth factor is a string inhibitor of thymocyte proliferation.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 83: 5531-5533
91. ROBERTS AB, SPORN MB, ASSOIAN RK, SMITH JM, ROCHE NS, WAKEFIELD LM, HEINE UI, LIOTTA LA, FALANGA V, KEHRL JH, FAUCI AS (1986)
Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 83: 4167-4171
92. ROH C, LYLE S (2006)
Cutaneous stem cells and wound healing.
Pediatric Research 59: 100-103
93. RONNOV-JESSEN L, PETERSEN OW (1993)
Induction of α -smooth-muscle actin by transforming growth factor- β_1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia.
Laboratory Investigation 68: 696-707

-
94. SAITO M, HAMASAKI M, SHIBUYA M (2003)
Induction of tube formation by angiopoietin-1 in endothelial cell/fibroblast co-culture is dependent on endogenous VEGF.
Cancer Science 94: 782-790
95. SAITO T, ITOH H, CHUN T, IGAKI T, MORI Y, YAMASHITA J, DOI K, TANAKA T, INOUE M, MASATSUGU K, FUKUNAGA Y, SAWADA N, TOJO K, SAITO Y, HOSOYA T, NAKAO K (1998)
Oxidative stress suppresses the endothelial secretion of endothelin.
Journal of Cardiovascular Pharmacology 31(1): 345-347
96. SANKAR S, MAHOOTI-BROOKS N, BENSEN L, MNCCARTHY TL, CENTRELLA M, MADRI JA (1996)
Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis.
The American Society for Clinical Investigation 97(6): 1436-1446
97. SCHILLING JA (1976)
Wound healing.
The Surgical Clinics of North America 56(4): 859-874
98. SCHMIDT RF, THEWS G (1995)
Physiologie des Menschen, 26. Auflg.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
99. SCHWARZBAUER JE, PATEL RS, FONDA D, HYNES RO (1987)
Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript.
EMBO Journal 6: 2573-2580
100. SEHESTAD M, HOU-JENSEN K (1981)
Factor-VIII related antigen as an endothelial cell marker in benign and malignant diseases.
Virchows Archive 391: 217-225
101. SERINI G, BOCHATON-PIALLAT ML, ROPRAZ P, GEINOZ A, BORSI L, ZARDI L, GABBIANI G (1998)
The fibronectin domain EDA is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta 1.
The Journal of Cell Biology 142(3): 873-881
102. SERINI G, GABBIANI G (1999)
Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation.
Experimental Cell Research 250: 273-283
103. SHEPARD P, HINZ B, SMOLA-HESS S, MEISTER JJ, KRIEG T, SMOLA H (2004)
Dissecting the roles of endothelin, TGF- β and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes.
Thrombosis and Haemostasis 92: 262-274

-
104. SHI-WEN X, CHEN Y, DENTON CP, EASTWOOD M, RENZONI EA, BOUGHARIOS G, PEARSON JD, DASHWOOD M, DU BOIS RM, BLACK CM, LEASK A, ABRAHAM DJ (2004)
Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts.
Molecular Biology of the Cell 15: 2707-2719
105. SIDDIQUI A, GALIANO RD, CONNORS D, GRUSKIN E, WU L, MUSTOE TA (1996)
Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts: acute versus chronic hypoxia.
Wound Repair and Regeneration 4: 211-218
106. SIMPSON DM, ROSS R (1972)
The neutrophilic leukocyte in wound repair. A study with antineutrophil serum.
The Journal of Clinical Investigation 51(8): 2009-2023
107. SINGER AJ, CLARK RA (1999)
Cutaneous wound healing.
The New England Journal of Medicine 341(10): 738-746
108. SKALLI O, ROPRAZ P, TRZECIAK A, BEBTONANA G, GILLESSEN D, GABBIANI G (1986)
A monoclonal antibody against smooth-muscle-actin: a new probe for smooth muscle differentiation.
Journal of Cell Biology 103: 2787-2796
109. SPINELLA F, ROSANO L, DI CASTRO V, NATALI PG, BAGNATO A (2002)
Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible Factor-1alpha in ovarian carcinoma cells.
Journal of Biological Chemistry 277: 27850-27855
110. SPRINGFIELD DS (1993)
Surgical wound healing.
Cancer treatment and Research 67: 81-98
111. STAHL A, WENGER A, WEBER H, STARK GB, AUGUSTIN HG, FINKENZELLER G (2004)
Bidirectional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model.
Biochemical and Biophysical Research Communications 322: 684-692
112. SUN G, STACEY M, BELLINI A, MARINI M, MATOLLI S (1997)
Endothelin-1 induces bronchial myofibroblast differentiation.
Peptides 18(9): 1449-1451

113. TANDARA AA, MUSTOE TA (2004)
Oxygen in wound healing-more than a nutrient.
World Journal of Surgery 28: 294-300
114. THIEMERMANN C, CORDER R (1992)
Is endothelin-1 the regulator of myofibroblast contraction during wound healing?
Laboratory Investigation 67(6): 667-669
115. TIBBS MK (1997)
Wound healing following radiation therapy: a review.
Radiotherapy and Oncology 42(2): 99-106
116. TIJSSEN P (1985)
Practice & Theory of Enzyme Immunoassays.
Elsevier, Amsterdam
117. TOMASEK JJ, GABBIANI G, HINZ B, CHAPONNIER C, BROWN RA (2002)
Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodeling.
Molecular and Cellular Biology 3: 349-363
118. TRABOLD C, WAGNER S, WICKE C, SCHEUENSTUHL H, HUSSAIN Z, ROSEN N, SEREMETIEV A, BECKER HD, HUNT TK (2003)
Lactate and oxygen constitute a fundamental regulatory mechanism in wound healing.
Wound Repair and Regeneration 11: 504-509
119. TSUBOI R, RIFKIN DB (1990)
Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice.
The Journal of Experimental Medicine 172: 245-251
120. TSUNAWAKI S, SPORN M, DING A, NATHAN C (1988)
Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β .
Nature 334: 260-262
121. VALE W, HUSEH A, RIVIER C, YU J (1990)
The inhibin/activin family of hormones and growth factors.
Handbook of Experimental Pharmacology. Peptide Growth Factors and Their Receptors. M.B. Sporn and A.B. Roberts.
Springer, Berlin Heidelberg New York 211-248
122. VAUGHAN MB, HOWARD EW, TOMASEK JJ (2000)
Transforming growth factor- β 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast.
Experimental Cell Research 257: 180-189
123. VOGGENREITER G, DOLD (2004)
Wundtherapie
Thieme, Stuttgart New York

124. VOISARD R, KOSCHNICK S, BAUR R, VOGEL U, MATTFELDT T, HEMMER W, HANNEKUM A, HÖHER M, HOMBACH V (1997)
High-dose diltiazem prevents migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in various in-vitro models of human coronary restenosis
Coronary Artery Disease 8: 189-201
125. WAHL SM, HUNT DA, WAKEFIELD LM, MCCARTNEY-FRANCIS N, WAHL LM, ROBERTS AB, SPRON MB (1987)
Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84: 5788-5792
126. WATANABE S, HIROSE M, YASUDA T, MIYAZAKI A, SATO N (1994)
Role of actin and calmodulin in migration and proliferation of rabbit gastric mucosal cells in culture.
Journal of Gastroenterology and Hepatology 9: 325-333
127. WEIBEL E, PALADE G (1964)
New cytoplasmic components in arterial endothel.
Journal of Cell Biology 23: 101-106
128. WENDEL M; PETZOLD A; KOSLOWSKI R, KASPER M, AUGSTEIN A, KNELS L, BLEYL JU, KOCH T (2004)
Localization of endothelin receptors in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat.
Journal of Histochemistry and Cell Biology 122: 507-517
129. WENGER A, KOWALEWSKI N, STAHL A, MEHLHORN AT, SCHMAL H, STARK GB, FINKENZELLER G (2005)
Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering.
Cells Tissues Organs 181: 80-88
130. WERNER S, PETERS KG, LONGAKER MT, FULLER PF (1992)
Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing.
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89: 6896-6900
131. WILLIAMS C, WICK TM (2005)
Endothelial cell-smooth muscle cells co-Culture in a perfusion bioreactor system.
Annals of Biomedical Engineering 33(7): 920-928
132. XIA YP, ZHAO Y, TYRONE JW, CHEN A, MUSTOE TA (2001)
Differential activation of migration by hypoxia in keratinocytes isolated from donors of increasing age: implication for chronic wounds in the elderly.
The Journal of Investigative Dermatology 116: 50-56

133. YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI Y, MITSUI Y, YAZAKI Y (1988)
A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.
Nature 332: 411-415
134. YANG L, QIU CX, LUDLOW A, FERGUSON MWJ, BRUNNER G (1999)
Active Transforming Growth Factor- β in Wound Repair.
American Journal of Pathology 154: 105-110
135. ZARDI L, CARNEMOLLA B, SIRI A, PETERSEN TE, PAOLELLA G, SEBASTIO G, BARALLE FE (1987)
Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon.
EMBO Journal 6: 2337-2342
136. ZHAO L, EGHBALI-WEBB M (2001)
Release of pro- and anti-angiogenic factors by human cardiac fibroblasts: effects on DNA synthesis and protection under Hypoxia in human endothelial cells.
Biochemica and Biophysica Acta 1538: 273-282
137. ZUPANCIC G, OGDEN D, MAGNUS CJ, WHEELER-JONES C, CARTER TD (2002)
Differential exocytosis from human endothelial cells evoked by high intracellular Ca²⁺ concentration.
Journal of Physiology 544(3): 741-755

PUBLIKATIONEN

Poster:

Oberringer M, Jennewein M, Motsch SE, Schmitz K, Meins C, Seekamp A, Pohlemann T

Effects of transient hypoxia in different cell culture models of human dermal microvascular endothelial cells.

Cytotherapy 8 (Supplement2): 53 (2006)

Vortrag:

Oberringer M, Meins C, Pohlemann T

Characteristics of two-dimensional endothelial cell-fibroblast co-cultures.

Cytotherapy 8 (Supplement 2):23 (2006)

Vortrag:

Oberringer M, Meins C, Pohlemann T

Charakteristik der Co-Kultur von humanen mikrovaskulären Endothelzellen und Fibroblasten und ihre Verwendung in einem in vitro-Wundheilungs-Assay.

German Medical Science (2006)

Artikel:

Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T

A new in vitro wound model based on the co-culture of human dermal microvascular endothelial cells and human dermal fibroblasts.

Biology of the Cell 99(4): 197-207 (2007), (Immediate Publication, DOI: 10.1042/BC20060116)

Artikel:

Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T

In vitro wounding: Effects of hypoxia and transforming growth factor β_1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model.

Journal of Molecular Histology (2007), (epub ahead of print 04.09.2007, DOI:10.1007/s10735-007-9124-3)

Poster:

Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T

A new in vitro co-culture model composed of human dermal microvascular endothelial cells and human dermal fibroblasts to investigate the cellular response towards hypoxia and transforming growth factor β_1

Langenbecks Arch Surg 392: 826 (2007)

DANKSAGUNG

Bei dieser Arbeit haben mich viele Menschen unterstützt, denen ich hiermit herzlichst danken möchte.

Insbesondere gebührt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann, für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit in seinem Labor und die Bereitstellung der notwendigen Mittel.

Ich danke meinem Betreuer, Herrn Dr. rer. nat. Martin Oberringer, für die Einführung in die Techniken wissenschaftlichen Arbeitens und Denkens, die sehr gute Betreuung während der Doktorarbeit und den zahllosen Anregungen und Diskussionen. Durch ihn habe ich eine Menge lernen können.

Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern des Molekularbiologischen Labors für ihre Anregungen, ihre Unterstützung und ihre freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, die immer an mich geglaubt haben und mich während meines gesamten Studiums in jeglicher Form unterstützt haben und all meinen Freunden, die mich stets tatkräftig unterstützt und motiviert haben.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name	Claudia Meins
Geburtsdatum	22. Februar 1983
Geburtsort	Bad Oldesloe
Familienstand	ledig
Eltern	Heid Lind Meins, geb. Prösch (PTA) Hans-Heinrich Meins (Dipl. Betriebswirt)

Ausbildung

1989 - 1993	Grundschule Leezen
1993 - 2002	Dahlmannschule - Gymnasium der Stadt Bad Segeberg
Juni 2002	Abitur
seit Oktober 2002	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
August 2004	Ärztliche Vorprüfung
März 2005	Famulatur in der Allgemeinarztpraxis der Drs. Arndt/Wenk in Geschendorf (Lübeck)
August 2005	Famulatur in der Chirurgischen Abteilung der Asklepios Klinik Bad Oldesloe
August 2006	Famulatur in der Hand-, Plastischen- und Mikrochirurgie des Berufsgenossenschaftlichen Unfallkrankenhauses Hamburg
März 2007	Famulatur in der Orthopädie der Universitätsklinik Homburg/Saar
seit August 2007	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Homburg/Saar 1.Tertial: Chirurgie 2.Tertial: Orthopädie 3.Tertial: Innere Medizin