

Molekulare Mechanismen in der Haut nach Einwirkung von S-Lost:

**Regulation der Expression von Matrix-Metalloproteinasen und
der Differenzierungsprozesse in Haut-, Stroma- und Stammzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Tanja Popp
aus München

2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2005 – April 2011
in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt
der LMU München angefertigt.

(Leiterin der Abteilung: Prof. Dr. rer. nat. Marianne Jochum)

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

.....

Unterschrift

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und ich mich nicht anderweitig ohne Erfolg einer Doktorprüfung unterzogen habe.

München, den

.....

Unterschrift

Dissertation eingereicht am: 3. Mai 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger
2. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Tag der mündlichen Prüfung : 22. November 2011

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
A ZUSAMMENFASSUNG	1
B EINLEITUNG	3
B.1 Aufbau und Funktion der Haut.....	3
B.1.1 Epidermis.....	3
B.1.2 Epidermale Differenzierung	5
B.1.3 Dermis.....	6
B.2 Wundheilung.....	7
B.2.1 Physiologischer Ablauf.....	7
B.2.2 Chronische Wunden.....	9
B.3 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre endogenen Inhibitoren (TIMPs)	10
B.3.1 Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9	11
B.3.2 Beteiligung von MMPs an der Keratinozyten-Migration	11
B.3.3 Regulation der MMP-Expression und -Aktivität.....	12
B.3.4 Therapeutische Aspekte der MMP-Inhibition	14
B.4 Die Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalwege.....	15
B.4.1 ERK1/2	16
B.4.2 p38	16
B.4.3 Inhibitoren von ERK1/2 und p38 in der klinischen Therapie.....	17
B.5 S-Lost	18
B.5.1 Geschichte.....	18
B.5.2 Chemische Eigenschaften.....	19
B.5.3 Toxikologische Wirkung	20
B.5.4 Zellbiologische Aspekte	20
B.5.5 Symptome einer S-Lost-Vergiftung von humaner Haut.....	21
B.5.6 Medizinische Versorgung der Haut nach S-Lost-Vergiftung	23
C ZIELE DER ARBEIT.....	24

D	MATERIAL UND METHODEN	26
D.1	Material	26
D.1.1	Chemikalien.....	26
D.1.2	Lösungen, Puffer und spezielle Medien	26
D.1.3	Agenzien für die Zellkultur	27
D.1.4	Zellen.....	28
D.1.5	Agenzien und Kits für zellbiologische, molekularbiologische und proteinchemische Techniken.....	29
D.1.6	Geräte.....	30
D.1.7	Software.....	31
D.2	Methoden.....	32
D.2.1	Zellbiologische Methoden	32
D.2.1.1	Exposition von Zellen mit S-Lost.....	32
D.2.1.2	Kultivierung der Hautmodelle.....	32
D.2.1.3	Kultivierung und Differenzierung von primären Zellen	32
D.2.1.3.1	Normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK)	32
D.2.1.3.2	Normale humane dermale Fibroblasten (NHDF)	34
D.2.1.3.3	Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC).....	34
D.2.1.3.4	Polymorphonukleäre (PMN-) Granulozyten	35
D.2.1.4	Haltung von Stammkulturen	36
D.2.1.5	Mischkultur von HaCaT-Keratinozyten und primären Fibroblasten.....	36
D.2.1.6	Bestimmung der Zellproliferation und Vitalität	38
D.2.1.7	Bestimmung der Zellzahl	38
D.2.1.8	Bestimmung der zellulären Migration.....	38
D.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	41
D.2.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen.....	41
D.2.2.2	cDNA-Synthese	41
D.2.2.3	Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	42
D.2.3	Proteinchemische Methoden.....	43
D.2.3.1	Herstellung von Proteinextrakten.....	43
D.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
D.2.3.3	Proteinnachweis mittels SDS-PAGE und Western Blot	44
D.2.3.4	Zymographie	44
D.2.4	Statistische Datenanalyse	45

E	ERGEBNISSE	46
E.1	Einfluss von S-Lost auf die MMP/TIMP-Expression von Hautzellen	46
E.1.1	Analyse im Hautmodell	47
E.1.2	Analyse von Keratinozyten und Fibroblasten in Mono- und Mischkultur	49
E.1.2.1	Expression und Sekretion von MMPs und TIMP-1	49
E.1.2.2	Analyse des parakrinen Mechanismus der MMP-9-Sekretion in Mischkultur	50
E.1.2.3	Einfluss sekretierter Faktoren auf das Migrations- und Invasionsverhalten.....	51
E.1.3	Analyse in weiteren Zelltypen der Haut	53
E.1.3.1	Mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1).....	53
E.1.3.2	Monozytäre Zellen (THP-1).....	54
E.1.3.3	Polymorphonukleäre (PMN-) Granulozyten.....	55
E.1.3.4	Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)	56
E.2	Einfluss von S-Lost auf die zelluläre Funktionalität von Keratinozyten.....	60
E.2.1	Etablierung eines Zellmodells zum Studium der Differenzierung	60
E.2.1.1	Differenzierungsinduktion in immortalisierten Keratinozyten (HaCaT).....	60
E.2.1.2	Differenzierungsinduktion in primären Keratinozyten (NHEK).....	63
E.2.2	Einfluss von S-Lost auf NHEK	66
E.2.2.1	Differenzierung	66
E.2.2.2	Invasionsverhalten	68
E.2.2.3	MAPK-Aktivität.....	69
E.2.3	Inhibition der MAPK-Signalwege p38 und ERK1/2.....	70
E.2.3.1	Zytotoxizität der verwendeten MAPK-Inhibitoren	70
E.2.3.2	Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die basale Expression von Differenzierungsmarkern in unreifen NHEK.....	71
E.2.3.3	Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf den Differenzierungsprozess von NHEK.....	73
E.2.3.4	Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die Invasionskapazität von NHEK.....	75
E.2.3.5	Wirkung des p38-Inhibitors SB203580 im Hautmodell.....	76

F	DISKUSSION	77
F.1	Mechanismen der Blasenbildung:	
	Einfluss von S-Lost auf die MMP/TIMP-Expression in Hautzellen	77
F.1.1	Selektive Regulation der MMP-9	77
F.1.2	Parakriner Mechanismus der MMP-9-Freisetzung	78
F.1.3	Pathophysiologische Bedeutung von MMP-9 bei der Blasenbildung	79
F.1.4	Bedeutung von MMPs für die Migration von Fibroblasten.....	80
F.2	Mechanismen der verzögerten Wundheilung:	
	Einfluss von S-Lost auf die Funktionalität von Keratinozyten	81
F.2.1	Bedeutung des Differenzierungsstatus von Progenitorzellen der Haut	81
F.2.2	Bedeutung von MMPs für die Migration von Keratinozyten	83
F.2.3	Bedeutung der beteiligten MAPK-Signalwege.....	84
G	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	88
H	LITERATURVERZEICHNIS	90
I	CURRICULUM VITAE	100
J	DANKSAGUNG	103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	
ATRA	all-trans Retinsäure
BPE	<i>bovine pituitary extract</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
DiO	3,3'-Diocetadecyloxacarboyaninperchlorat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintraessigsäure
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinases</i>
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerin-aldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HaCaT	<i>Human adult low Calcium high Temperature</i>
hECM	humane extrazelluläre Matrix
hEGF	<i>human epidermal growth factor</i>
hFGF-B	<i>human fibroblast growth factor-B</i>
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	Humanserum
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IU	internationale Unit
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KM	konditioniertes Medium
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mRNA	<i>messenger</i> RNA
ng	Nanogramm
NHDF	normale humane dermale Fibroblasten
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
NP-40	Nonidet P-40
Nu	Nutridoma SP
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferation cell nuclear antigen</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PMNL	polymorphonukleäre Leukozyten
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -Polymerase-Kettenreaktion
R ³ -IGF-1	<i>long R3-insulin-like growth factor-1</i>

Fortsetzung Abkürzungen

rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RIPA-Puffer	<i>RadioImmuno Precipitation Assay Puffer</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	“Roosevelt Park Memorial Institute”
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
T25	25 cm ² Zellkulturflaschen
TIMP	<i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5- ((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid

A ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit den durch S-Lost-verursachten Symptomen in der Haut, die zunächst durch starke Blasenbildung und später durch eine verzögerte Wundheilung charakterisiert sind. Bei S-Lost handelt es sich um einen chemischen Kampfstoff, der erstmals im ersten Weltkrieg zum Einsatz kam und bis heute in vielen internationalen Konflikten großen Schaden anrichtete, obwohl der Gebrauch schon 1925 durch die Genfer Konvention verboten wurde. Aktuell stellt S-Lost zudem eine Bedrohung durch terroristische Aktivitäten dar.

Da für S-Lost-induzierte Verletzungen bislang keine spezifisch wirksamen Behandlungsmethoden verfügbar sind, besteht großes Interesse an der Aufklärung der dem Krankheitsbild zugrunde liegenden molekularen Pathomechanismen, um daraus Rückschlüsse auf besser geeignete therapeutische Maßnahmen ziehen zu können.

In unseren ersten Experimenten wurden als mögliche Auslöser der Blasenbildung die Expression und Sekretion ausgewählter Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren endogenen Inhibitoren, den *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* (TIMPs) in einem 3D-Hautmodell und in verschiedenen Zelltypen der Haut (Keratinozyten, Fibroblasten, mikrovaskuläre Endothelzellen, mesenchymale Stammzellen, monozytäre Zellen, PMN-Granulozyten) sowohl in Mono- als auch in Mischkultur untersucht.

Unter Verwendung von molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden wie qRT-PCR, Zymographie und Western Blot gelang der Nachweis, dass MMPs – insbesondere MMP-9 – nach Exposition der Zellen (v.a. Fibroblasten und monozytäre Zellen) mit S-Lost deutlich hochreguliert wurden. Zu Erhärtung der Annahme, dass MMP-9 durch Degradation der Basalmembran zwischen Epidermis und Dermis zur Blasenbildung beiträgt, konnte als Pathomechanismus nun erstmals eine parakrine Stimulation von Fibroblasten durch S-Lost-behandelte Keratinozyten identifiziert werden, als deren Folge eine vermehrte MMP-9-Sekretion resultierte.

Darüber hinaus zeigte sich in weiteren Versuchen unter Verwendung des sog. *Scratch*-Assays und eines *Transwell*-basierten Invasionsassays, dass das Migrations- und Invasionsverhalten der Fibroblasten in Gegenwart des konditionierten Mediums der S-Lost-behandelten Keratinozyten positiv beeinflusst wurde.

Aus klinischer Sicht sprechen diese Erkenntnisse für neue therapeutische Ansätze, die darauf beruhen sollten, die S-Lost-induzierte, auf proteolytischer Aktivität basierende Blasenbildung der Haut durch Applikation spezifischer MMP-Inhibitoren zu behandeln.

In einem weiteren Projekt wurde die verzögerte Wundheilung als spätes Symptom der S-Lost-Vergiftung auf zellulärer Ebene untersucht, bei der eine eingeschränkte Re-Epithelialisierung der betroffenen Hautstellen beobachtet wird. Sowohl für den Prozess der Wundheilung als auch für die stetige Erneuerung der Haut werden epidermale Stammzellen benötigt, die für die Bildung von Keratinozyten verantwortlich sind. Diese unipotenten Progenitorzellen befinden sich in der basalen Schicht der Epidermis und sind in der Lage zu proliferieren und anschließend terminal zu differenzieren.

Um eine Beeinflussung dieser Prozesse durch S-Lost zu untersuchen, wurden primäre unreife Keratinozyten (NHEK) verwendet und hinsichtlich ihres Differenzierungspotenzials untersucht. Dabei erwies sich S-Lost als potenter Induktor der Differenzierung von NHEK, was durch Bestimmung der Expression typischer Markerproteine wie Keratin-1, Involucrin und Loricrin gezeigt wurde. Die Induktion des Reifungsprozesses war sowohl von einem Rückgang der Proliferation als auch von einer verminderten Migrationsrate der Zellen begleitet.

Die eingehende Analyse von *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signaltransduktionswegen führte zu der Erkenntnis, dass die Aktivitäten von p38 und ERK1/2 gegenteilige Rollen im Differenzierungsprozess einnehmen. Studien mit spezifischen Inhibitoren der MAPK belegten, dass p38 für den Reifungsvorgang in NHEK essentiell ist, während ERK1/2 diesem entgegen wirkt. So konnte durch Blockade von p38 die von S-Lost ausgelöste Differenzierung der Zellen verhindert werden. Ebenso war es durch diese Behandlung möglich, die von S-Lost stark beeinträchtigte Migrationsfähigkeit der Keratinozyten wiederherzustellen, welche mit einer erhöhten MMP-1-Expression einherging.

Davon abgeleitet erscheint es therapeutisch sinnvoll, selektive p38-Inhibitoren für die Behandlung von Wundheilungsstörungen nach Exposition der Haut mit S-Lost einzusetzen.

Zusammenfassend erbrachten unsere Studien also den Nachweis, dass der S-Lost-induzierten Blasenbildung (als frühes Symptom) die spezifische Induktion der MMP-9 zugrunde liegt. Darüber hinaus konnte erstmals eine verfrühte Differenzierung in unreifen Keratinozyten der Haut (als mögliche Ursache für die verzögerte Wundheilung) nachgewiesen werden, wobei die MAPK p38 bei der Initiierung des Prozesses von entscheidender Bedeutung ist. Aufgrund dieser Resultate empfiehlt sich eine kombinierte Applikation von Inhibitoren der Aktivitäten von MMP-9 und p38, wobei der Einsatz jedoch zeitlich abgestimmt erfolgen sollte, um pathologische Effekte (Blasenbildung bzw. Differenzierungsinduktion in Keratinozyten) zu blockieren, ohne die positiven Auswirkungen von MMP-9 und p38 auf die Heilung (Migration von Immunzellen und Keratinozyten bzw. Reepithelialisierung) zu hemmen.

B EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich vorrangig mit der molekularen Wirkung des Kampfstoffes S-Lost (alkylierendes Agens) auf verschiedene Zellen der Haut. Aus den gewonnenen Erkenntnissen sollten Rückschlüsse für die Entwicklung neuer, zielgerichteter Therapieformen zur Behandlung S-Lost-induzierter Hautschäden gewonnen werden.

Die Untersuchungen hierzu erfolgten in einfacheren Monokulturen bis hin zu komplexen Zellkultursystemen wie Mischkulturen aus Hautzellen (Keratinozyten und Fibroblasten) beziehungsweise einem *in vitro*-3D-Vollhautmodell.

Um die Einordnung der in Abschnitt E dargelegten Forschungsergebnisse zu erleichtern, sind nachfolgend zunächst Aufbau und wesentliche Eigenschaften der Haut dargestellt. Danach wird kurz Bezug auf die Wundheilung genommen. Schließlich werden essentielle Mediatoren (MMPs/TIMPs und MAPK-Signalfaktoren) im Kontext von Hautschäden sowie das schädigende Agens S-Lost vorgestellt.

B.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen mit direktem Kontakt zur Umwelt. Sie hat verschiedenste Aufgaben wie die Weiterleitung von Reizen, die Regulation der Körpertemperatur und vor allem den Schutz des Körpers vor dem Eindringen potenziell pathogener Organismen wie Bakterien und Viren oder chemischen Substanzen zu gewährleisten. Darüber hinaus kontrolliert sie den transepidermalen Wasserverlust an die Umwelt.¹

Die Erfüllung dieser vielfältigen Aufgaben gelingt primär durch einen zweischichtigen Aufbau der Haut aus Epidermis und Dermis. Beide Schichten sind durch eine Basalmembran voneinander getrennt, deren Hauptbestandteile Kollagen Typ IV, Laminin und Proteoglykane darstellen.

B.1.1 Epidermis

Die Epidermis ist als mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel aufgebaut (Abb. 1). Dabei setzt sich die äußerste Schicht (Stratum corneum) aus abgestorbenen, verhornten Keratinozyten (sog. Korneozyten) zusammen, die durch Desmosomen sehr eng miteinander verbunden sind. Die Korneozyten bieten eine widerstandsfähige Abwehr gegen chemische und mechanische Angriffe von außen. Das darunter liegende Stratum granulosum besteht aus ausdifferenzierten Keratinozyten mit charakteristischen Granula, wie den Keratohyalin-Granula und Lamellar-Granula, die den Zellen ein körniges Aussehen verleihen (Abb. 1,2).²

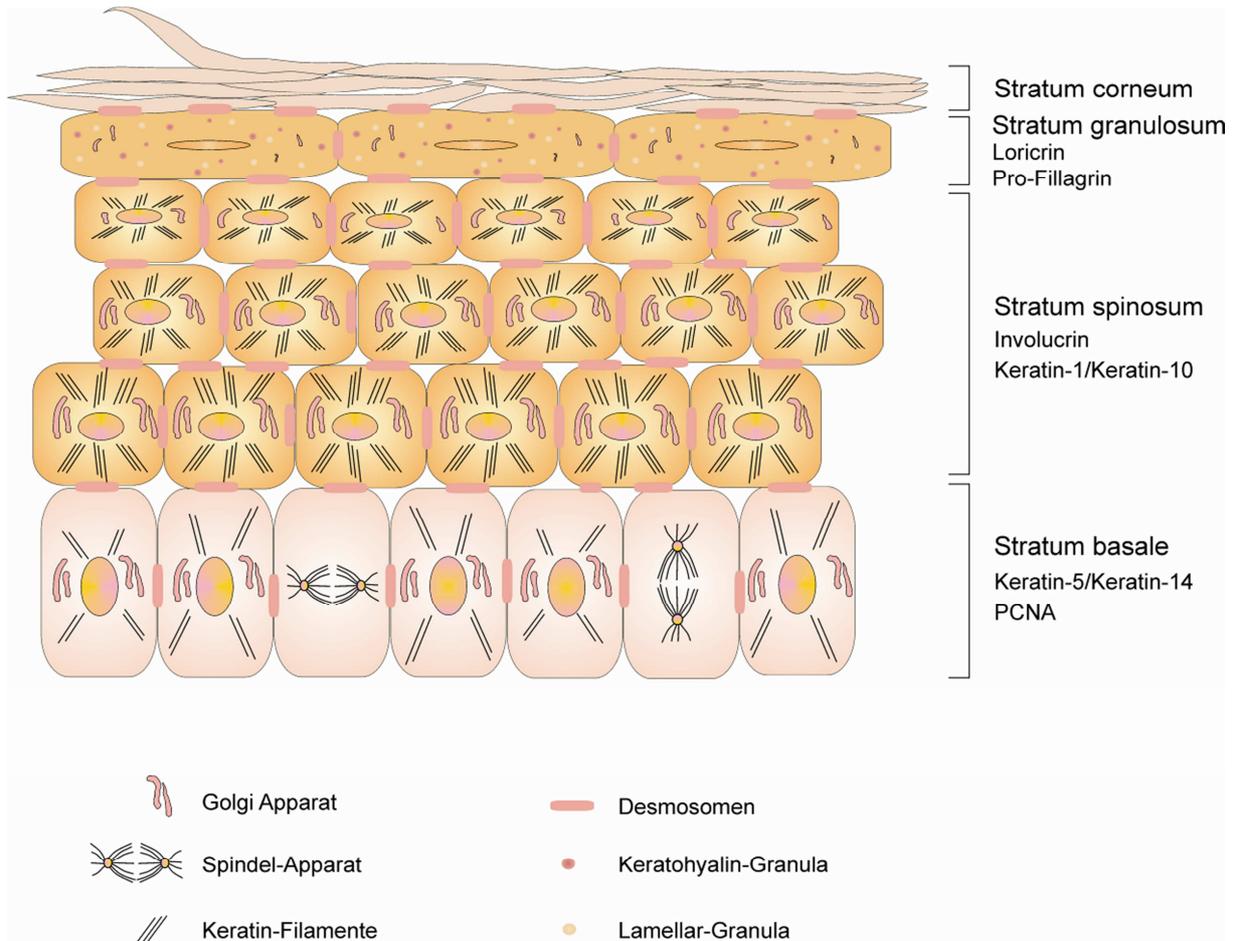


Abb. 1: Aufbau der Epidermis

Die Epidermis besteht aus mehreren Schichten unterschiedlich ausdifferenzierter Keratinozyten, die sich jeweils durch die Expression typischer Differenzierungsmarker wie Keratin-1, Loricrin und PCNA voneinander unterscheiden lassen. Im Stratum basale befinden sich mitotisch aktive Progenitorzellen, deren Tochterzellen bis zur äußeren Schicht, dem Stratum corneum, wandern. Während dieser Migration durchlaufen sie einen Differenzierungsprozess hin zu ausgereiften Korneozyten.

(Abbildung modifiziert nach Alonso *et al.*³)

Die Lamellar-Granula beinhalten verschiedenste Lipide, die in den interzellulären Raum exozytiert werden, wo sie die hautschützende Lipidbarriere bilden, die ein Diffusionshindernis im Rahmen der Wasserhomöostase darstellt, und so auch das Eindringen fremder Substanzen verhindern.^{4;5} Die Keratohyalin-Granula enthalten Proteine wie Profilagin und Loricrin, die zur Stabilität der Zellen beitragen und als Differenzierungsmarker zur Identifizierung reifer Keratinozyten dienen.⁶

Da das Stratum corneum durch exogene Faktoren stark beansprucht wird, muss es kontinuierlich erneuert werden. Dafür sind Zellen in der untersten Schicht der Epidermis, dem sog. Stratum basale verantwortlich. Hier befinden sich mitotisch aktive Progenitorzellen, die charakteristischerweise das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) exprimieren⁷ (Abb. 1),

das in der S-Phase entscheidend an der DNA-Replikation beteiligt ist. Nach ihrer Teilung durchlaufen diese unreifen Keratinozyten einen insgesamt 40-56 Tage dauernden Differenzierungsprozess^{8;9} während ihrer Migration durch das Stratum spinosum und Stratum granulosum bis zum Stratum corneum, wo sie als verhornte Zellen (Korneozyten) abgeschuppt werden.

B.1.2 Epidermale Differenzierung

Schon frühe Untersuchungen der Haut führten zur Entdeckung eines Gradienten aus Calcium-Ionen (Ca^{2+}) in der Epidermis, der nicht nur mit dem Differenzierungszustand der Keratinozyten korreliert, sondern diesen auch reguliert.¹⁰ Im Stratum basale, in der sich die Stammzell-ähnlichen Progenitorzellen befinden, liegt eine geringe Ca^{2+} -Konzentration vor, die sich bis in die äußeren Schichten des Stratum granulosum kontinuierlich steigert.¹⁰ Tatsächlich lassen sich unreife Keratinozyten durch Erhöhen der Ca^{2+} -Konzentration *in vitro* in reife Keratinozyten differenzieren. Während dieses Vorgangs erfahren die Zellen starke morphologische und biochemische Veränderungen. Zunächst lösen sich die über Hemidesmosomen mit dem Untergrund verankerten, Stammzell-ähnlichen Keratinozyten von der Basalmembran ab und teilen sich asymmetrisch.¹ Die so entstandenen Tochterzellen migrieren ins 2- bis 5-lagige Stratum spinosum und flachen dort ihre zylindrische Form ab. Dabei werden typische Proteine wie Keratin-5 und Keratin-14 durch andere Intermediärfilamente wie Keratin-1 und Keratin-10 ersetzt (Abb. 2).¹¹ Zellen des Stratum granulosum enthalten in den Keratohyalin-Granula ebenfalls typische Expressionsprodukte, wie Profilaggrin, das während der Keratinisierung der Zellen proteolytisch zu Filaggrin gespalten wird und so zum engeren Bündeln der Keratinfilamente beiträgt.⁵ Ein weiterer entscheidender Marker für die Differenzierung ist Loricrin, das mit verschiedenen Strukturproteinen wie Involucrin durch Transglutaminasen verknüpft und im Inneren der Zelle an der Zellmembran zur Bildung der sog. verhornten Zellhülle (*cornified envelope*) angelagert wird, um die Stabilität der Zelle zu erhöhen.⁵

Aufgrund der zeitlich versetzten Expression typischer Markerproteine können Keratinozyten während ihres Reifungsprozesses verschiedenen Differenzierungsphasen und daraus abgeleitet entsprechenden Schichten der Epidermis zugeordnet werden (Abb. 1).

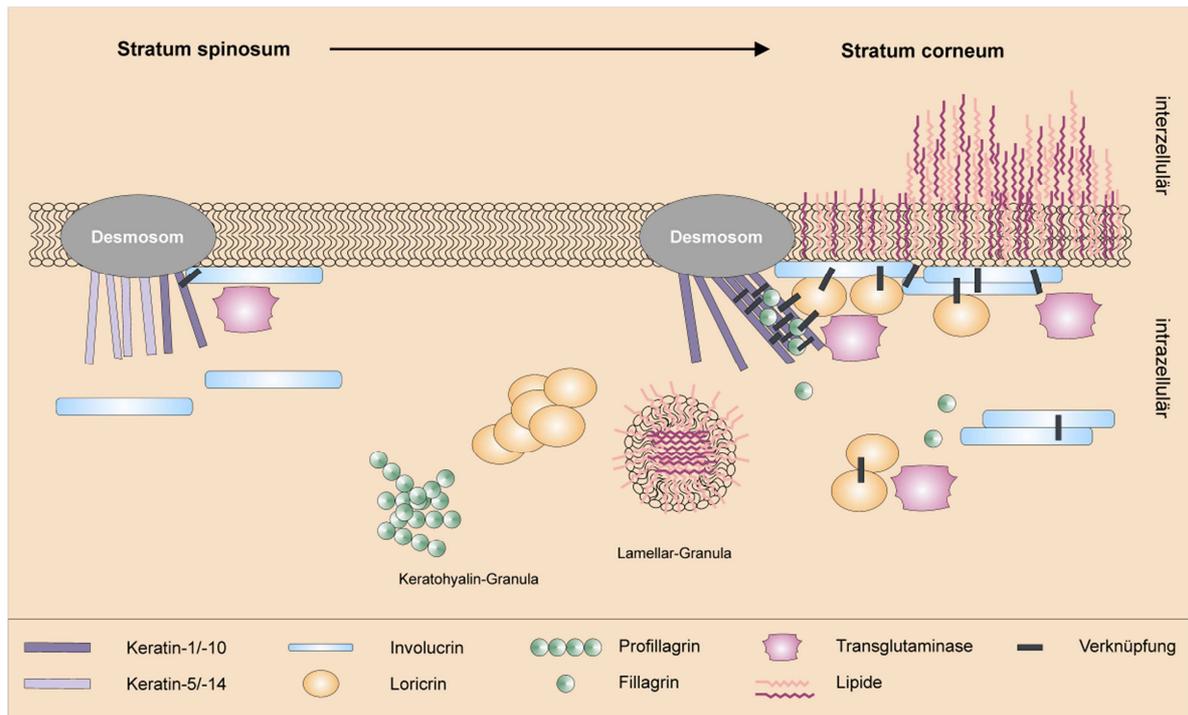


Abb. 2: Epidermale Differenzierung

Während der Migration vom Stratum basale über das Stratum spinosum hin zum Stratum corneum durchlaufen Keratinozyten einen Differenzierungsprozess, der die Expression jeweils charakteristischer Proteine in einer zeitlichen und örtlichen Abfolge beinhaltet. Zunächst werden die an Desmosomen verankerten Keratinfilamente Keratin-5/-14 durch Keratin-1/-10-Netzwerke ersetzt. Weitere Proteine wie Involucrin, Fillaggrin und Loricrin werden über Transglutaminasen verknüpft. Zusätzlich kommt es zur Ausschüttung von Lipiden aus den Lamellar-Granula in den interzellulären Raum der Keratinozyten des Stratum corneum.

(Abbildung modifiziert nach Candi *et al.*⁵)

B.1.3 Dermis

Die Dermis liegt unmittelbar unterhalb der Epidermis und ist von dieser durch die Basalmembran getrennt. Die Vaskularisierung der Dermis erlaubt die Nährstoffversorgung der Epidermis über Diffusion, da diese selbst keine Blutgefäße besitzt. Die Dermis besteht vorwiegend aus Fibroblasten, die für den hohen Anteil an extrazellulärer Matrix in dieser Schicht verantwortlich sind. Hauptsächlich findet man hier fibrilläre Kollagene als Strukturproteine, die in längsorientierten, zumeist aus Kollagen I bestehenden Faserbündeln vorliegen. Die fibrillären Kollagene werden zunächst als tripelhelikale Prokollagene sekretiert und lagern sich anschließend nach Abspaltung der Propetide zu Fibrillen zusammen.¹² In einem weiteren Schritt erfolgt dann über kovalente Quervernetzung die Ausbildung der Kollagenfasern, die entscheidend zur Festigkeit der Haut beitragen.^{13;14} Diese Fasern sind in ein elastisches Netz aus Strukturproteinen wie Fibrillin und Elastin eingebettet, die wiederum für die Elastizität der Haut eine wichtige Rolle spielen.

Sog. Ankerfibrillen, die aus Fibroblasten freigesetztem Kollagen VII bestehen, verankern das Epithel über die Basal-membran mit dem Bindegewebe.

Sowohl Fibroblasten als auch Keratinozyten sind durch Synthese und Sekretion von proteolytischen Enzymen (Kollagenasen) in der Lage, Strukturproteine abzubauen, was die Zellen zur Migration durch extrazelluläre Matrix (EZM) befähigt.¹⁵ Diese Eigenschaft ist für die Wundheilung von entscheidender Bedeutung.¹⁶

B.2 Wundheilung

B.2.1 Physiologischer Ablauf

Wundheilung ist ein sehr dynamischer Prozess, dessen Aufgabe zunächst die Blutstillung und darauf folgend die Rekonstruktion der strukturellen und funktionellen Barrierefunktion der Haut darstellt. Bei diesem komplexen Vorgang spielen lösliche Mediatoren, extrazelluläre Matrixbestandteile, Blutzellen und Zellen des Parenchyms eine wichtige Rolle.

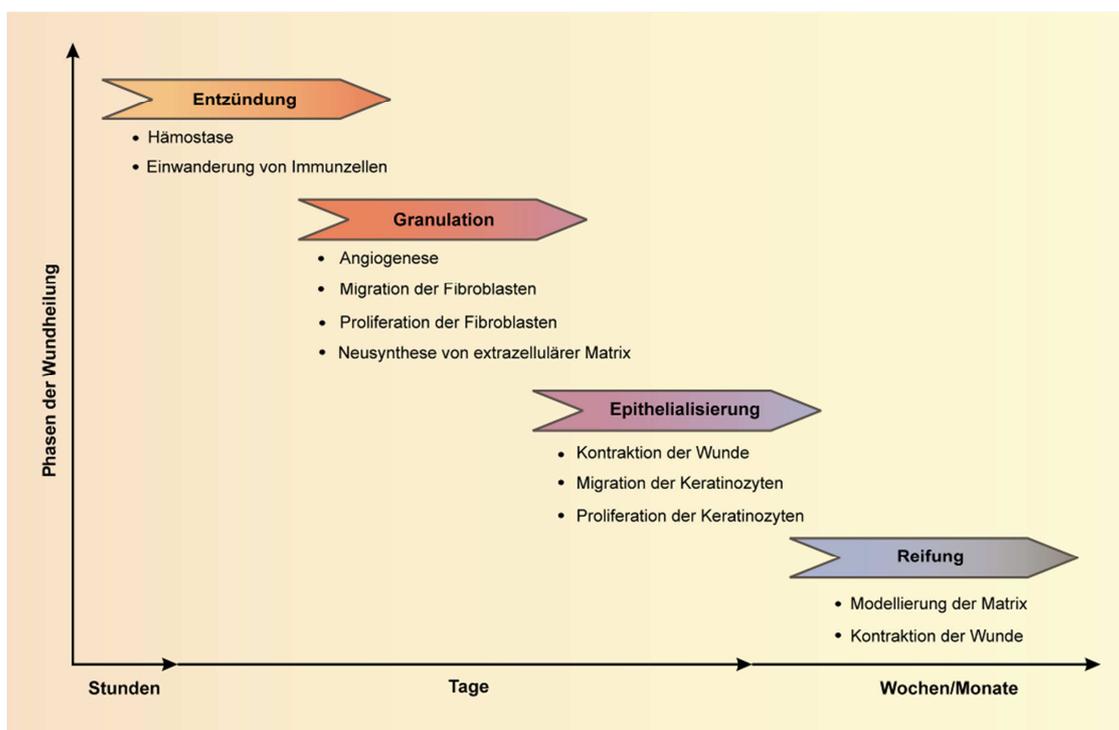


Abb. 3: Die Phasen der Wundheilung

Die Wundheilung lässt sich in 4 Phasen einteilen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen, aber sich zeitlich nicht klar voneinander abgrenzen lassen. Bei diesen Prozessen sind verschiedene Zelltypen wie Immunzellen, Fibroblasten und Keratinozyten beteiligt, die schon nach einigen Stunden bis hin zu Monaten zur Wundheilung beitragen.

(Weitere Details siehe Text)

Im Allgemeinen kann man den Prozess der Wundheilung in 4 Phasen einteilen (Abb. 3):

1. Entzündungsphase
2. Granulationsphase
3. Epithelialisierungsphase
4. Reifungsphase.

Diese Phasen unterscheiden sich zwar histologisch und funktionell, sie sind jedoch zeitlich nicht klar voneinander abgrenzbar. Die gesamte Heilung bedarf eines interaktiven, genau regulierten Zusammenspiels verschiedener Zellen. Bei einer Hautverletzung, die bis in die dermale Schicht reicht, gelangen zunächst Blutzellen über betroffene Kapillaren in den geschädigten Bereich.

Die erste Phase wird mit der primären Hämostase durch Anlagerung, Aggregation und Degranulation der Blutplättchen eingeleitet, was zu einem schnellen Stopp der Blutung führt. Über die nachfolgende Gerinnungskaskade kommt es zur Bildung eines stabilen Fibrinpflöpsens. Dieser enthält neben den Gerinnungsfaktoren verschiedene Strukturproteine (wie Fibronektin und Vitronektin), die eine provisorische Matrix für die Migration diverser Zellen darstellen.¹⁷ Wachstumsfaktoren und Komplementfaktoren der zerstörten Zellen bzw. aktivierten Blutplättchen fungieren als Lockstoffe für inflammatorische und endotheliale Zellen sowie Fibroblasten und Keratinozyten. Die ersten chemotaktisch angelockten Zellen, die die verletzte Stelle erreichen, sind polymorphonukleäre (PMN) Zellen, gefolgt von Monozyten. Beide Zelltypen sind zur Phagozytose befähigt und tragen durch Sekretion von Proteasen sowie Wachstumsfaktoren wie TGF- β , TGF- α und verschiedene FGFs zur Regulation der Wundheilung bei.¹⁷

Parallel zur Entzündung setzt die zweite Phase der Wundheilung ein, die durch Granulation und Angiogenese gekennzeichnet ist. Die Bildung des Granulationsgewebes beginnt nach Aktivierung unbeschädigter Fibroblasten durch die oben genannten Wachstumsfaktoren, die die Zellproliferation und Migration stimulieren. Fibroblasten wandern in das Wundbett ein, wo sie extrazelluläre Matrix sekretieren und modellieren, wodurch die provisorische Matrix ersetzt wird. Mittlerweile weiß man, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark und der Dermis einen Teil dieser „Fibroblasten“-Zellpopulation ausmachen und sowohl immunmodulatorisch als auch zellulär zur Wundheilung beitragen können.¹⁸⁻²⁰ Des Weiteren findet in dieser Phase die Gefäßneubildung statt, wobei einsprießende Kapillaren die Wunde mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen versorgen, um das Fortschreiten des Heilungsprozesses zu ermöglichen.²¹

Die dritte Phase der Wundheilung umfasst zum einen die Ausreifung der Kollagenfasern und Kontraktion der Wunde, indem Fibroblasten sich teilweise in Myofibroblasten „umwandeln“. Diese sind in der Lage, sich ähnlich wie Muskelzellen zu kontrahieren und so die Wundränder einander näherzubringen.²¹ Zum anderen erfolgt die Re-Epithelialisierung der verletzten Bereiche. Hierbei lösen sich Keratinozyten der basalen Schicht von der Basalmembran ab, proliferieren und wandern gemeinsam mit Keratinozyten des Wundrandes ins geschädigte Gewebe ein.^{17;21} Darüber hinaus können auch Stammzellen des Haarfollikels zur Re-Epithelialisierung beitragen.²²

In der vierten und letzten Phase der Wundheilung kommt es zur Reifung der Wunde. Es erfolgt die Reduktion der Blutgefäße und eine nochmalige Ausrichtung und Vernetzung der Kollagenfasern, so dass die Narbe weiter an Stabilität gewinnt.²³

B.2.2 Chronische Wunden

Normalerweise erfolgt die Wundheilung in den oben beschriebenen Phasen. Durch äußere Einflüsse oder Grunderkrankungen kann diese natürliche Abfolge gestört sein und zur Entstehung chronischer Wunden beitragen. Häufig verzögern Durchblutungsstörungen, Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus) oder Immunschwächen eine rasche Wundheilung.

Ein typisches Beispiel für eine chronische Wunde, die auf einer Grunderkrankung basiert, ist der diabetische Ulcus, der durch verschiedene physiologische und biochemische Defekte beeinflusst wird.²¹ Hierbei kommt es durch eine verschlechterte Neovaskularisierung mit nachfolgend bedingter verminderter Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr zu einer verlängerten Entzündungsphase, gestörter Migration und Zellproliferation, sowie nicht zuletzt zu einer erhöhten Expression von Proteasen.

B.3 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre endogenen Inhibitoren (TIMPs)

Im Prozess der Wundheilung spielen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre endogenen Inhibitoren (TIMPs) eine wesentliche Rolle. Die MMPs sind eine Familie sezernierter und membranständiger, Zink-abhängiger Metalloendopeptidasen. Bisher wurden beim Menschen 23 Gene dieser Proteinasenfamilie charakterisiert, die einen hoch konservierten modularen Aufbau zeigen, der sich auch in der Domänenstruktur der Proteine widerspiegelt.²⁴

Die MMPs lassen sich aufgrund ihrer Struktur (Abb. 4) oder ihrer Substratspezifität in verschiedene Subfamilien wie z.B. Gelatinasen (MMP-2, -9), Kollagenasen (z.B. MMP-1) und Stromelysine (z.B. MMP-10) einteilen.

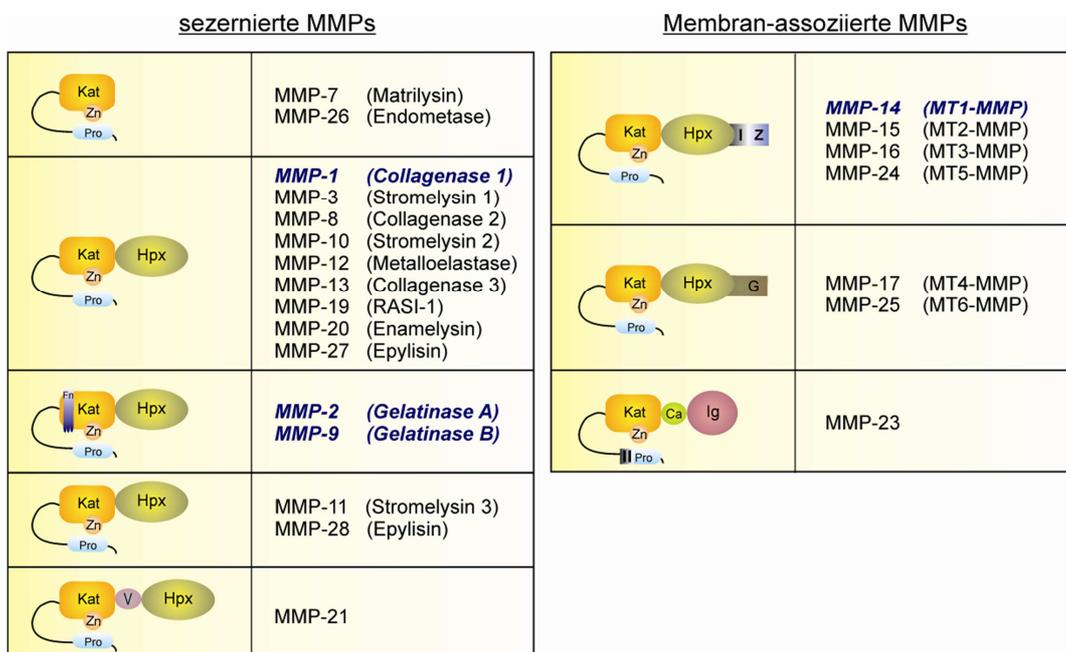


Abb. 4: Domänenstruktur der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Pro, Propeptid; **Kat**, katalytische Domäne; **Zn**, Zn^{2+} im aktiven Zentrum; **Hpx**, Hämoexin-Domäne; **Fn**, Fibronectin-Domäne; **V**, Vitronectin-Insert; **I**, Typ I Transmembran-Domäne; **II**, Typ II Transmembran-Domäne; **G**, GPI-Anker; **Z**, zytoplasmatische Domäne; **Ca**, Cystein-Array-Region; **Ig**, IgG-like-Domäne.

(Abbildung modifiziert nach Visse *et al.*²⁵).

Bis auf wenige Ausnahmen besitzen alle MMPs ein Signalpeptid, ein Propeptid und eine katalytische Domäne, die über einen flexiblen Linker (*hinge region*) an eine Hämoexin-Domäne gebunden ist (Abb. 4).²⁵ Das Signalpeptid ermöglicht den Transport der MMPs an die Plasmamembran, wo sie dann sezerniert werden. Da alle MMPs als Zymogene synthetisiert werden, müssen sie durch Abspaltung des Propeptids vom N-Terminus in den aktiven Zustand überführt werden.

B.3.1 Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9

Aufgrund der essentiellen Bedeutung von MMP-2 und MMP-9 an der Zellmigration und insbesondere auch im Rahmen von Wundheilungsprozessen, wird im Folgenden auf diese beiden Gelatinasen etwas näher eingegangen.

Gelatinase A (MMP-2) und Gelatinase B (MMP-9) bilden eine Untergruppe der MMPs, zu deren bevorzugten Substraten denaturiertes Kollagen (Gelatine), Laminin und Kollagen IV (der Hauptbestandteil der Basalmembran) gehören.^{26;27} Die Biosynthese und Aktivität der beiden Proteinase sind mit der Invasivität verschiedener Zelltypen wie Leukozyten, Endothelzellen und Tumorzellen assoziiert.^{28;29} Sie besitzen – anders als die übrigen MMPs – drei Fibronectin-Domänen, die in der katalytischen Domäne lokalisiert und für die Bindung an Gelatine verantwortlich sind (Abb. 4).

MMP-2 und MMP-9 werden als latente Proformen von den Zellen sezerniert und schnell von ihren endogenen Inhibitoren TIMP-2 bzw. TIMP-1, den *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*, komplexiert. Im Fall von proMMP-9 kann auch schon die Sekretion des Proenzym im Komplex mit TIMP-1 erfolgen.³⁰ Während proMMP-9 durch aktive, lösliche Proteinase wie MMP-3 und Plasmin aktiviert wird, vollzieht sich die Aktivierung von proMMP-2 über einen einzigartigen Mechanismus an der Zelloberfläche durch Bindung an einen Komplex aus der membranständigen MT1-MMP und TIMP-2.²⁵

B.3.2 Beteiligung von MMPs an der Keratinozyten-Migration

Eine wichtige Eigenschaft der Hautzellen ist ihre Fähigkeit zur Migration und Invasion, die nicht nur für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Haut, sondern auch bei der Wundheilung eine entscheidende Rolle spielen. Insbesondere sind hierbei die MMPs sehr wichtig. Neben den immunologischen Zellen, die die MMPs benötigen, um an den Ort der Verletzung zu gelangen, und den Fibroblasten, die MMPs für die Modellierung des betroffenen Gewebes nutzen, exprimieren auch Keratinozyten diese Proteinase vor allem für die Migration.

Sowohl bei der fortwährenden Erneuerung der Haut als auch bei der regenerativen Wundheilung müssen sich die Keratinozyten aus der basalen Schicht zunächst von der Basalmembran ablösen, wofür sie Proteasen benötigen. Keratinozyten exprimieren hierfür – ähnlich wie dermale Fibroblasten – MMP-1, -2, -9 und -10.^{31;32} In migrierenden Keratinozyten trägt primär MMP-9 durch den Kollagen Abbau von Typ IV zur Ablösung der

Zellen von der Basalmembran bei.³³ Bei ihrer Wanderung treffen die Zellen dann auf Bindegewebe, das vorwiegend aus verschiedenen Kollagentypen, vor allem aus Kollagen I, besteht.³⁴ Über den Intergrinrezeptor $\alpha 2\beta 1$, der in Keratinozyten konstitutiv exprimiert wird, werden Kollagen-vermittelt auch die Synthese und die Sekretion von MMP-1 induziert.^{31;35} Darüber hinaus ist MMP-10 *in vivo* primär an der Spitze der vom Wundrand einwandernden Keratinozyten zu finden.³⁶

Die bisher genannten und auch viele weitere MMPs sind jedoch nicht nur in der Lage, durch Abbau der extrazellulären Matrix zur Migration beizutragen, sondern sie können auch andere Proteasen aktivieren oder Wachstumsfaktoren prozessieren.^{37;38}

B.3.3 Regulation der MMP-Expression und -Aktivität

Zusätzlich zu den vielen Substraten, die die extrazelluläre Matrix (EZM) bietet, können MMPs eine Reihe von regulatorischen Proteinen, die nicht zur Matrix gehören (wie Cytokine, Chemokine und deren Rezeptoren) durch Spaltung aktivieren oder auch deaktivieren.³⁹ Somit sind MMPs nicht nur in die Matrixmodellierung involviert, sondern haben auch eine wichtige Funktion in der Zell-Zell-Kommunikation und bei Zell-Matrix-Signalwegen.⁴⁰

Diese Multifunktionalität erklärt auch, warum für MMPs eine genaue Regulation ihrer Expression und Aktivität besonders wichtig ist. Dies wird durch eine Reihe von Erkrankungen belegt, die auf eine unkontrollierte MMP-Synthese und -Aktivierung zurückzuführen sind.^{41;42}

Die physiologische Kontrolle erfolgt hauptsächlich über eine strenge Regulation der Enzymexpression auf mRNA-Ebene sowie der extrazellulären Aktivierung (Abb. 5) und der Interaktion mit den endogenen Inhibitoren (siehe Abschnitt „Inhibierung“) auf Proteinebene.^{42;43}

Aktivierungsmechanismen

Nach der Biosynthese befinden sich proMMPs in einem katalytisch inaktiven Zustand. Dieser wird durch die Interaktion der Thiolgruppe des Cysteins im Propeptid (PRCGVPD) mit dem Zink-Ion im katalytischen Zentrum des Enzyms erreicht. Um aktiviert zu werden muss die Cystein-Zn²⁺-Interaktion der proMMP unterbrochen werden („cysteine switch“).⁴⁴

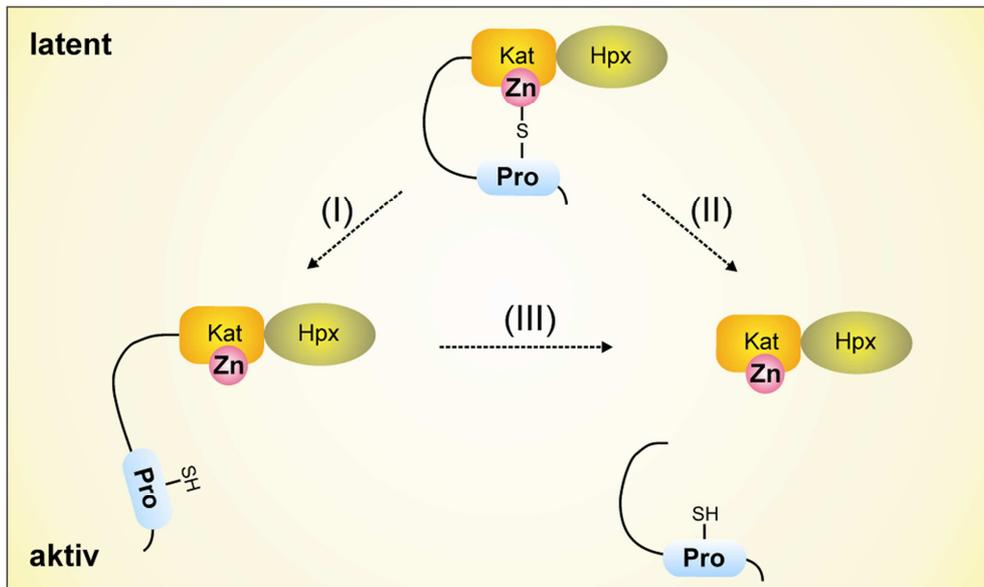


Abb. 5: Aktivierungsmechanismen der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

ProMMPs befinden sich in einem katalytisch inaktiven Zustand, der durch Interaktion des Cysteins im Propetid (Pro) und dem Zink-Ion (Zn) im katalytischen Zentrum (Kat) vermittelt wird. Für die Aktivierung der proMMP muss diese Interaktion durch den sog. „cysteine switch“ unterbrochen werden, der sowohl auf nicht-proteolytischem (I) als auch auf proteolytischem (II, III) Wege erfolgen kann.

(Weitere Details siehe Text)

(Abbildung modifiziert nach Visse *et al.*²⁵)

Grundsätzlich kann diese Aktivierung über drei Mechanismen geschehen⁴⁵:

- (I) nicht-proteolytisch: Modifikation der Thiolgruppe des Cysteins durch physiologische Substanzen wie Oxidantien, Disulfide, Elektrophile oder nicht-physiologische Faktoren wie alkylierende Agenzien, Schwermetallionen oder SDS.
- (II) proteolytisch: Direkte Abspaltung des Propeptids durch eine andere Protease.
- (III) autokatalytisch: Chemische oder allosterische Effekte am Zymogen, die zur inter- oder intramolekularen autokatalytischen Abspaltung des Propeptids führen.

Inhibierung

Im humanen Genom kodieren 4 Gene für die endogenen Inhibitoren der MMPs, die *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* (TIMP-1 bis TIMP-4). TIMPs bestehen aus der N-terminalen und der C-terminalen Domäne, die unabhängig voneinander gefaltet werden können und von je 3 Disulfidbrücken stabilisiert werden.⁴⁶ Die N-terminale Domäne ist für die inhibitorische Funktion der TIMPs verantwortlich, während der C-Terminus die Bindung an proMMPs steuert.

Störungen des Gleichgewichts zwischen TIMPs und MMPs werden bei verschiedensten pathologischen Prozessen beobachtet, wie beispielsweise bei der Metastasierung von Tumorzellen oder bei einer verschlechterten Wundheilung.^{47;48}

Neuere Forschungsergebnisse weisen auch auf MMP-unabhängige Funktionen der TIMPs hin. Hierzu gehören Wachstumsfaktor-ähnliche Einflüsse auf grundlegende zelluläre Prozesse wie Proliferation und Apoptose.⁴⁹

B.3.4 Therapeutische Aspekte der MMP-Inhibition

Aufgrund der Beteiligung erhöhter MMP-Aktivitäten an der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen, wurden anfangs Breitspektrum-MMP-Inhibitoren in der Klinik getestet.⁵⁰ Jedoch hatten diese Substanzen wegen der Hemmung aller MMPs viele Nebenwirkungen, da auch physiologische Prozesse beeinträchtigt wurden. So ergab sich trotz guter vorklinischer Resultate in Tiermodellen beim Einsatz in der Tumorthherapie keine Verbesserung für das Überleben der Patienten.⁵⁰

Für zukünftige Studien scheint jedoch die systemische Applikation spezifischer MMP-Inhibitoren, etwa gegen MMP-9 und MMP-14, äußerst vielversprechend.⁵¹ Eine weitere Möglichkeit des gezielten Einsatzes von MMP-Inhibitoren, stellt eine topische Applikation der Wirkstoffe dar, wie dies bei Erkrankungen des Zahnbettes⁵² und der Haut⁵³ schon gezeigt wurde.

B.4 Die Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalwege

Neben den MMPs und ihren endogenen Inhibitoren spielen auch Faktoren der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalwege eine bedeutende Rolle bei Hauterkrankungen.^{52;53}

Die MAPK-Faktoren regulieren in allen eukaryontischen Organismen wichtige zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Migration. Sie nehmen dabei die Funktion zentraler Effektoren in spezifischen Signaltransduktionskaskaden ein, die über Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Stimuli ausgelöst werden (Abb. 6). Diese Kaskaden bestehen aus jeweils drei hintereinander geschalteten Proteinkinasen, die zumeist nach Stimulation einer Rezeptor-Tyrosinkinase über G-Proteine aktiviert werden.

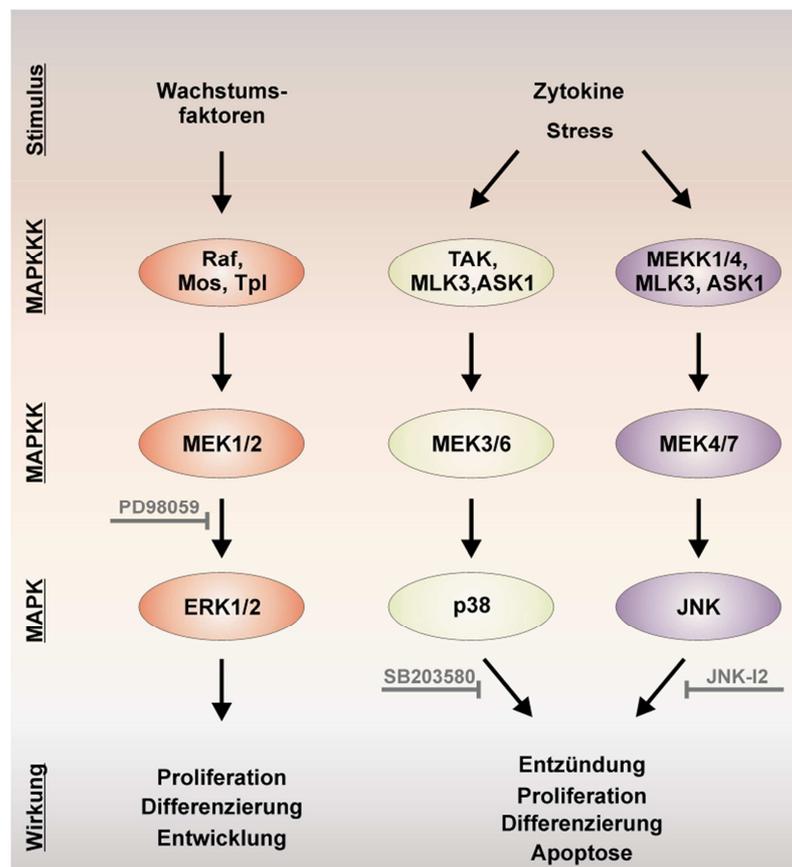


Abb. 6: Schematische Darstellung der MAPK-Signalkaskaden von ERK1/2, p38 und JNK

MAPK, mitogen-activated protein kinase; **MAPKK**, MAPK kinase; **MAPKKK**, MAPK kinase kinase; **Raf**, v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog; **Mos**, Moloney sarcoma oncogene; **Tpl**, tumor progression locus; **TAK**, transforming growth factor- β -activated kinase; **ASK**, apoptosis signal-regulating kinase; **MLK**, mixed-lineage kinases; **MEKK**, mitogen ERK kinase kinase; **MEK**, MAPK/ERK kinase; **ERK**, extracellular signal response kinase; **JNK**, c-Jun NH₂-terminal kinase; **PD98059** (MEK1/2-Inhibitor), **SB203580** (p38-Inhibitor), **JNK-I2** (JNK-Inhibitor).

(Abbildung von Cell Signalling Technology; modifiziert)

Die Anordnung der Kinasen in einer Kaskade erlaubt eine Amplifikation und genaue Regulation des Signals.⁵⁴ Des Weiteren sind Proteine beteiligt, die für die subzelluläre Lokalisation der Kinasen verantwortlich sind und so ebenfalls für eine spezifische Weiterleitung der Signale zu den jeweiligen Zielgenen sorgen.⁵⁴

Die MAPK-Signaltransduktionswege wurden nach der jeweiligen Haupteffektor-Kinase wie ERK1/2, p38 und JNK benannt.

Da ERK1/2 und p38 im Rahmen unserer Untersuchungen von besonderem Interesse sind, werden diese Signalfaktoren nachfolgend genauer beschrieben.

B.4.1 ERK1/2

Die ERK1/2-Signaltransduktion ist bei zentralen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Entwicklung von großer Bedeutung.⁵⁵ Dabei wird die ERK1/2-Kaskade (Abb. 6, links) primär von Wachstumsfaktoren wie EGF und TGF- β ausgelöst, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Kinase Raf-1 aktivieren. Raf-1 phosphoryliert MEK1/2, die wiederum ERK1 und ERK2 (ERK1/2) durch Phosphorylierung eines Threonins und Tyrosins mit der Erkennungssequenz Thr-Glu-Tyr aktiviert. Zu den zahlreichen Substraten von ERK1/2 zählen neben Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, c-Fos und c-Jun auch eine Reihe zytosolischer Proteine sowie Bestandteile des Zytoskelettes.⁵⁶

ERK1/2 ist ähnlich wie p38 (siehe B.4.2) häufig bei entzündlichen Erkrankungen der Haut (z.B. Psoriasis) verstärkt aktiv.^{53;57} Des Weiteren liegt bei vielen Krebsarten eine Mutation in einer der Komponenten des ERK1/2-Signalweges vor. Hier sind insbesondere Ras und Raf betroffen, wodurch es schlussendlich zur Hyperaktivierung von ERK1/2 kommt.⁵⁸ Da der ERK1/2-Signalweg sowohl für die Migration und Invasion als auch für das Überleben der Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt, stellen spezifische Inhibitoren gegen diesen Signaltransduktionsweg eine aussichtsreiche Möglichkeit zur Entwicklung von Chemotherapeutika dar.

B.4.2 p38

Die Kinase p38 ist Teil einer Signaltransduktionskaskade, die oftmals mit Entzündungsprozessen und Stress-Stimuli in Verbindung steht.⁵⁹ Eine Aktivierung des p38-Signalweges (Abb. 6, Mitte) kann über Zytokine (z.B. TNF- α und IL-1) erfolgen oder auch durch Stress-

faktoren wie osmotischen Schock und UV-Bestrahlung induziert werden. So wird eine Aktivierung von p38 in der Haut beispielsweise bei Sonnenbrand beobachtet, der durch UV-Strahlung verursacht wird und zu Hautkrebs führen kann.⁶⁰ Besonders häufig findet sich aber auch eine Assoziation von p38 mit entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis, der rheumatoiden Arthritis und Morbus Crohn.⁶¹

Von p38 existieren vier verschiedene Isoformen, deren Aminosäuresequenz eine 60%-ige Übereinstimmung aufweisen. Sie werden von eigenständigen Genen kodiert und haben unterschiedliche gewebespezifische Expressionsmuster, wobei p38 α ubiquitär synthetisiert wird.⁵⁹ Die Aktivierung von p38 erfolgt durch die MAPK-Kinase MEK3/6 mittels spezifischer Phosphorylierung des Threonins und Tyrosins (Thr-Gly-Tyr) in der Aktivierungsdomäne. Nach Translokation in den Nukleus phosphoryliert p38 seinerseits Substrate wie eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (z.B. ATF-2, Elk-1) sowie andere Kinasen (z.B. MAPKAPK-2) und auch das Chaperon Hsp27. Diese Faktoren eignen sich besonders als Target zum Nachweis der p38-Aktivität durch Bestimmung ihres Phosphorylierungsstatus.⁶²

B.4.3 Inhibitoren von ERK1/2 und p38 in der klinischen Therapie

Aufgrund der vielen vorklinischen Hinweise auf eine pathologische Bedeutung von ERK1/2 und p38 wurden eine Reihe synthetischer Inhibitoren dieser Kinasen in mehreren klinischen Studien auf Verträglichkeit und Wirksamkeit überprüft.

Die für die Krebstherapie konzipierten Inhibitoren des ERK1/2-Signalweges sind vor allem gegen Raf und gegen MEK1/2-gerichtet.⁶³ Bei Sorafenib etwa handelt es sich um einen Multi-Kinaseinhibitor mit Präferenz für Raf, der im Jahr 2010 als Arzneistoff für die Behandlung verschiedener Krebsarten zugelassen wurde.⁶⁴

p38-Inhibitoren sind vorwiegend für einen Einsatz bei Erkrankungen mit entzündlichen Prozessen vorgesehen und wurden in den vergangenen Jahren von verschiedenen Firmen in den klinischen Phasen I und II getestet.⁶⁵ Nach aktuellem Stand bereits ausgewerteter klinischer Studien mit systemisch applizierten p38-Inhibitoren sind die therapeutischen Erfolge jedoch begrenzt und die verzeichneten Nebenwirkungen bei den Patienten zum Teil erheblich.^{61;65}

Dagegen wird eine topische Applikation von p38-Inhibitoren insbesondere für die Behandlung von Hauterkrankungen wie der Psoriasis und Brandverletzungen als sehr viel versprechend bewertet.⁶⁶⁻⁶⁸

B.5 S-Lost

Aus der Reihe der bisher untersuchten exogenen Auslöser von Hauterkrankungen stellt auch heute noch der chemische Kampfstoff S-Lost eine besondere Herausforderung für die Therapie dar, weshalb wir uns in der vorliegenden Arbeit vor allem mit molekularen Mechanismen der S-Lost-Wirkung beschäftigt haben, um möglichst viele Hinweise auf geeignete Therapiemaßnahmen zu erhalten.

Im Folgenden sollen daher nun noch wesentliche Erkenntnisse bezüglich des schädigenden Agens S-Lost vorgestellt werden.

B.5.1 Geschichte

S-Lost wurde erstmals 1822 durch M. Depretz aus Schwefelchlorid und Ethylen synthetisiert. Der chemische Name lautet 2,2'-Dichlordiethylsulfid, für das in der Literatur zahlreiche weitere Synonyme wie Senfgas, Yperit oder Gelbkreuz existieren. Diese Bezeichnungen leiten sich von dem senf- und meerrettichartigen Geruch, der ersten militärischen Anwendung in Ypern (Ort in Belgien) oder der gelben Kreuzmarkierung von Senfgas-gefüllten Granaten im Ersten Weltkrieg ab. Im englischen Sprachraum ist die Bezeichnung *HD* (US bzw. NATO Kürzel), *Sulfur Mustard* oder *Mustard Gas* gebräuchlich.

Am bekanntesten ist diese Substanz im deutschen Sprachraum unter dem Namen Schwefel-Lost oder S-Lost, wobei sich der Name Lost von den Anfangsbuchstaben der Wissenschaftler *Lommel* und *Steinkopf* ableitet, die um 1917 in Deutschland maßgeblich an den Versuchen zur industriellen Herstellung und der militärischen Nutzung dieser Substanz beteiligt waren. S-Lost kam zum ersten Mal im Ersten Weltkrieg zum Einsatz und wurde bis heute international in etwa 12 militärischen Auseinandersetzungen benutzt.

Neben dem militärischen Einsatz wurde S-Lost auch lange Zeit zur Behandlung von Psoriasis vulgaris in einer 0,005 %-igen S-Lost-Vaseline (Psoriasin[®]) eingesetzt, bis schließlich 1979 ein mögliches kanzerogenes Risiko diskutiert wurde.⁶⁹ Darüber hinaus wurde in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts eine zytostatische Wirkung von S-Lost erkannt, was dazu führte, dass Derivate von S-Lost auch heute noch zur Anwendung in der onkologischen Therapie kommen.⁷⁰

B.5.2 Chemische Eigenschaften

Chemisch gehört S-Lost zur Gruppe der halogenierten Alkylsulfide und ist als Reinsubstanz (Abb. 7B, rechts) eine farb- und geruchlose, ölige Flüssigkeit mit hoher Beständigkeit. Der Schmelzpunkt liegt bei 14,4 °C und der Siedepunkt bei 217 °C.

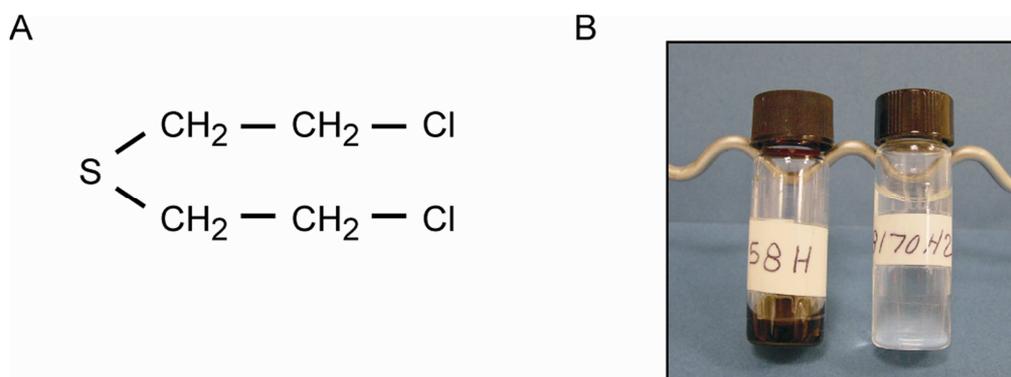


Abb. 7: S-Lost

(A) Chemische Formel von S-Lost (2,2'-Dichlordiethylsulfid).

(B) Undestilliertes (links) und gereinigtes (rechts) S-Lost
(Aufnahme aus dem Labor von T. Sawyer, Canada).

Während S-Lost in Wasser nur schwer löslich ist, kann die Substanz in Lösungsmitteln wie Ethanol oder DMSO in Lösung gebracht und so in homogene wässrige S-Lost-Mischungen überführt werden. Aufgrund seines relativ geringen Dampfdruckes bei Raumtemperatur zeichnet es sich durch eine hohe Sesshaftigkeit* aus, die es als chemischen Kampfstoff besonders gefährlich macht.⁷¹

S-Lost ist sehr lipophil und vermag rasch in verschiedenste Materialien einzudringen. Die Hydrolyse von S-Lost nimmt mit steigender Temperatur zu und erfolgt in zwei Stufen unter Bildung von Thiodiglykol.⁷²

Eine aus toxikologischer Sicht wichtige chemische Eigenschaft ist die ausgeprägte Reaktivität mit nukleophilen Reaktionspartnern wie Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff. Bei einer Alkylierung von DNA beispielsweise kommt es zunächst zur Ausbildung eines zyklischen Sulfoniumions (Abb. 8). Dieses hoch reaktive Intermediat kann dann seinerseits elektrophil an der DNA, z.B. am N7 des Guanins, angreifen. Aufgrund der bifunktionalen Eigenschaft von S-Lost kommt es häufig auch zur Quervernetzung zweier DNA-Stränge.⁷³

* Sesshaftigkeit eines Kampfstoffes beschreibt seine Beständigkeit im Gelände.

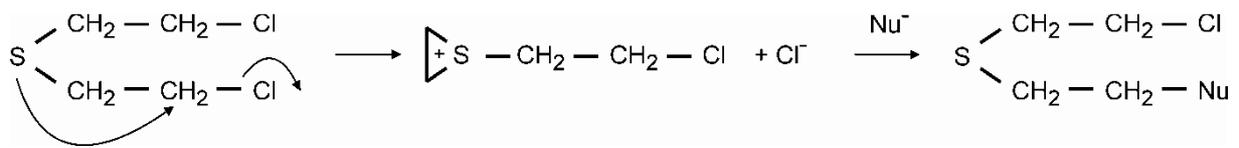


Abb. 8: Aktivierung und Alkylierungsreaktion von S-Lost

S-Lost wird durch Bildung eines hoch reaktiven Intermediats, eines sog. Sulfoniumions, aktiviert und kann in dieser Form ein Nukleophil (Nu^-), wie es zum Beispiel die DNA ist, angreifen und dieses alkylieren. Erfolgt auch die Abspaltung des zweiten Chloridions und in Folge dessen ein weiterer Angriff auf die DNA, kommt es zu einer Quervernetzung (*cross linking*) zweier Nukleotidstränge.

(Abbildung verändert nach Habermehl *et al.* ⁷⁴)

B.5.3 Toxikologische Wirkung

Die perkutane letale Dosis von S-Lost ist abhängig von der Konzentration und wird mit einem LD_{50} von 20 mg/kg angegeben.⁷⁵ Eine Blasenbildung auf der Haut findet man bei Kontakt mit 1000-2000 mg x min/m³ bei gasförmigem S-Lost und schon bei 40-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei flüssigem S-Lost.⁷⁶ Für inhaliertes S-Lost⁷⁵ liegt die LC_{50}^\dagger bei 1000 mg x min/m³.

B.5.4 Zellbiologische Aspekte

Bezüglich der Wirkung von S-Lost auf Zellen gibt es verschiedene Theorien, aber auch belegte Prozesse. Hierzu zählt zunächst die Entzündungsreaktion. Histopathologische Untersuchungen von S-Lost-geschädigtem Gewebe zeigen eine starke inflammatorische Reaktion, die sich aus der Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Mediatoren und der daraus resultierenden Einwanderung von Immunzellen (wie PMN-Granulozyten und Makrophagen) ins betroffene Gewebe zusammensetzt.⁷⁷

S-Lost bewirkt außerdem eine vermehrte Bildung von *reactive oxygen species* (ROS), was zudem noch von einer Verminderung des antioxidativ wirksamen Glutathion begleitet wird. Dies führt zu erhöhtem oxidativen Stress, was eine Schädigung zellulärer und extrazellulärer Moleküle zur Folge hat.⁷⁸

Durch die alkylierende Eigenschaft von S-Lost kommt es darüber hinaus zu DNA-Schäden, die entweder zur DNA-Reparatur (z.B. über homologe Rekombination oder Basenexzision) führen oder den Zellzyklusarrest einleiten.^{79;80}

[†] Letales Produkt aus Konzentration (mg/m³) und der Expositionszeit (t) für 50 % der Betroffenen.⁷⁵

Des Weiteren wird aufgrund der genotoxischen Eigenschaften von S-Lost eine starke Aktivierung des Proteins Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1 (PARP-1) beobachtet.⁸¹ Dieses Enzym katalysiert eine Modifizierung zellulärer Proteine mit Poly-ADP-Ribose. Dabei wird ein verstärkter Abbau von NAD⁺ und ATP initiiert, was zum Zelltod durch Apoptose sowohl über den extrinsischen als auch intrinsischen Weg führen kann.^{82;83}

In Tiermodellen kann in S-Lost-induzierten Blasen der Haut neben apoptotischem und nekrotischem Gewebe eine erhöhte Sekretion von Proteasen nachgewiesen werden, die möglicherweise durch Abbau der Basalmembran die beobachtete Blasenbildung fördern.⁸⁴

B.5.5 Symptome einer S-Lost-Vergiftung von humaner Haut

Bei S-Lost handelt es sich um eine äußerst giftige Chemikalie, die besonders die Haut, die Augen und die Atemwege schädigt. Außerdem wurde auch von einer systemischen Wirkung auf das Nerven- und Herz-Kreislauf-System sowie auf den Verdauungstrakt und das Knochenmark berichtet.^{72;73} In der Regel tritt jedoch ein symptomfreies Intervall zwischen Exposition und den ersten Krankheitszeichen auf. Je höher die Konzentration und Menge an S-Lost ist, umso kürzer fällt diese Latenzzeit aus.⁷⁶

Albert Niemann, der im Jahr 1822 über die Reaktion von Schwefelchlorid mit Ethylen ebenfalls S-Lost synthetisierte, beschrieb die Wirkung von S-Lost auf die Haut wie folgt:

*„Sie besteht darin, dass selbst die geringste Spur, die zufällig auf irgendeine Stelle der Haut kommt, anfangs zwar keinen Schmerz hervorruft, nach Verlauf einiger Stunden aber eine Rötung derselben bewirkt und bis zum folgenden Tage eine Brandblase hervorbringt, die sehr lange eitert und außerordentlich schwer heilt, unter Hinterlassung starker Narben.“*⁸⁵

Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft kann S-Lost innerhalb weniger Minuten nach Exposition schmerzfrei in die Haut eindringen. Abhängig von Expositionsdauer und Konzentration kommt es nach wenigen Stunden zur Ausbildung eines Erythems. Bei höheren Dosen bilden sich Bläschen (Abb. 9), die zu größeren Blasen konfluieren. Wenn diese mit Flüssigkeit gefüllt sind, platzen sie und hinterlassen große Ulzerationen.^{86;87} Die Blasen sind dünnwandig, enthalten eine klare oder gelbliche Flüssigkeit und sind von einem Erythem umgeben (Abb. 10A,B).

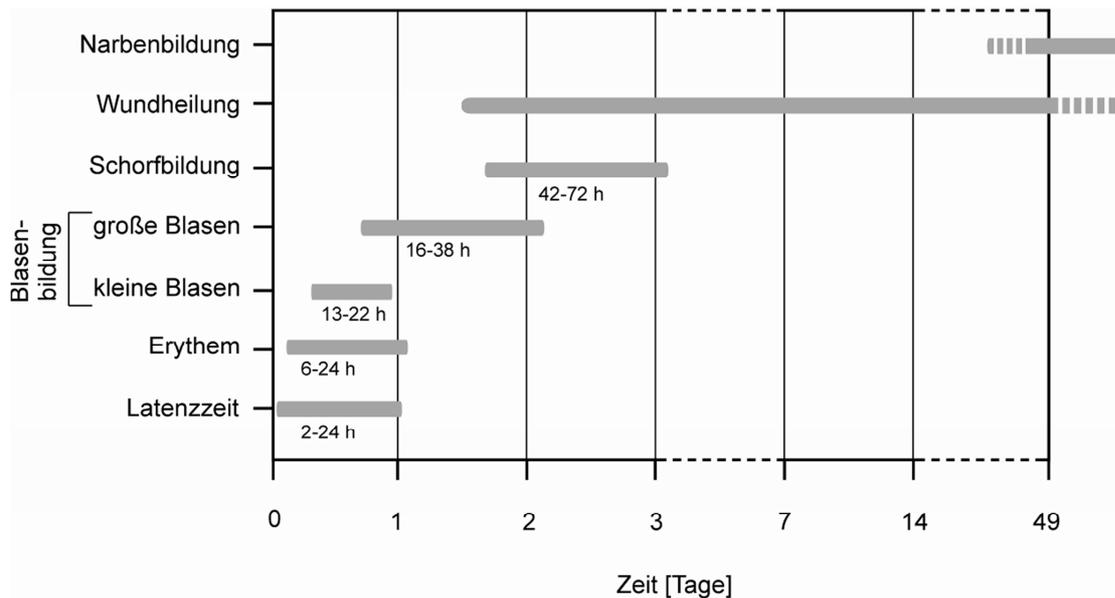


Abb. 9: Ablauf einer S-Lost-Exposition der Haut

(Abbildung verändert nach Shakarjian *et al.*⁸⁸)

Sind Hautareale mit hohen Konzentrationen in Kontakt gekommen, kann sich der Schaden auch auf tiefere dermale Hautschichten ausdehnen und dort die Fibroblasten schädigen.^{88;89}

Folge ist die Ausbildung großflächiger und tiefer nekrotischer Bereiche, die bis zur Subcutis reichen können und bleibende Gewebedefekte hervorrufen.⁸⁶

Je nach Schädigungstiefe und Gewebedestruktion dauert der Wundschluss einige Wochen bis mehrere Monate (Abb. 9, Abb. 10 C,D). Dabei ist festzustellen, dass im Vergleich zu einer blasenbildenden Verbrennung durch Hitze die Wundheilung nach Exposition mit S-Lost stark verzögert abläuft.⁷³



Abb. 10: Symptomatik einer S-Lost-Exposition der Haut

Blasenbildung 24 Stunden nach S-Lost-Exposition (A) mit ausgeprägtem Erythem nach weiteren 8 Stunden (B); Zustand der Wunde 4 (C) und 7 Wochen (D) nach der S-Lost-Exposition.

(Fotos von Hans R. Gestewitz⁹⁰)

B.5.6 Medizinische Versorgung der Haut nach S-Lost-Vergiftung

Bis heute gibt es kein Antidot[‡] gegen S-Lost. So kann bisher nur eine symptomatische Behandlung nach S-Lost-Exposition durchgeführt werden:

Zunächst sollte eine Entgiftung der Haut durch sofortiges Abwaschen mit starker Seifenlauge oder durch Besprühen der betroffenen Stellen mit Chlorkalk erfolgen. Auch das mehrmalige Behandeln der exponierten Bereiche mit einem Oxidationsmittel (wie z.B. Chloramin T) trägt durch Reaktion mit S-Lost zur Zerstörung der Substanz und durch seine antiseptischen Eigenschaften zur Desinfektion bei.⁹¹ Da die Exposition der Haut mit S-Lost zu ähnlichen Symptomen wie Verbrennungen durch übermäßige Hitzeeinwirkung führen, spricht man bei S-Lost häufig von einer chemischen Verbrennung.

Eine lokale Behandlung der betroffenen Bereiche mit Antibiotika wird immer empfohlen. Bei Zeichen einer Infektion kann auch eine systemische Verabreichung notwendig werden. Ebenso ist die Applikation von Analgetika bei Juckreiz und starken Schmerzen möglich.

Bezüglich der Blasenbildung ist noch immer stark umstritten, ob die Blasen geöffnet werden sollen oder ob man besser davon absieht.⁹² Bei geöffneten Blasen wird ein Debridement[§] durchgeführt, um die Wundheilung zu beschleunigen.

Bei sehr tiefen Verletzungen, die alle Schichten der Haut betreffen, kann eine Haut-Transplantation eine weitere, allerdings sehr aufwändige Option darstellen, um die Heilung zu verbessern.⁸⁹

Eine spezifische und effiziente Versorgung von Wunden nach S-Lost-Exposition ist bis heute nicht etabliert. Daher soll die vorliegende Arbeit dazu beitragen, die molekularen Mechanismen, die einer S-Lost-Vergiftung zugrunde liegen, auf zellulärer Ebene aufzuklären, um daraus Ansätze für verbesserte Behandlungsmethoden entwickeln zu können.

[‡] Unter einem Antidot versteht man eine Substanz, die ein Gift inaktivieren oder dessen Wirkung herabsetzen bis aufheben kann.

[§] Als Debridement bezeichnet man die Sanierung des Wundbettes durch Entfernung nekrotischer Beläge.

C ZIELE DER ARBEIT

Hautschäden nach Exposition mit S-Lost sind gekennzeichnet durch starke Blasenbildung und verzögerte Wundheilung. Die dieser Pathophysiologie zugrunde liegenden molekularen und zellulären Mechanismen sind bislang weitgehend ungeklärt.

Daher war es Aufgabe der vorliegenden Arbeit zunächst Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (TIMPs) zu untersuchen, um deren mögliche Beteiligung an der Blasenbildung nach S-Lost zu evaluieren. Hierfür sollten Analysen der Expression und Sekretion sowohl bei verschiedenen Zellen, die in der Haut zu finden sind, als auch im 3D-Hautmodell erfolgen. Darüber hinaus war es Ziel, die Auswirkung von S-Lost auf die Migrations- und Invasionskapazität der Zellen näher zu studieren.

Ein weiterer Fokus stellte die verzögerte Wundheilung nach S-Lost-Exposition dar. Da für den Heilungsprozess eine stetige Erneuerung der Zellen benötigt wird, sollte der Einfluss von S-Lost auf die Differenzierung epidermaler Progenitorzellen genauer betrachtet werden. Als wesentliche Voraussetzung für diese Studien sollte ein *in vitro*-Modell etabliert werden, das entsprechende Untersuchungen an unreifen Keratinozyten zulässt. Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der zellulären Differenzierung durch S-Lost wurden einerseits von der Bestimmung der Proliferationsrate und andererseits durch die Analyse der Expression spezifischer Markerproteine erwartet. Da Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) in der Signalweiterleitung bei Prozessen wie Differenzierung, Proliferation und Migration verschiedener Zelltypen eine wichtige Rolle spielen, sollte eine mögliche Beteiligung der beiden MAPK p38 und ERK1/2 an den durch S-Lost-verursachten Pathomechanismen untersucht werden.

Wesentliche Zielsetzungen sollten durch folgende Vorgehensweise erreicht werden:

➤ Aufklärung molekularer Mechanismen bei der S-Lost-induzierten Blasenbildung

1. Analyse von MMPs und TIMPs in Hautäquivalenten

Die Expression und Sekretion Proteolyse-assoziiierter Faktoren sollte mittels qRT-PCR, Zymographie und Western Blot bei verschiedenen Zellen der Haut und in einem dreidimensionalen Hautmodell untersucht werden.

2. Untersuchungen zu MMP-9

Vergleichende Analysen der MMP-9-Expression in Mono- und Mischkulturen von Keratinozyten und Fibroblasten sollten Aufschluss über eine mögliche gegenseitige Beeinflussung der beiden Zelltypen geben.

3. Analyse des Migrations- und Invasionsverhaltens von Hautzellen

Unter Verwendung eines Transwell[®]-Zellmigrations-Systems und des sog. *Scratch-Assays* sollten ausgewählte Zelltypen der Haut auf Veränderungen der Wanderungsraten nach Inkubation mit S-Lost oder auch mit konditioniertem Medium von S-Lost-exponierten Zellen überprüft werden.

➤ Aufklärung molekularer Mechanismen bei der verzögerten Wundheilung nach S-Lost-Exposition

1. Etablierung eines Modells für die Differenzierung von Keratinozyten

Zur näheren Betrachtung des Einflusses von S-Lost auf die Differenzierungsfähigkeit unreifer Keratinozyten sollte zunächst ein entsprechendes *in vitro*-Modellsystem mit primären Progenitorzellen etabliert werden.

2. Analyse des Differenzierungsstatus von Keratinozyten nach S-Lost-Exposition

Um die Wirkung von S-Lost auf den Reifungsprozess der Keratinozyten zu untersuchen, sollte die Proliferationsrate der Zellen mit Hilfe des WST-1-Testes quantifiziert und die Expression spezifischer Markerproteine wie Keratin-1, Involucrin und Loricrin auf mRNA (qRT-PCR) und Proteinebene (Western Blot) bestimmt werden.

3. Untersuchungen der Migrations-/Invasionskapazität von Keratinozyten unter dem Einfluss von S-Lost

Für Studien der Migrationsfähigkeit von Keratinozyten nach Exposition mit S-Lost war der Einsatz des Transwell[®]-Systems geplant.

4. Analyse der MAPK-Signaltransduktionswege in Keratinozyten

Zur Aufklärung einer möglichen Beteiligung von MAPK-Signalwegen bei Differenzierung und Migration primärer Keratinozyten sollten spezifische Inhibitoren gegen die Kinasen p38 (SB203580) und ERK1/2 (PD98059) zum Einsatz kommen.

D MATERIAL UND METHODEN

D.1 Material

D.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
BSA	Sigma, Deisenhofen
DTT	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure p.A.	Merck, Darmstadt
Ethanol p.A.	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
PhastGel Blue R (Coomassie)	Amersham Biosciences, Freiburg
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

D.1.2 Lösungen, Puffer und spezielle Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x 0,1 % TBST	24,2 g/l Tris-Base 80 g/l NaCl 10 ml/l Tween 20
Einfriermedium für NHEK	80 % KGM-2 10 % DMSO 10 % FKS
FAD-Mischkulturmedium	125 ml HAM's F12 mit NaHCO ₃ 375 ml DMEM 25 ml FKS 2,5 ml Penicillin (50000 U) 0,5 ml Adenin (12 µg/ml) 2,5 ml Insulin (5 mg/ml) 50 µl EGF (500 ng/ml)
Probenpuffer (Zymographie)	126 mM Tris-HCl 20 % Glycerin 4 % SDS 0,005 % Bromophenolblau
10x Laufpuffer (Zymographie)	30,28 g/l Tris-Base 144 g/l Glycin 10 g/l SDS
Renaturierungslösung (Zymographie)	2,7 % Triton X-100

Bezeichnung	Zusammensetzung
Entwicklungspuffer (Zymographie)	50 mM Tris, pH 7,5 200 mM NaCl 5 mM CaCl ₂ 0,2 % Brij35
Färbelösung (Zymographie)	0,002 % Coomassie Blue R-350 30 % Methanol 10 % Essigsäure PhastGel-Blue-R Tablette
Präservierungslösung (Zymographie)	5 % Glycerin 20 % EtOH

D.1.3 Agenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
2,2'-Dichlordiethylsulfid (S-Lost)	TNO, Rijswijk, Niederlande
Calciumchlorid	Promocell, Heidelberg
Diff-Quick	Dade Diagnostika, München
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Pasching
Humane extrazelluläre Matrix (hEZM)	BD Biosciences, San Jose, USA
Humanserum (HS)	PAA Laboratories, Pasching
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
Minimum Essential Medium (MEM)	PAA Laboratories, Pasching
Mitomycin C	Sigma, Deisenhofen
Nutridoma SP	Roche, Mannheim
PD98059	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories, Pasching
“Roosevelt Park Memorial Institute” (RPMI)	PAA Laboratories, Pasching
SB203580	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen

D.1.4 Zellen

Zellen	Zelltyp	Hersteller/Lieferant	Medium	Zusätze (laut Hersteller)
Zelllinien				
HaCaT ⁹³	Immortalisierte Keratinozyten	Prof. Fusenig, Freiburg	DMEM	a, b, c, d
HMEC-1 ⁹⁴	Mikrovaskuläre Endothelzellen	DSMZ, Braunschweig	EGM-2-MV	e, g, h, j, m, r, s, t
THP-1 ⁹⁵	Akute monozytäre Zellen	DSMZ, Braunschweig	RPMI 1640	a, b, c, d
Primäre Zellen				
PMN-Granulozyten	Polymorphonukleäre Granulozyten	Spenderblut	RPMI 1640	a, b, c, d
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen	Lonza, Wuppertal	MSCBM	g, n, o
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten	Lonza, Wuppertal	FBM	e, f, g, h
NHEK	Normale humane epidermale Keratinozyten	Lonza, Wuppertal	KGM-2	f, g, i, j, k, l, m, p
NHEK	Normale humane epidermale Keratinozyten	Promocell, Heidelberg	KGM-2	f, i, j, k, l, m, p
HEK	Normale humane epidermale Keratinozyten	Cellmade, Archamps, Frankreich	KGM	f, p, q
Hautmodell				
Mischkultur	NHDF und HaCaT	Lonza und Prof. Fusenig	FAD-Mischkulturmedium	a, c, f, j, u
AST2000	Humanes „Full-Thickness“ Hautmodell aus primären Keratinozyten und Fibroblasten	CellSystems®, St. Katharinen	Erhaltungsmedium	
Fa. Agenolab	Humanes „Full-Thickness“ Hautmodell aus primären Keratinozyten und Fibroblasten	Agenolab	Erhaltungsmedium	

a 10 % FKS (Hitze-inaktiviert)
 b 2 mM L-Glutamin
 c 100 units/ml Penicillin
 d 100 µg/ml Streptomycin
 e 2% FKS
 f Insulin (5 µg/ml)

g Gentamicin, Amphotericin B
 h hFGF-B
 i BPE (0,004 ml/ml)
 j hEGF (0,125 ng/ml)
 k Epinephrin (0,39µg/ml)
 l Transferrin (10 µg/ml)

m Hydrocortison (0.33 µg/ml)
 n L-Glutamin
 o MSC Growth Supplement
 p Calcium (0,15 mM)
 q Keratinocyte Growth Supplements
 r VEGF

s R³-IGF-1
 t Ascorbinsäure
 u Adenin (12 µg/ml)

D.1.5 Agenzien und Kits für zellbiologische, molekularbiologische und proteinchemische Techniken

Für zellbiologische Techniken

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Alizarin-Rot	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma, Deisenhofen
Indomethacin	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Sigma, Deisenhofen
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Oil-Red-O	Sigma, Deisenhofen
Polymorphprep™	Axis-Shield, Dundee, Schottland
WST-1 Proliferationsassay	Roche, Mannheim
XTT Cell Proliferation Kit II	Roche, Mannheim

Für molekularbiologische Techniken

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
QIAshredder	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Spezifische Primer für qRT-PCR	Search-LC, Heidelberg

Für proteinbiochemische Techniken

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Complete Mini Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	Pierce, Illinois, USA
ECL Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Freiburg
Hyperfilm-MB	GE Healthcare, Freiburg
Immobilon-P	Millipore, Bedford, USA
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Novex 10 % Zymogram (Gelatin) Gel	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE™ LDS sample buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE™ Novex 4-12 % Bis Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Whatman Filterpaper Nr.1	Whatman, Ammerbuch

Primär-Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Lieferant
<i>Keratinocyten-Differenzierung</i>			
Keratin-1	Kaninchen	1:1000	Covance, New Jersey, USA
Involucrin	Kaninchen	1:1000	Covance, New Jersey, USA
Loricrin	Kaninchen	1:1000	Covance, New Jersey, USA
PCNA	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA
<i>MMP/TIMP-Expression</i>			
TIMP-1	Maus	1:500	Abcam, Cambridge, USA
<i>MAPK-Signalweg</i>			
p38 (total p38)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA
phospho-p38	Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, USA
p42 (total ERK)	Maus	1:2000	Cell Signaling, Massachusetts, USA
phospho-p44/42 (ERK1/2)	Maus	1:2000	Cell Signaling, Massachusetts, USA
<i>Ladungskontrolle</i>			
β-Aktin	Kaninchen	1:3500	Abcam, Cambridge, USA
Sekundär-Antikörper			
Anti-Maus		1 : 1000	GE Healthcare, Freiburg
Anti-Maus		1 : 8000	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Anti-Kaninchen		1 : 1000	GE Healthcare, Freiburg
Anti-Kaninchen		1 : 8000	Cell Signaling, Massachusetts, USA

D.1.6 Geräte

Bezeichnung	Firma Hersteller/Lieferant
<i>Autoklaven</i>	
Systec 3850	Systec GmbH, Wetzlar
VST 500-C 12D	Zirbus, Bad Grund
<i>Photo-/Fluorimeter</i>	
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
DigiScan 400 (ELISA-Reader)	ASYS Hitech GmbH, Austria
NanoDrop	Peqlab Biotechnology, Erlangen
Spectrofluorimeter Safire 2	Tecan, Crailsheim
Thermal printer DPU-414	Seiko Instruments, Neu Isenburg
<i>Analytische Waagen</i>	
Analytic Balance, 3716MP (0,001-250 g)	Sartorius, Göttingen
Analytic Balance, A 120 S (0,001-12 g)	Sartorius, Göttingen
<i>Zell-Inkubator</i>	
FunctionLine	Heareus, München
HeraCell 240	Thermo Scientific, Karlsruhe
<i>Zentrifugen</i>	
Biofuge pico	Heraeus, München
Megafuge 1.0R	Heraeus, München
Universal 32R	Hettich, Tuttlingen

<i>Elektrophorese</i>	
BioMax Filmkassette	Kodak, USA
Geltrocknungsrahmen	Carl Roth, Karlsruhe
Power Supply EPS 301 und EPS 601	Amersham Bioscience, Freiburg
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Proteintransfer</i>	
Power Supply EPS 301 und EPS 601	Amersham Bioscience, München
XCell SureLock™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Mikroskope</i>	
Olympus CK X41	Olympus, Hamburg
Olympus IX70	Olympus, Hamburg
<i>Wasserbäder</i>	
Ecoline 001	Lauda, Lauda-Königshofen
WB350	Memmert, Schwabach
<i>Schüttler</i>	
Roller RM5	Uniequip, Planegg
Taumel-Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
<i>Sonstiges</i>	
Cellstar® Multiwell-Platten	Greiner Bio One, Frickenhausen
Cellstar® Zellkulturflaschen	Greiner Bio One, Frickenhausen
Eismaschine AF-10	Scotsman, Frimont, Italien
Fluoroblok™-Platte, 96-Well, 8 µm Porengröße	BD Biosciences, San Jose, USA
HeraSafe Werkbank	Heraeus, München
Hybridisierungsöfen, Hybridizer HB-100	UVP, Laboratory Products, USA
Lightcycler™ 2.0	Roche, Mannheim
Nalgene Einfrierbox	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Nunclon™ Multiwell-Platten	NUNC, Wiesbaden
Nunclon™ Zellkulturflaschen	NUNC, Wiesbaden
pH-Meter Typ 525	WTW, Weilheim
Scanner GS-800	Biorad, München
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Transwell® System, 24-Well, 8 µm Porengröße	Costar, Pleasanton, USA
Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer Typ RC 10.9	Jouan, Unterhaching

D.1.7 Software

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
CorelDRAW 12	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
LightCycler Software 3.5	Roche, Mannheim
Microsoft Office EXCEL 2003	Microsoft, Unterschleissheim
Origin 8G	OriginLab, Massachusetts, USA
Quantity One	Biorad, München
XFluor4 Safire2	Tecan, Crailsheim

D.2 Methoden

D.2.1 Zellbiologische Methoden

D.2.1.1 Exposition von Zellen mit S-Lost

2,2'-Dichlordiethylsulfid (S-Lost) wurde als 8 M Stammlösung mit 100 % Ethanol 1:10 verdünnt und anschließend mit MEM-Medium in einer Endkonzentration von 10-300 μM zu den zu untersuchenden Zellen gegeben. Die Exposition erfolgte bei Raumtemperatur (RT) unter dem Abzug, da es bei 37 °C zu einer zu schnellen Abreaktion von S-Lost kommt. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bis zu den verschiedenen Zeitpunkten der Aliquot-Entnahme mit serumfreiem Zelltyp-spezifischem Medium im Brutschrank kultiviert.

D.2.1.2 Kultivierung der Hautmodelle

Bei den 3-dimensionalen Hautmodellen der Firmen CellSystems® (AST2000) und Agenolab handelt es sich um sog. *Full-Thickness*-Modelle, die vom Aufbau her äquivalent sind. Das Modell der Fa. Agenolab, das eigentlich nicht für die Forschung zugänglich ist, wurde uns mit 6 Einsätzen einmalig vom Hersteller zur Verfügung gestellt.

Direkt nach Lieferung wurden die Hautmodelle in eine mit Erhaltungsmedium befüllte 6-Well-Platte überführt. Bis zur Durchführung des Experiments wurden sie über Nacht im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO_2 und Wasserdampfsättigung inkubiert. Nach dieser Adaptionphase erfolgte die Behandlung mit S-Lost.

D.2.1.3 Kultivierung und Differenzierung von primären Zellen

D.2.1.3.1 Normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK)

Die Zellen wurden kommerziell in kryokonservierter Form erworben. Zum Auftauen erfolgte eine 1 ½-minütige Inkubation im Wasserbad bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml auf 37 °C vortemperiertem Kulturmedium resuspendiert und direkt in zwei 75 cm^2 (T75)-Kulturflaschen mit einem Endvolumen von 15 ml Medium ausgesät.

Um die empfindlichen NHEK nach Expansion nochmals einzufrieren, wurden verschiedenste Konditionen für die Kryokonservierung ausgetestet. Schlussendlich stellte sich folgende Vorgehensweise als schonendste für die Zellen heraus:

Die NHEK wurden in einer Dichte von $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen pro ml in Einfriermedium (80 % KGM2, 10 % FCS, 10 % DMSO) suspendiert und als 1 ml-Aliquots in Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden zunächst in einer Einfrierbox über Nacht bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Kultivierung

NHEK wurden von unterschiedlichen Anbietern bezogen (siehe D.1.4). Die Aussaat der Zellen erfolgte in einer Dichte von 7.500 Zellen/cm^2 mit dem jeweiligen Wachstumsmedium und stets ohne Serumzusatz bei niedrigen Calciumkonzentrationen ($0,1\text{ mM Ca}^{2+}$). Die Expansionsphase für die NHEK reichte bis zur 3. und 4. Passage, in der die Experimente durchgeführt wurden, da *in vitro* nur etwa 15 Verdopplungszyklen dieser Zellen möglich sind. Sobald NHEK eine Konfluenz von etwa 80 % erreichten, wurden sie subkultiviert, um eine Kontakt-induzierte Veränderung der zellulären Eigenschaften zu verhindern. Vor der Ablösung der primären Keratinozyten erfolgte ein Waschschrift mit PBS. Nach Inkubation der Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung für je 3 Minuten bei RT und im Brutschrank bei 37 °C wurde die Flüssigkeit mit den abgelösten Zellen abgenommen und in einem Zentrifugationsröhrchen mit dem gleichen Volumen Neutralisierungslösung versetzt. Nachfolgend wurden die Zellen für 5 Minuten bei $200 \times g$ pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:3 in neuen Zellkulturflaschen ausplattiert.

Differenzierung

Bei den von uns verwendeten NHEK handelte es sich um eine Population unreifer Keratinozyten, die gute Proliferationseigenschaften besitzen und zu reifen Keratinozyten ausdifferenziert werden konnten.

Die Induktion der Differenzierung erfolgte zum einen durch das Erreichen der Konfluenz⁹⁶ und zum anderen durch Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration von $0,1\text{ mM}$ auf $2,0\text{ mM}$.⁹⁷ In allen Experimenten wurde unter subkonfluenten Bedingungen gearbeitet, um jederzeit die Differenzierung durch Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration einleiten zu können.

Ein erfolgreich induzierter Differenzierungsprozess war durch die quantitative Bestimmung von Differenzierungsmarkern (Keratin-1, Involucrin, Loricrin) auf RNA- und Protein-Ebene zu belegen.

D.2.1.3.2 Normale humane dermale Fibroblasten (NHDF)

Kultivierung

NHDF wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und Wasserdampfsättigung kultiviert. Alle drei bzw. vier Tage wurde das Medium gewechselt. Beim Erreichen der Konfluenz konnten sie, wie in D.2.1.4 für adhärenente Zellen beschrieben, subkultiviert oder geerntet werden.

D.2.1.3.3 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Kultivierung

hMSC wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und Wasserdampfsättigung kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte im Abstand von 3-4 Tagen. Hatten die Zellen einen Konfluenzgrad von 90 bis 95 % erreicht, konnten sie, wie in D.2.1.4 für adhärenente Zellen beschrieben, subkultiviert oder geerntet werden.

Induktion und Nachweis der adipogenen und osteogenen Differenzierung

Ein Charakteristikum der hMSC ist deren Fähigkeit *in vitro* und *in vivo* in verschiedene mesenchymale Zelltypen ausreifen zu können.⁹⁸ Hierzu wurden die Zellen in speziellen Differenzierungsmedien kultiviert, die die Entwicklung in eine entsprechende Richtung begünstigen. Die Zusammensetzung der Differenzierungsmedien basiert auf den Angaben von Pittenger *et al.*⁹⁸ für den adipogenen und von Jaiswal *et al.*⁹⁹ für den osteogenen Zelltyp. Dabei wurden die hMSC in 6-Well-Kavitäten zunächst subkonfluent ausgesät, so dass sie zu Beginn der Differenzierungsinduktion konfluent waren.

Um die adipogene Differenzierung zu induzieren, inkubierte man konfluente Zellen mit einem Induktionsmedium bestehend aus dem Basalmedium DMEM, sowie 10 % (v/v) FKS, 40 IU/ml Pen/Strep, 4 mM L-Glutamin, 1 µM Dexamethason, 200 µM Indomethacin, 10 µg/ml Insulin und 0,5 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 2-3 Wochen abwechselnd 5 Tage in diesem Medium und 2 Tage im Erhaltungsmedium kultiviert, welches das Basalmedium DMEM sowie 10 % (v/v) FKS, 40 IU/ml Pen/Strep, 4 mM L-Glutamin und 10 µg/ml Insulin beinhaltet.

Für den Nachweis der adipogenen Differenzierung von hMSC, wurden die dafür charakteristischen Fettvakuolen mit dem Farbstoff Oil-Red-O angefärbt. Dies erfolgte nach Fixierung der Zellen in 10 % Formalin, pH 7, für 2 Minuten bei -20 °C und anschließender Behandlung mit 50 % Ethanol. Unter Verwendung einer 0,2 %-igen Oil-Red-O/Isopropanol-Lösung

wurden die Fettvakuolen für 20 Minuten bei RT angefärbt. Nach einem weiteren Waschschriff mit 50 % Ethanol und Aqua dest. erfolgte die Auswertung rot gefärbter Zellen am Mikroskop. Die Extraktion des Farbstoffes mit einem Puffer bestehend aus 50 % Ethanol und 2 % (w/v) SDS und die anschließende photometrische Messung bei 405 nm ermöglichte eine quantitative Bestimmung der Rotfärbung bzw. Fettvakuolenbildung in den Zellen.

Die osteogene Differenzierung erfolgte ebenfalls über 2-3 Wochen in einem Medium bestehend aus dem Basalmedium DMEM unter Zusatz von 10 % (v/v) FKS, 100 nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerolphosphat und 50 μ M L-Ascorbinsäure-2-Phosphat. Das Medium wurde im Abstand von 3-4 Tagen erneuert.

Für den Nachweis der osteogenen Differenzierung wurden hMSC zur Überprüfung der Mineralisierungsfähigkeit mit dem Farbstoff Alizarin-Rot gefärbt. Hierfür wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 70 % Ethanol für 1 Stunde bei -20 °C fixiert. Nach einem Waschschriff mit Aqua dest. wurde der Anteil an intrazellulären Calciumablagerungen mit einer Alizarin-Rot-Lösung (40 mM, pH 4,1) für 10 Minuten bei RT auf einem Schüttler gefärbt. Nachdem die Zellen erneut mit PBS gewaschen wurden, um sie von überschüssigem Farbstoff zu befreien, erfolgte die Auswertung rot gefärbter und somit osteogen differenzierter Zellen am Mikroskop.

D.2.1.3.4 Polymorphonukleäre (PMN-) Granulozyten

Isolierung und Kultivierung

Für die Gewinnung von PMN-Granulozyten erfolgte bei freiwilligen gesunden Probanden zunächst eine Abnahme von Vollblut in EDTA-Röhrchen.

Nachfolgend überschichtete man 5 ml des Separationsmediums PolymorphprepTM mit 5 ml EDTA-Vollblut in einem 15-ml-Zentrifugationsröhrchen bei einer Temperatur von 18-22 °C. Zur Ausbildung des Dichtegradienten und Auftrennung der verschiedenen Zelltypen wurde eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 450-500 x g und RT in einem Ausschwing-Rotor vorgenommen. Danach war im Röhrchen eine obere Bande bestehend aus mononukleären Zellen und eine untere Bande aus PMN-Zellen zu unterscheiden. Die so angereicherten Zellen konnten dann jeweils mit einer Pasteurpipette abgenommen werden. Die PMN-Fraktion wurde durch Zugabe von 1 ml Medium (1:1 verdünnt mit H₂O) verdünnt, in einem 15-ml-Reaktionsgefäß bei 400 x g für 10 Minuten bei RT abzentrifugiert, mit RPMI-Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Die so gewonnenen Zellen konnten dann mit RPMI/Nu-Medium in Kultur genommen werden.

Zellfärbung

Für die Anfärbung eines Blutausstriches wurde Diff-Quick verwendet. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Pappenheim-Färbung, bei der nach Fixierung der Präparate zunächst das eosinophile Zytoplasma mit Lösung I (Xanthen-Farbstoff) und nachfolgend der basophile Zellkern mit Lösung II (Thiazin-Farbstoff) angefärbt werden. Nach dem Abspülen mit Aqua dest. werden die Präparate an der Luft getrocknet. Anschließend können die morphologischen Veränderungen unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden.

D.2.1.4 Haltung von Stammkulturen

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und Wasserdampfsättigung kultiviert. Die Passagierung der Stammkulturen erfolgte in 25 cm² (T25)-Flaschen routinemäßig zweimal pro Woche unter Verwendung entsprechender Medien (siehe D.1.4). Hierfür wurden die Suspensionszellen in ein Zentrifugationsröhrchen überführt, bei 250 x g abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und in entsprechende Zellkulturflaschen überführt.

Adhärente Zellen hingegen wurden zunächst mit PBS gewaschen, um eine Inaktivierung des Trypsins durch Rückstände des im Medium enthaltenen Serums zu verhindern. Nach Zugabe der Trypsin/EDTA-Lösung und einer 5-minütigen Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen abgelöst und in neue Zellkulturkavitäten mit frischem Medium ausgesät werden.

Für Experimente unter serumfreien Bedingungen wurde fötales Kälberserum (FKS) durch 1 % Nutridoma SP als Supplement ersetzt.

D.2.1.5 Mischkultur von HaCaT-Keratinocyten und primären Fibroblasten

Um die gegenseitige Beeinflussung unterschiedlicher Zelltypen aus Epidermis und Dermis unter Ermöglichung von Zellkontakt untersuchen zu können, wurden HaCaT-Keratinocyten mit primären Fibroblasten (NHDF) in einer sog. Mischkultur inkubiert.

Arretierung der primären Fibroblasten mit Mitomycin C

Für die Herstellung der zweidimensionalen Mischkultur wurden Proliferations-arretierte Fibroblasten benötigt. Die Arretierung der Zellen in ihrem Zellzyklus und die sich daraus ergebende Wachstumshemmung sind nötig, um eine Überwucherung der Keratinocyten bei

der Cokultivierung zu verhindern. Hierfür wurden, entsprechend dem leicht abgewandelten Protokoll von G. E. Jones¹⁰⁰, die Fibroblasten über einen Zeitraum von 8 Stunden im Brutschrank mit Mitomycin C (8 µg/ml) inkubiert, was zu einem Anhalten des Zellzyklus führt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und unter Standardbedingungen weiter in Kultur gehalten.

Herstellung der Mischkultur

Die Proliferations-arretierten Fibroblasten wurden standardmäßig trypsinisiert, in Zellkulturschalen mit einer Zelldichte von 10^4 Zellen/cm² in FAD-Mischkultur-Medium ausgesät und dann im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden waren die Fibroblasten adhärent, so dass die Zugabe von humanen immortalisierten Keratinozyten (HaCaT) in einer Zelldichte von 10^4 Zellen/cm² erfolgen konnte.

Für serumfreie Bedingungen wurde die Mischkultur vor Versuchsbeginn mit PBS gewaschen und in FAD-Mischkulturmedium mit 1% Nutridoma SP kultiviert.

Stimulation der Zellen mit konditionierten Medien

Für eine Analyse der parakrinen Wirkung von sezernierten Proteinen wurden Zellen mit konditionierten Medien (KM) eines anderen Zelltyps inkubiert. Zur Untersuchung der parakrinen Wirkung von Proteinen immortalisierter Keratinozyten (HaCaT) und primärer Fibroblasten (NHDF) wurden die Zellen in 6- oder 12-Well-Platten ausplattiert. Für die Stimulation wurden KMs von unbehandelten und S-Lost-behandelten Zellen (HaCaT, NHDF) benutzt.

Um die Beteiligung eines definierten Proteins an einem beobachteten zellulären Effekt zu belegen, wurden neutralisierende Antikörper eingesetzt, die durch Bindung an das spezifische Antigen dessen biologische Aktivität aufheben. Im Falle sezernierter Proteine wurden die KMs mit den entsprechenden neutralisierenden Antikörpern 10 Minuten vorinkubiert und nachfolgend zu den Zellen gegeben. Zur Blockierung von Membranrezeptoren erfolgte eine 5-minütige Vorinkubation der Zellen mit dem entsprechenden Antikörper vor Zugabe der KMs.

D.2.1.6 Bestimmung der Zellproliferation und Vitalität

Sowohl der WST-1 (water soluble tetrazolium) als auch der XTT-Test dienen der Bestimmung der Zellproliferation und Vitalität der Zellen. Die Assays basieren auf einer enzymatischen Umsetzung des gelben Tetrazolium-Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) beziehungsweise des XTT (Natrium 3,3-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate) in das jeweilige rote Formazan. Die Enzyme, die für diese Umsetzung verantwortlich sind, befinden sich in den Mitochondrien, so dass ein Farbumschlag auf eine intakte Atmungskette und somit auf vitale Zellen schließen lässt. Die Intensität der Färbung ist proportional zur Zellzahl und gibt somit Aufschluss über die Zellteilungsrate.

Der Vorteil des WST-1-Proliferationsassays gegenüber dem zuvor entwickelten XTT-Assays besteht darin, dass das gebildete Formazan wasserlöslich und stabiler ist, so dass die Messungen in den abgenommenen Überständen durchgeführt und die Zellen nach der Behandlung weiter verwendet werden können.

In unseren Experimenten wurden die Zellen 2 Stunden mit dem WST-1- oder XTT-Reagenz (1:20) in Zellkulturmedium inkubiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Färbung bei 450 nm in einem Photometer.

D.2.1.7 Bestimmung der Zellzahl

Bei lebenden Zellen können bestimmte Farbstoffe wie z.B. Trypanblau nicht ins Zellinnere gelangen, während sich tote Zellen mit dem entsprechenden Farbstoff anfärben. Somit ist eine mikroskopische Unterscheidung vitaler Zellen von toten möglich.

Die zu untersuchende Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung [0,5 % (w/v) Trypanblau in H₂O dest. sterilfiltriert] versetzt und gemischt. Anschließend wurde der Anteil vitaler ungefärbter Zellen im Vergleich zu gefärbten toten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

D.2.1.8 Bestimmung der zellulären Migration

Scratch-Assay

Untersuchungen zur Migrationsfähigkeit von Zellen im Kontext der Wundheilung erfolgten unter Verwendung des sog. *Scratch-Assays*.¹⁰¹ Hierfür wurden Zellen in 6-Well-Platten bis zur Konfluenz gezüchtet, bevor in den Zellrasen mit Hilfe einer Pipettenspitze bis zu 3

parallel verlaufende „Kratzer“ (*Scratches*) eingebracht wurden. Die durch diese Behandlung verletzten Zellen und möglicherweise von ihnen abgegebene Faktoren wurden nicht entfernt, um die Situation in einer Wunde zu simulieren. Nun wurden die *Scratches* mit einem Mikroskop unter Zuhilfenahme einer Kamera dokumentiert (t= 0 Stunden). Nach Inkubation der Ansätze mit verschiedenen Medien und Zusätzen ließ sich der Verschluss der *Scratches* als Ausdruck zellulärer Migration zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen und mit den Kontrollansätzen vergleichen.

Bei den verwendeten Medien handelte es sich ausschließlich um serumfreie Medien, um ein Einbringen exogener Migrations-stimulierender Faktoren zu vermeiden.

Migrations- und Invasionsassay im Transwell®-System

Die Migrationskapazität der Zellen und die Invasionskapazität, bei der die Zellen durch rekonstituierte Basalmembranen in Richtung eines Konzentrationsgradienten wandern, wurde in einem *in vitro*-Modell unter Verwendung des sog. Transwell®-Systems der Fa. Costar untersucht (Abb. 11). Dieses besteht aus Einsätzen, die in die Vertiefungen einer 24- oder 96-Well-Platte eingebracht werden und eine Membran mit 8 µm Porengröße enthalten. Dadurch entstehen zwei räumlich voneinander abgegrenzte Kompartimente.

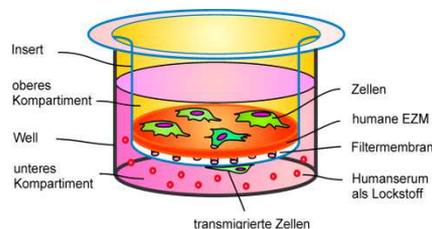


Abb. 11: Schematische Darstellung des Transwell®-Systems zur Bestimmung der Invasionsrate

Für Details siehe Text.
(Abbildung modifiziert nach Egea¹⁰²)

Vor dem Einsetzen der Zellen in das obere Kompartiment der 24-Well-Platten wurden die Membranen mit 10 µg humaner extrazellulärer Matrix (hEZM) beschichtet. Für die Beschichtung wurde die hEZM in 200 µl serumfreiem RPMI-Medium suspendiert, in das obere Kompartiment auf die Membran pipettiert und unter sterilen Bedingungen über Nacht bei RT inkubiert, wobei die Flüssigkeit verdampfte und eine gleichmäßige Beschichtung der Membranen gewährleistet wurde. Bevor die Zellsuspension in das obige Kompartiment eingebracht wurde, erfolgte das Rehydrieren der Membranen durch Zugabe von 200 µl RPMI. In das untere Kompartiment wurden 600 µl Medium gefüllt, das als Lockstoffmischung für migrierende Zellen 10 % Humanserum enthielt.

Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37 °C erfolgte die Quantifizierung der transmigrierten Zellen. Hierfür wurden zunächst die auf der Filtermembran im oberen Kompartiment liegenden, nicht migrierten Zellen mit Hilfe eines Wattestäbchens entfernt. Für die Visualisierung der durch die hEZM und die Membranporen auf die Unterseite der Membran gewanderten Zellen kam die Diff-Quick-Färbung zum Einsatz, bei der Zellen durch kurzzeitiges sequentielles Eintauchen in drei Lösungen fixiert und gefärbt werden (siehe D.2.1.3.4). Die Anzahl der gefärbten Zellen auf der Unterseite der Membran wurde lichtmikroskopisch bestimmt.

Die Migrations- und Invasionsrate ist das Verhältnis von den gewanderten Zellen im unteren Kompartiment und der eingesetzten Gesamtzellzahl. Anschließend wurden die Wanderungsraten durch Bildung des Quotienten aus (mit S-Lost- oder Ca^{2+}) behandelte Zellen und unbehandelter Zelle miteinander verglichen.

Ein spezielles Transwell®-System stellen die Fluoroblok™-Platten (96-Well) der Fa. BD Biosciences dar (Abb. 12). Bei diesem System bestehen die Inserts aus einer Fluoreszenz-undurchlässigen PET-Membran, so dass man die zuvor Fluoreszenz-gefärbten Zellen, die ins untere Kompartiment gewandert sind, mit der „bottom-read“-Funktion eines Fluoreszenzreaders (Tecan Safire) bestimmen kann.

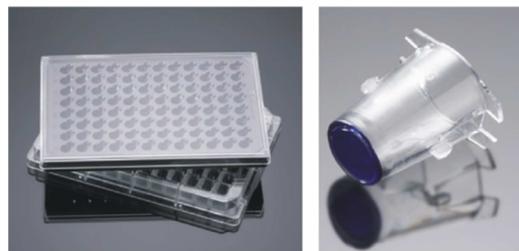


Abb. 12: Fluoroblok™-Platte mit spezieller Fluoreszenz-undurchlässiger Membran

Für Details siehe Text.
(Abbildungen von BD Biosciences)

Die Durchführung dieses Zellwanderungs-Assays unterscheidet sich in einigen Punkten von dem zuvor beschriebenen System. So wurden die Zellen einen Tag vor dem Versuch mit 10 µg/ml DiO (3,3'-Dioctadecyloxycarbocyaninperchlorat) angefärbt, einem Fluoreszenz-Farbstoff der sich in die Zellmembran einlagert. Außerdem wurden für die Beschichtung nur 2,5 µg hEZM pro 96-Well eingesetzt. Zu ausgewählten Zeitpunkten schließlich wurde die Migrations- oder Invasionsrate in einem Fluoreszenzreader bei einer Extinktion von 485 nm und Emission von 530 nm bestimmt.

D.2.2 Molekularbiologische Methoden

D.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Für die Gewinnung der Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen wurde der RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet, mit dem bis zu 100 µg RNA aufgereinigt werden können. Die Lyse der Zellen erfolgte in 350 µl RLT-Lysepuffer, der mit β-Mercaptoethanol (1 % Endkonzentration) versetzt wurde. Unter Verwendung einer sog. QIAshredder-Säule wurde das Zelllysate durch 2-minütige Zentrifugation bei 13.000 x g homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend mit 350 µl 70 %-igem Ethanol versetzt, um geeignete Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silica-Matrix der RNeasy-Säule zu gewährleisten, die unter Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 Sekunden erfolgte. Die nachfolgenden Waschschrte mit RW1- und RPE-Puffer wurden unter Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit durchgeführt. Abschließend konnte die Gesamt-RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert werden (1 Minute, 13.000 x g).

D.2.2.2 cDNA-Synthese

Als Voraussetzung für eine Quantifizierung spezifischer Gentranskripte mittels PCR muss mRNA in cDNA überführt werden. Dies erfolgte unter Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription Kits mit einem Einsatz von 500 ng Gesamt-RNA. Diese wurde zunächst mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Um in späteren Reaktionen keine störende genomische DNA zu haben, wurde ein 2-minütiger Verdau bei 42 °C mit 2 µl gDNA *wipeout* (7x) Puffer durchgeführt. Im Anschluss fand bei 42 °C für 15 Minuten die cDNA-Synthese statt, zu der ein Puffer bestehend aus 1 µl reverser Transkriptase (RT), 4 µl Quantiscript® RT-Puffer (5x) und 1 µl RT-Primer Mix benötigt wurde. Um die cDNA-Synthese am Ende der Inkubationszeit zu stoppen, erfolgte die Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 95 °C für 3 Minuten.

Für den Einsatz im LightCycler wurden die cDNA mit 200 µl RNase-freiem Wasser verdünnt.

D.2.2.3 Quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative Bestimmung der Kopienzahl der diversen Gentranskripte wurde unter Verwendung des LightCycler 2.0-Systems der Firma Roche durchgeführt.

In jedem Reaktionsansatz wurden 7 µl cDNA mit 1 µl Primer für das zu untersuchende Gen sowie mit 1 µl Reaktionspuffer und 3 µl Wasser versetzt. Der Reaktionspuffer enthielt den Farbstoff SYBR Green I, die Taq DNA-Polymerase und dNTPs. SYBR Green I interkaliert in doppelsträngige PCR-Produkte, so dass deren Amplifikation über den Anstieg des Fluoreszenzsignals gemessen werden kann. Über die Verdünnungsreihe eines Standards mit genau definierter Kopienzahl kann berechnet werden, wie viele Kopien ursprünglich im Probenmaterial vorhanden waren.

Die PCR-Bedingungen wurden vom Hersteller (Search-LC) der spezifischen Primer vorgegeben. So erfolgte die Denaturierung der cDNA durch Erhitzung auf 95 °C für 5 Minuten. Die Vervielfältigung spezifischer Transkripte geschah anschließend in 35 Amplifikationszyklen. Jeder dieser Zyklen gliederte sich in drei aufeinanderfolgende Phasen, die bei einer Fluoreszenzverstärkung von 5 durchgeführt wurden: Beim 10-sekündigen Erhitzen auf 95 °C wurden die DNA-Stränge in Einzelstränge zerlegt. Darauf folgte ein Annealingschritt bei 68 °C für 10 Sekunden, bei dem sich die Primer an die Einzelstränge anlagern. Während des anschließenden 16-sekündigen Elongationsschritts bei 72 °C synthetisierte die Polymerase vom Primer aus den restlichen Transkriptabschnitt.

Abschließend erfolgte stets eine Schmelzkurvenanalyse, um Störungen durch Primerdimere und unspezifische Produkte ausschließen zu können.

D.2.3 Proteinchemische Methoden

D.2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten

Für die Extraktion des Gesamtproteins aus Zellen wurden zwei verschiedene Puffer verwendet: Zum einen kam der sog. RIPA-Puffer [bestehend aus 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 1 % NP-40, 0,1 % SDS und Zusatz eines Protease-Inhibitor-Cocktails (Complete Mini Inhibitor Cocktail; 1 Tabl./10 ml)], zum anderen der sog. Triton X-100 Puffer [bestehend aus 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1,5 % Triton X-100 und den oben genannten Protease-Inhibitoren (1 Tabl./10 ml)] zum Einsatz. Wie sich herausstellte, eignete sich der RIPA-Puffer aufgrund der starken Detergenzien besonders gut für die Extraktion quervernetzter Proteine (wie Strukturproteine und Intermediärfilamente) die in den Keratinozyten vorzufinden sind.

Vor der Lyse wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro 100 μ l Lysepuffer aufgeschlossen. Die mit Hilfe eines Zellschabers von der Plastikoberfläche gelösten Zellen wurden anschließend für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach mehrfachem Vortexen und Homogenisierung der zellulären Bestandteile durch wiederholtes Aufziehen in eine Spritze mit Kanüle wurden verbliebene unlösliche Partikel bei $14.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 Minuten abzentrifugiert und verworfen. Die als Überstand gewonnenen Proteinextrakte wurden aliquotiert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ für spätere Proteinanalysen aufbewahrt.

D.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in einem Zellextrakt oder Kulturüberstand erfolgte mittels der Bradford-Methode, die auf einer Farbumschlagsreaktion beruht, sobald der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue-G-250 in einem sauren Milieu an Proteine bindet.¹⁰³ Die Erfassung der Veränderung im Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm (einhergehend mit einem Farbwechsel von braun nach blau) konnte zur Ermittlung der Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve genutzt werden.

Für die Proteinbestimmung wurden 100 μ l der zu analysierenden Probe sowie je 100 μ l einer BSA-Verdünnungsreihe mit gleichem Volumen des Coomassie-Reagenzes versetzt und bei 595 nm in einer 96-Well-Platte gemessen.

D.2.3.3 Proteinnachweis mittels SDS-PAGE und Western Blot

Der Analyse von Proteinen in einem Immunoblot, dem sog. Western Blot, geht eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine eines Zelllysats oder eines konditionierten Mediums in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) voraus. Das anionische Tensid SDS, das im Probenpuffer und im Gel präsent ist, bindet an Proteine, wodurch deren Eigenladung überdeckt wird. Bei Durchführung eines Western Blots unter denaturierenden Bedingungen wird die Probe nach Zugabe des Reduktionsmittels DTT zur Spaltung von Disulfidbrücken 5 Minuten bei 99 °C gekocht, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufzubrechen. Die negativ geladenen Proben werden anschließend in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Für diese Elektrophorese wurden 4-12 % SDS-Minigele mit einem Bis-Tris-Puffersystem verwendet. Das Gel wirkt hierbei wie ein Sieb, so dass die Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden.

Für den Transfer auf eine PVDF-Membran wurde ein senkrecht zum Gel angebrachtes elektrisches Feld angelegt. Die transferierten Proteine haften über hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran. Danach diente eine einstündige Blockierung der Membran mit 10 %-iger fettfreier Magermilch zur Absättigung unspezifischer Bindestellen. Anschließend wurde die Inkubation mit einem in TBST verdünnten Antikörper für eine Stunde bei RT auf einem Schüttler oder über Nacht bei 4 °C auf einem Roller je nach Antikörper durchgeführt. Nach zwei 10-minütigen Waschschritten mit TBST erfolgte die Zugabe des mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpers für 30 Minuten. Erneut wurde zweimal mit TBST gewaschen, bevor die Membran zur Detektion mittels Chemilumineszenz mit dem Entwicklungsreagenz für 1 Minute inkubiert wurde.

D.2.3.4 Zymographie

Die Zymographie dient zum Nachweis enzymatischer (proteolytischer) Aktivitäten von Proteinen, die mittels SDS-Elektrophorese aufgetrennt wurden. Dabei erfolgt eine Wechselwirkung mit den in das Gel eingegossenen spezifischen Substraten und deren proteolytischer Abbau.¹⁰⁴ Für die Gruppe der Typ IV Kollagenasen/Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) wird denaturiertes Kollagen (Gelatine) als ein charakteristisches Substrat verwendet.

Die Auftrennung der in das Kulturmedium (konditioniertes Medium) sezernierten Proteine erfolgte in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel, das 0,1 % Gelatine enthielt. Um die gelatinolytischen Enzyme (MMP-2,-9) nicht irreversibel zu denaturieren, wurden nicht-

reduzierenden Bedingungen eingesetzt. Nach der Auftrennung wurde das Gel zweimal für 15 Minuten in Triton X-100 Renaturierungslösung gewaschen, um das SDS zu entfernen und somit den Proteinen eine Rückfaltung zu ermöglichen. Danach führte man eine weitere Inkubation zunächst für 15 Minuten zur Äquilibrierung des Gels bei RT und im Anschluss für 18 Stunden bei 37 °C im Entwicklungspuffer durch. Die Färbung des Gels erfolgte mittels einer 0,02 % Coomassie Blue R-350-Lösung in einer 30 % Methanol/10 % Essigsäure-Mischung für 90 Minuten, wodurch die Gelatinasen als helle Aktivitätsbanden auf dunkelblauem Hintergrund sichtbar werden.

Als Marker für die Wanderungseigenschaften der beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 wurde das konditionierte Medium von PMA-stimulierten HT1080 verwendet, das die Proform von MMP-9 (~ 92 kDa) sowie die Proform (~ 72 kDa) und aktive Form (~ 66 kDa) der MMP-2 enthält.¹⁰⁵

D.2.4 Statistische Datenanalyse

Zur Datenanalyse wurden die Mittelwerte \pm SD von Triplikat-Ansätzen mit dem Student's T-Test für zwei unabhängige Gruppen miteinander verglichen. Hierfür wurden die Programme Excel (Microsoft Office XP) und Origin 8G verwendet.

Als statistisch signifikant wurden P-Werte angesehen, die kleiner als 0,05 (*), 0,01 (**), und 0,001 (***) waren.

E ERGEBNISSE

E.1 Einfluss von S-Lost auf die MMP/TIMP-Expression von Hautzellen

Nach Kontakt von S-Lost mit der Hautoberfläche kommt es zur Ausbildung charakteristischer Blasen, die mit der Zerstörung von Basalmembranstrukturen einhergeht, welche vor allem aus Kollagen Typ IV bestehen. Aufgrund dieser Symptomatik sollte die Beteiligung der die extrazelluläre Matrix (EZM) degradierenden Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) – insbesondere der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 – und des *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1* (TIMP-1) verschiedener Zelltypen der Haut *in vitro* analysiert werden.

Zu diesem Zweck wurden ein 3D-Hautmodell sowie Monokulturen von Hautzellen zunächst für 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen kultiviert, um die Zellen an die neuen Kulturverhältnisse zu adaptieren. Anschließend erfolgte eine jeweils 30-minütige Exposition der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von S-Lost (10, 30, 100, 300 μM) bevor die Zellen gewaschen und serumfrei weiter kultiviert wurden. Die für den jeweiligen Zelltyp maximal verträgliche S-Lost-Konzentration war zuvor unter Verwendung eines Vitalitätsassays (WST-1/XTT) ermittelt worden.

Zum Nachweis der Expression/Sekretion der MMPs und des Inhibitors TIMP-1 auf mRNA- und Proteinniveau wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mRNA aus den Zellen isoliert bzw. Kulturüberstand (konditioniertes Medium) entnommen. Für die Bestimmung intrazellulärer oder Membran-assoziiierter Proteine erfolgte 72 Stunden nach S-Lost-Behandlung eine Lyse der Zellen mit nachfolgender Proteinextraktion.

Zur Klärung der Frage, ob S-Lost transkriptionelle Veränderungen bezüglich der mRNA-Expression von MMP- und TIMP-1 in den Zellen hervorruft, wurde die quantitative *real-time*-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) eingesetzt. Die so gewonnenen Expressionsraten wurden stets einer Normalisierung mit *Housekeeping*-Genen wie CPB oder GAPDH unterzogen, die auch bei S-Lost-Behandlungen in den Zellen stabil transkribiert wurden. Für die Validierung dieser S-Lost-induzierten Effekte wurden Kulturüberstände auf den Gehalt sezernierter MMPs und TIMP-1 unter Verwendung von Zymographie und Western Blot untersucht.

In den nachfolgenden Ergebnisdarstellungen sind aus Übersichtsgründen nur Daten für jeweils eine Behandlung mit bestimmten S-Lost-Konzentrationen zu ausgewählten Zeitpunkten dargestellt, die die deutlichsten Effekte zeigen.

E.1.1 Analyse im Hautmodell

Bei dem verwendeten Hautmodell handelt es sich um ein kommerziell erhältliches *in vitro*-3D-Vollhautmodell (Abb. 13A), bei dem auf Multiwell-Inserts eine der Dermis nachgebildete Schicht aus primären humanen Fibroblasten aufgebracht ist, die in eine Kollagenmatrix eingebettet ist. Darüber befinden sich mehrere Schichten primärer humaner Keratinozyten. Diese „Dermis“ und „Epidermis“ des „Full-Thickness“-Hautmodells sind – wie unter physiologischen Bedingungen – durch eine funktionelle Basalmembran voneinander getrennt (Abb. 13B).

Vor Beginn des Experiments werden die Inserts in Multiwells eingehängt, die bis auf Höhe der Zellen mit einem chemisch definierten Kulturmedium des Herstellers befüllt werden, wobei die Keratinozytenoberfläche in Kontakt mit der Luft steht (sog. Luft-Medium-Grenze).

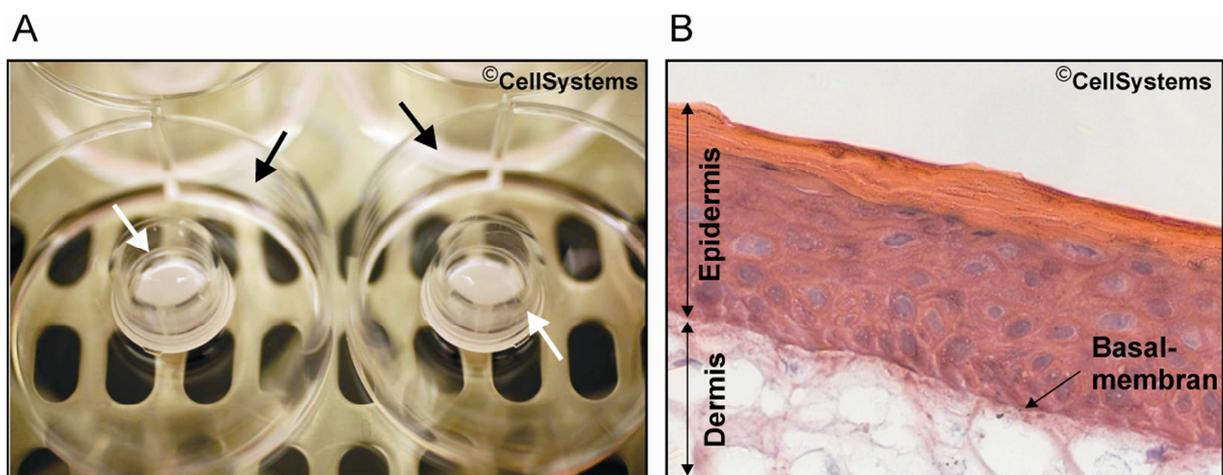


Abb. 13: Darstellung des Hautmodells

- (A) Makroskopische Aufnahme des Hautmodells AST2000, das in Inserts mit $0,6 \text{ cm}^2$ Fläche (weiße Pfeile) kultiviert und hier für die Aufnahme in die Vertiefung einer 6-Well-Platte (schwarze Pfeile) gesetzt wurden.
- (B) Die mikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme zeigt das dreidimensionale „Full-Thickness“-Hautmodell bestehend aus einer mehrschichtigen „Epidermis“ mit darunterliegender „Dermis“ und einer dazwischenliegenden Basalmembran.

(Fotos von © CellSystems®)

Die Oberfläche des Hautmodells wurde für 30 Minuten mit S-Lost in einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ exponiert, anschließend gewaschen und für 6 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert.

Nach Abnahme der Kulturüberstände (konditioniertes Medium) wurden die Zellen lysiert und die RNA isoliert. Die nachfolgend durchgeführte mRNA-Expressionsanalyse zeigte, dass die basale Transkription von MMP-9 nach Inkubation mit S-Lost annähernd dreifach erhöht war, während die von MMP-2 und TIMP-1 weniger starke Veränderungen aufwiesen (Abb. 14A). Dieser Effekt konnte für die in den Kulturüberstand sezernierten Formen MMP-9 und MMP-2 durch zymographische Untersuchung des konditionierten Mediums auch auf Proteinebene verifiziert werden (Abb. 14B).

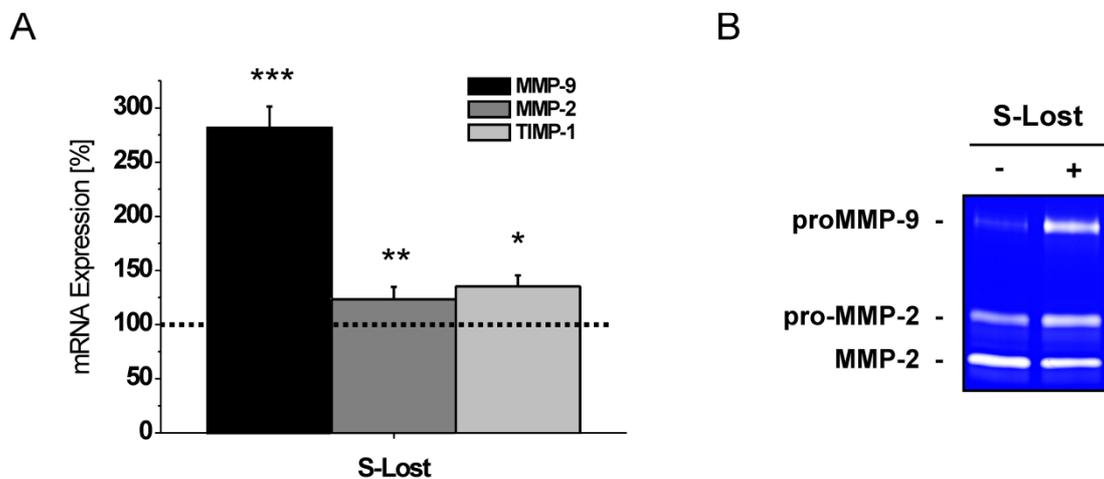


Abb. 14: Einfluss von S-Lost auf die Expression und Sekretion von MMPs und TIMP-1 im Hautmodell

Der Einfluss von 30 μ M S-Lost auf die Zellen des Hautmodells (AST2000, CellSystems[®]) wurde 6 Stunden nach Exposition auf mRNA- und Protein-Ebene bestimmt.

(A) Die mRNA-Expression von MMPs und TIMP-1 wurde über qRT-PCR ermittelt. Als Referenz dienten die mit Lösungsmittel behandelten Kontrollzellen (100 %). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

(B) Mittels Zymographie wurden die basale (mit Lösungsmittel behandelt) (-) und die S-Lost-beeinflusste (+) Sekretion von MMP-2 und -9 in das Kulturmedium gemessen.

E.1.2 Analyse von Keratinozyten und Fibroblasten in Mono- und Mischkultur

Um zu klären, ob Keratinozyten und/oder Fibroblasten unabhängig voneinander oder durch molekulare Interaktionen zu der im Hautmodell beobachteten MMP-9-Induktion beitragen, wurden beide Zelltypen sowohl in Mono- als auch in Mischkultur analysiert. Basierend auf einem bereits etablierten Mischkultursystem¹⁰⁶ verwendeten wir für diese Untersuchungen primäre Fibroblasten (NHDF) und immortalisierte Keratinozyten (HaCaT).

E.1.2.1 Expression und Sekretion von MMPs und TIMP-1

Monokulturen von NHDF und HaCaT wiesen eine basale mRNA-Expression und Freisetzung von MMP-2 auf, die sich unter Einwirkung von S-Lost nicht signifikant veränderte (Abb. 15A,B). Gleiches zeigte sich für die mRNA-Expression von TIMP-1 (Abb. 15A).

Für MMP-9 hingegen konnte in beiden Zelltypen weder eine relevante basale noch eine S-Lost-induzierte Transkription bzw. Freisetzung nachgewiesen werden (Abb. 15A,B).

Wurden die Zellpopulationen jedoch gemischt, war zusätzlich zur MMP-2- und TIMP-1-Produktion bereits nach 24 Stunden eine basale MMP-9-mRNA-Expression zu verzeichnen, die sich nach 72 Stunden auch in einer nachweisbaren Sekretion niederschlug und nach Inkubation mit S-Lost massiv zunahm (Abb. 15A,B).

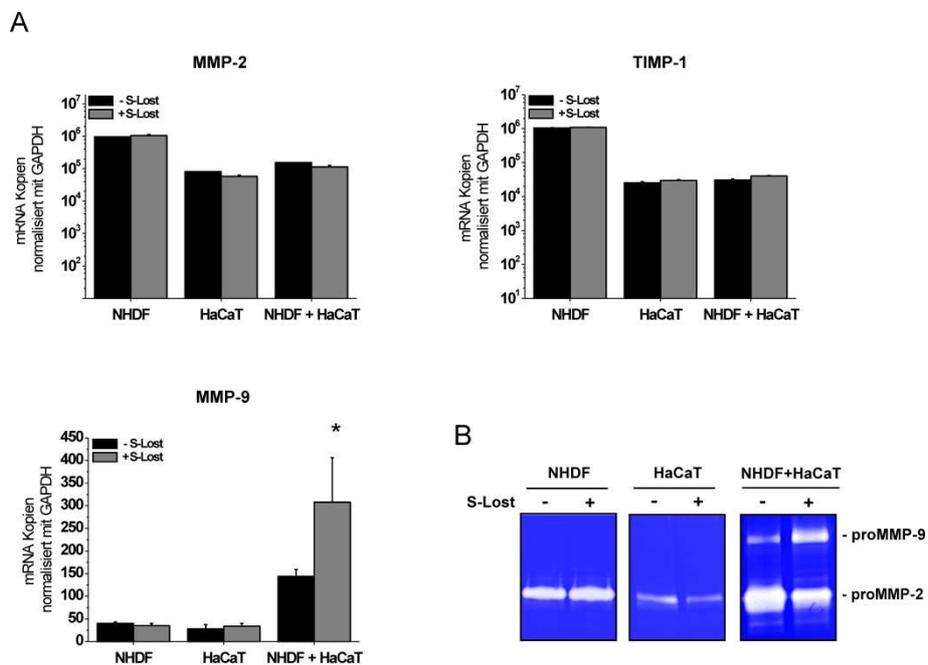


Abb. 15: Einfluss von S-Lost auf die Expression und Proteinsekretion von MMPs und TIMP-1 in Mono- und Mischkultur

Fibroblasten (NHDF) und Keratinozyten (HaCaT) wurden in Monokultur sowie in Mischkultur (Verhältnis 1:1) kultiviert. Nach Exposition mit 100 μ M S-Lost oder der Lösungsmittelkontrolle erfolgte die Analyse.

(A) mRNA-Expression von MMP-2, -9 und TIMP-1 mittels qRT-PCR nach 24 Stunden.

(B) Biosynthese von MMP-2 und -9 mittels Zymographie nach 72 Stunden.

* $P < 0,05$ bezieht sich auf die Kopien in der unbehandelten Mischkultur.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Mischkultivierung von Fibroblasten und Keratinozyten zur Induktion der MMP-9-Produktion führt, die möglicherweise über Zell-Zellkontakt oder einen parakrinen Mechanismus mit löslichen Faktoren erfolgt, der nach Einwirkung von S-Lost auf die Zellen verstärkt wird.

E.1.2.2 Analyse des parakrinen Mechanismus der MMP-9-Sekretion in Mischkultur

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob Fibroblasten und/oder Keratinozyten für die S-Lost-stimulierte Biosynthese von MMP-9 in Mischkultur verantwortlich waren. Um zu klären, ob lösliche Faktoren als Transmitter zwischen beiden Zellpopulationen agieren, wurden von S-Lost-behandelten NHDF bzw. HaCaT Kulturüberstände als konditionierte Medien (KM) generiert und mit dem jeweils anderen unbehandelten Zelltyp inkubiert.

Während das KM von NHDF bei HaCaT keinen Effekt erzielte (Abb. 16A), induzierte der Kulturüberstand der HaCaT bei Fibroblasten die Expression und Sekretion von MMP-9 (Abb. 16B).

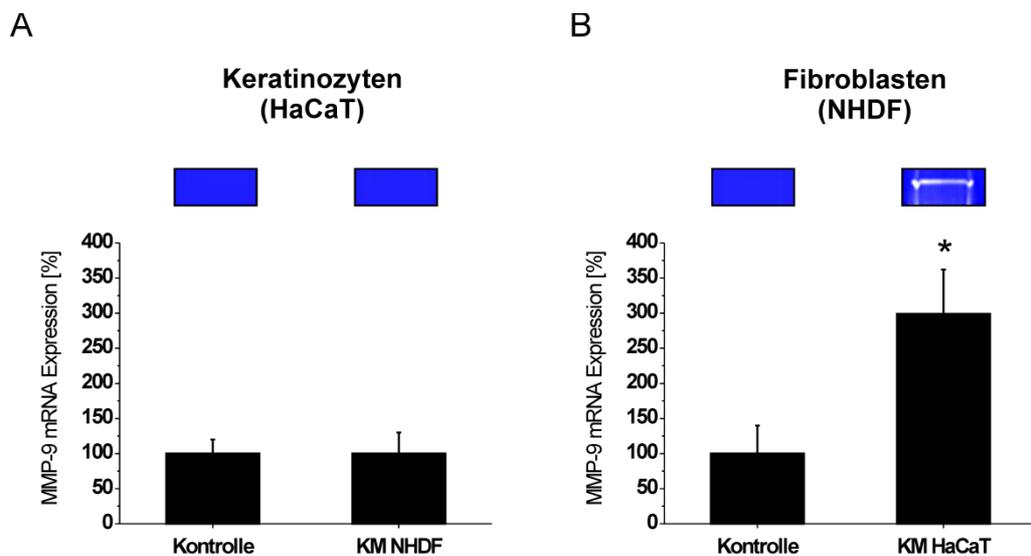


Abb. 16: Inkubation von HaCaT- und NHDF-Monokulturen mit konditioniertem Medium

Keratinozyten (HaCaT) und Fibroblasten (NHDF) wurden mit konditioniertem Medium (KM) des jeweils anderen mit S-Lost behandelten Zelltyps inkubiert. Danach erfolgte die Analyse der MMP-9-mRNA-Expression mittels qRT-PCR und der Proteinsekretion mittels Zymographie (eingefügte Ausschnitte).

* $P < 0,05$ bezieht sich auf die als 100% gesetzte Kontrolle (Medium).

Diese Resultate bestätigten den Verdacht, dass ein parakriner Mechanismus, der offenbar auf der Freisetzung stimulatorischer Faktoren aus S-Lost-behandelten Keratinozyten beruht, die Expression und Sekretion von MMP-9 in Fibroblasten stimuliert.

E.1.2.3 Einfluss sekretierter Faktoren auf das Migrations- und Invasionsverhalten

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die nach S-Lost-Behandlung aus Keratinozyten freigesetzten Faktoren durch die Stimulation der MMP-9-Freisetzung in Fibroblasten deren Wanderungsverhalten beeinflussen, verwendeten wir den sog. *Scratch-Assay*¹⁰¹. Dieser dient als *in vitro*-Modell zur Untersuchung zellulärer Wanderungseigenschaften am Wundrand und beruht auf der mechanischen Zerstörung eines konfluenten Zellrasens mit einer Pipettenspitze.

Nach Setzen eines derartigen Kratzers (*Scratch*) in einen Monolayer aus NHDF erfolgte eine Inkubation der Zellen mit KM von S-Lost-behandelten HaCaT oder mit einem frischen, unkonditionierten Kontrollmedium. Die mikroskopische Analyse nach 24 Stunden ergab, dass sich der Zellrasen wieder beinahe vollkommen geschlossen hatte, wenn die NHDF mit KM von HaCaT behandelt worden waren, wohingegen die NHDF-Zellen in frischem Medium nicht in der Lage waren, den *Scratch* neu zu besiedeln (Abb. 17A).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass HaCaT nach S-Lost-Exposition Faktoren sezernieren, die das Migrations- und/oder Proliferationspotenzial der NHDF verstärken.

In einem weiteren Assay wurden Transwell-Fluoroblok™-Platten verwendet, um die gerichtete Wanderung von NHDF durch die Poren einer Membran aus dem Insert in das darunterliegende Well zu untersuchen. Als chemotaktischer Lockstoff diente ein Konzentrationsgradient aus Humanserum. Auch in diesem Migrationsmodell zeigten NHDF eine deutlich verstärkte Migration, wenn den Zellen KM von S-Lost-behandelten HaCaT zugesetzt wurde (Abb. 17B).

Vergleichbare Resultate wurden auch in einem Invasionsassay nach Beschichtung der Membran mit humaner EZM (hEZM) erzielt (Abb. 17B). Hierbei ist die gerichtete Invasion der Zellen vom Insert ins Well davon abhängig, ob sie Proteasen wie MMP-9 freisetzen, die die hEZM-Barriere degradieren können.

Wie mittels qRT-PCR gezeigt werden konnte, führte die Inkubation von NHDF mit KM von S-Lost-behandelten HaCaT nicht nur zur vermehrten mRNA-Expression von MMP-9, sondern auch von MMP-1, die bevorzugt Kollagen Typ I degradiert (Abb. 17C). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass neben MMP-9 auch MMP-1 an dem durch S-Lost verstärkten Wanderungsverhalten von Fibroblasten beteiligt sein könnten.

Die Transkription von MMP-2 war dagegen reduziert.

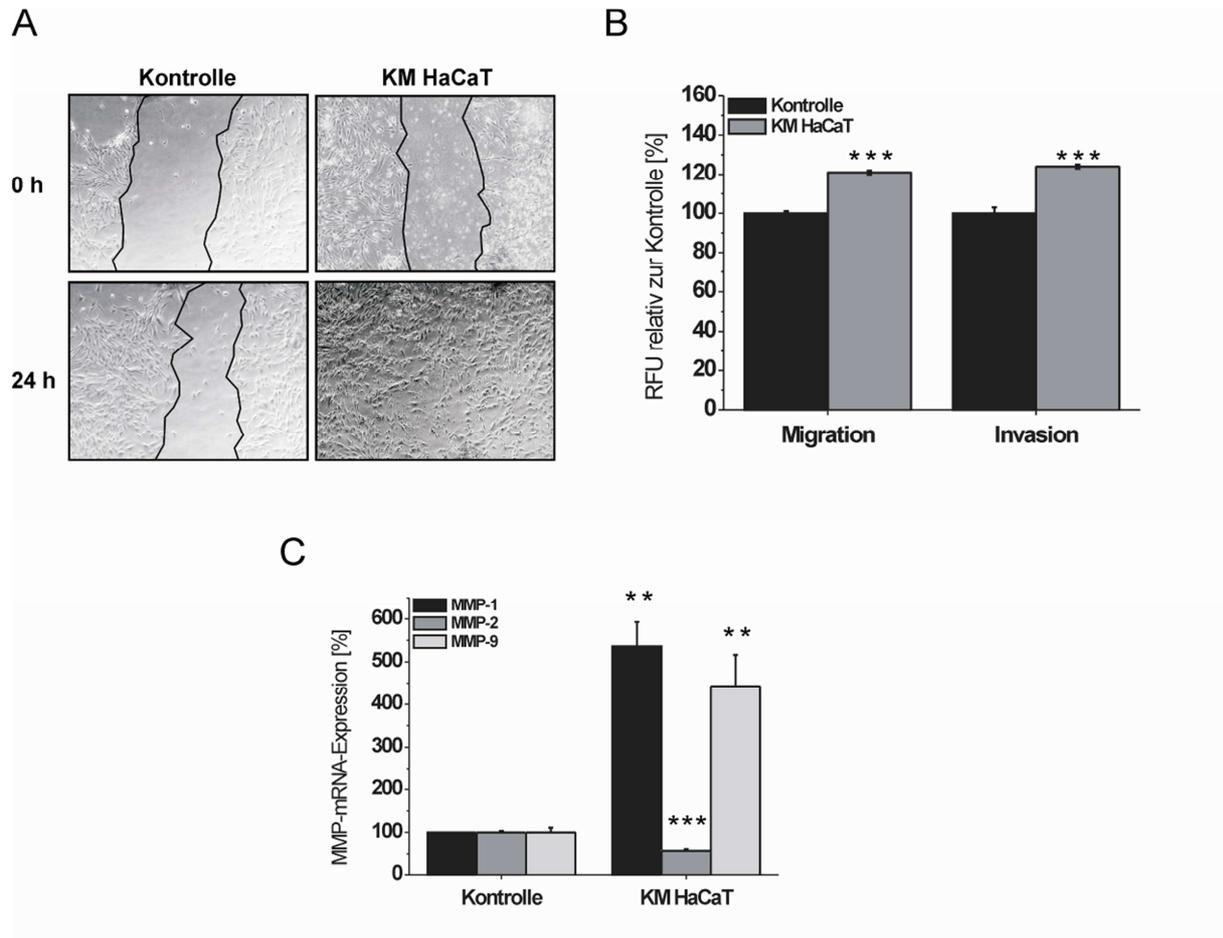


Abb. 17: Analyse des Migrations- und Invasionsvermögens von NHDF

(A) Konfluente Kulturen von primären Fibroblasten (NHDF) wurden mit einem *Scratch* verletzt (schwarze Linien), nachfolgend mit und ohne konditioniertem Medium (KM) von S-Lost-behandelten HaCaT für 24 Stunden inkubiert und mikroskopisch ausgewertet. Vergrößerung 40-fach.

(B) Mit Hilfe des Transwell-FluoroblokTM-Assays wurde die Migration (Inserts unbeschichtet) und Invasion (Insert mit hEZM beschichtet) von NHDF in Richtung eines Serumgradienten untersucht, jeweils in Gegenwart und Abwesenheit von KM von S-Lost-behandelten HaCaT.

(C) Nachweis von MMPs (mittels qRT-PCR) in NHDF, die ohne und mit KM von S-Lost-behandelten HaCaT inkubiert waren.

*** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ bezieht sich auf die als 100 % gesetzte Kontrolle (Medium).

E.1.3 Analyse in weiteren Zelltypen der Haut

Unsere Untersuchungen im Hautmodell und im Mischkultur-Modell hatten gezeigt, dass die direkte Behandlung mit S-Lost die mRNA-Expression sowie die Protein-Biosynthese und Freisetzung vornehmlich von MMP-9, nicht aber die von MMP-2 und TIMP-1, verstärkt. Es sollte nun überprüft werden, ob möglicherweise ähnliche Effekte in weiteren in der Haut befindlichen Zelltypen zu beobachten sind.

E.1.3.1 Mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1)

Die mikrovaskulären Endothelzellen HMEC-1 repräsentieren Zellen, die die Gefäßwände feiner Blutkapillaren in der Haut aufbauen. Nach Vergiftung von HMEC-1 mit S-Lost konnte eine Verstärkung der basalen MMP-9-mRNA-Expression gemessen werden (Abb.18A), die sich jedoch nicht in einer erhöhten Proteinsekretion niederschlug (Abb.18B). Außerdem verursachte S-Lost eine Abnahme der Transkription und Freisetzung von MMP-2 in den Endothelzellen.

Auch für TIMP-1 wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine verminderte Expression (Abb.18A) bzw. Freisetzung (Abb.18B) nach Exposition der HMEC-1 mit S-Lost beobachtet, was eine reduzierte Hemmung extrazellulärer MMP-Aktivität zur Folge haben könnte.

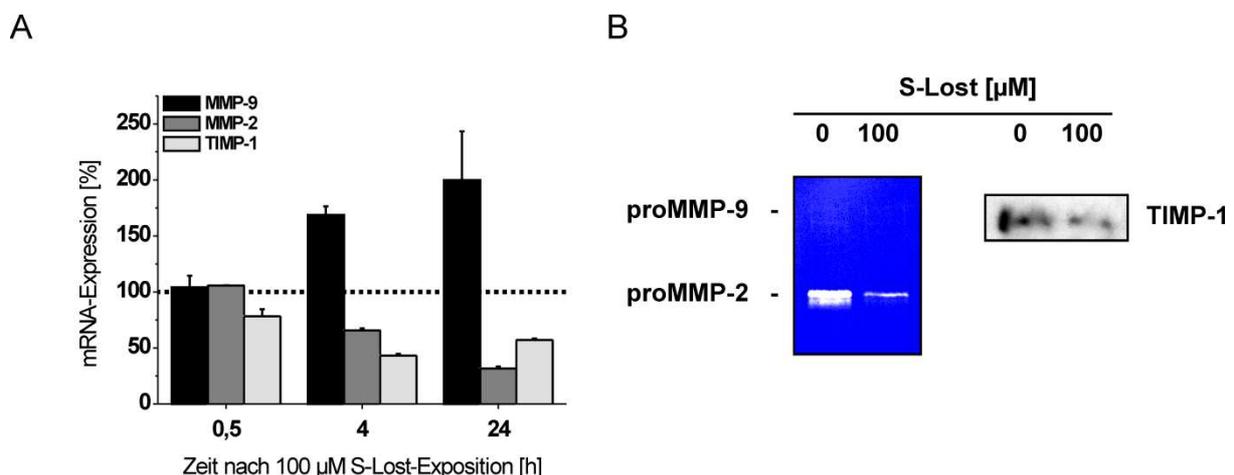


Abb.18: Einfluss von S-Lost auf die Expression und Sekretion von MMPs und TIMP-1 der HMEC-1

Endothelzellen wurden 30 Minuten mit 100 µM S-Lost oder nur mit Lösungsmittel (Kontrolle=100%) behandelt. (A) Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte dann eine Quantifizierung der mRNA-Expression von MMP-2, -9 und TIMP-1 mittels qRT-PCR.

(B) Die Kulturüberstände wurden nach 48 Stunden hinsichtlich der Sekretion von MMP-2 und -9 sowie TIMP-1 mittels Zymographie bzw. Western Blot analysiert.

E.1.3.2 Monozytäre Zellen (THP-1)

Monozyten wandern kontinuierlich aus der Blutzirkulation in das umliegende Gewebe ein, um dort in Makrophagen zu differenzieren. Als Äquivalent für monozytäre Zellen wurden THP-1-Zellen verwendet.

Diese Zellen sezernieren konstitutiv MMP-9 (Abb. 19B, 0 μ M S-Lost). Nach Behandlung mit steigender S-Lost-Konzentration nahm die Transkription (Abb. 19A) und Sekretion (Abb. 19B) von MMP-9 zu.

Die Freisetzung von TIMP-1, der nicht im Medium von unbehandelten Zellen nachzuweisen war, wurde durch S-Lost induziert (Abb. 19B).

Die basale wie auch die durch 100 μ M S-Lost stimulierte MMP-2-Transkription war offensichtlich zu niedrig, um zur Freisetzung detektierbarer Mengen des Enzyms im Zellkulturüberstand zu führen. Mit 300 μ M S-Lost war auch keine gesteigerte MMP-2-mRNA-Expression mehr nachzuweisen (Abb. 19A,B).

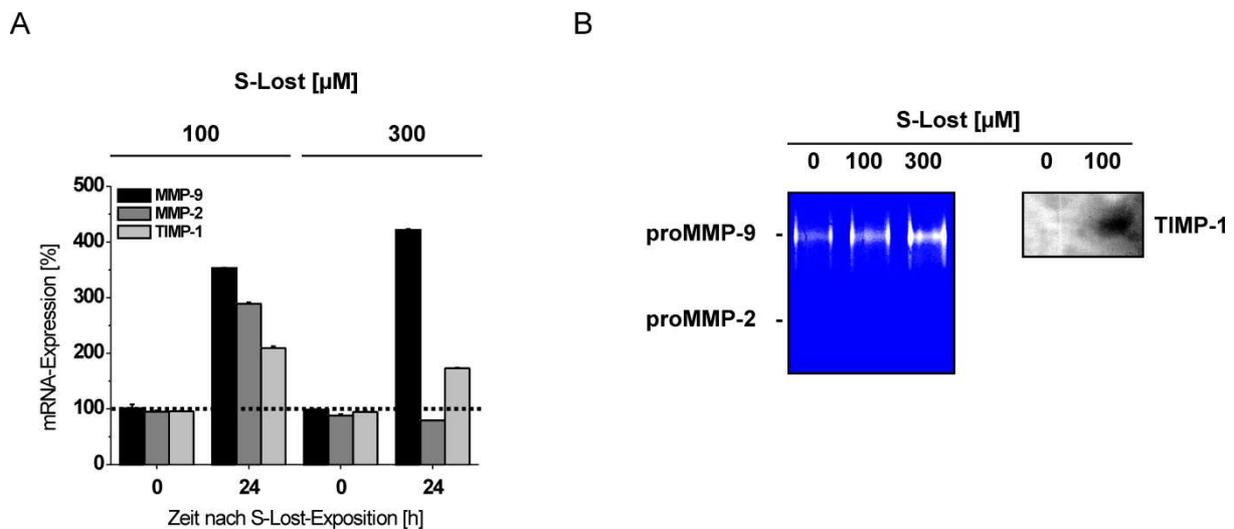


Abb. 19: Einfluss von S-Lost auf die Expression und Sekretion von MMPs und TIMP-1 der THP-1

Die monozytären THP-1-Zellen wurden 30 Minuten mit 100 bzw. 300 μ M S-Lost oder mit Lösungsmittel (Kontrolle=100 %) behandelt.

(A) Die Detektion der mRNA-Expression von MMPs und TIMP-1 erfolgte nach 24 Stunden mittels qRT-PCR.

(B) Die Kulturüberstände wurden nach 48 Stunden hinsichtlich der Sekretion von MMP-2 und -9 sowie TIMP-1 mittels Zymographie bzw. Western Blot analysiert.

E.1.3.3 Polymorphonukleäre (PMN-) Granulozyten

Polymorphonukleäre (PMN-) Granulozyten stellen die erste, schnell mobilisierbare Abwehr des Immunsystems dar. Diese Zellen speichern große Mengen an MMP-9 in den sog. tertiären Granula, die unmittelbar nach adäquater Stimulation freigesetzt werden können.

In unseren Experimenten erfolgte zunächst der Nachweis von PMN-Granulozyten in Vollblut nach Ausstrich auf einen Objektträger und Färbung der Zellen mit Diff-Quick (Abb. 20A). Die Anreicherung und Isolierung der PMN-Granulozyten aus Vollblut wurde dann unter Verwendung des Separationsmediums Polymorphprep™ vorgenommen. Die so gewonnenen Zellen wurden nun in Suspension für 30 Minuten mit S-Lost in Falconröhrchen inkubiert und anschließend in Zellkulturflaschen mit serumfreiem Medium für die weitere Kultivierung überführt.

Offenbar war allein schon durch die mechanische Behandlung der sehr empfindlichen Zellen nach der Isolation eine Ausschüttung von MMP-9 ins Medium nachzuweisen (Abb. 20B). Dabei konnten die für PMN-Granulozyten typischen MMP-9-Monomere (~ 94 kDa) und Dimere (~ 200 kDa), ebenso wie auch das mit *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) assoziierte MMP-9 (~ 125 kDa) detektiert werden. Die Freisetzung dieser MMP-9-Formen war 1 Minute nach S-Lost-Exposition der PMN-Granulozyten massiv verstärkt im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 20B).

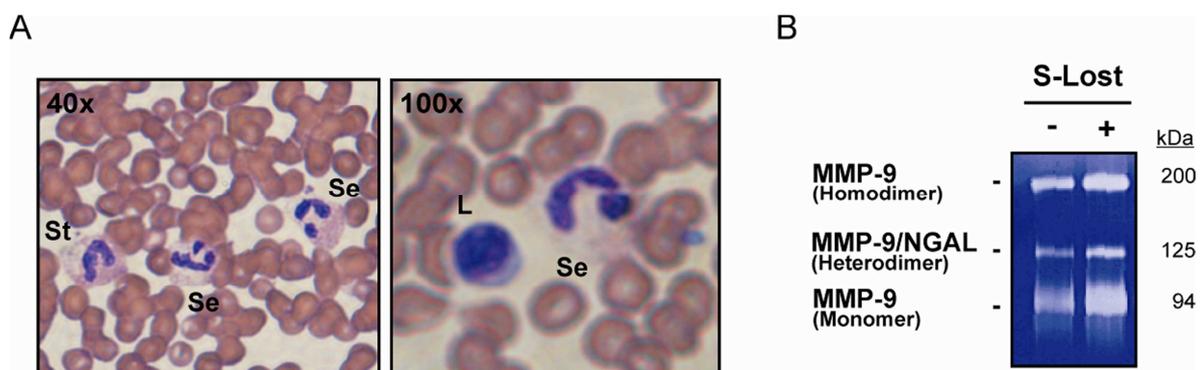


Abb. 20: Polymorphonukleäre Granulozyten und Wirkung von S-Lost auf die MMP-9-Sekretion

- (A) Mikroskopische Aufnahme von Zellen eines Vollblutausstrichs nach Färbung mit Diff-Quick.
St= Stabkernige Granulozyten; Se= Segmentkernige Granulozyten; L= Lymphozyten.
(B) Eine Minute nach Behandlung mit S-Lost (+) oder der Lösungsmittelkontrolle (-) wurde die Sekretion von MMP-9-Monomern und -Dimeren sowie der mit NGAL-assoziierten MMP-9 ins Kulturmedium mittels Zymographie bestimmt.

E.1.3.4 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Die Kapazität von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zur Differenzierung in adipogene, chondrogene und osteogene Zellen stellt ein anerkanntes Kriterium für ihre Funktionalität als adulte Stammzellen dar.

Da hMSC zur Regeneration verschiedener Gewebe beitragen und auch in der Haut zu finden sind, wurde die Wirkung von S-Lost nicht nur auf die MMP/TIMP-Expression, sondern auch auf die Differenzierungskapazität dieser Zellen untersucht.

Die Analysen zeigten, dass MMP-9 in hMSC weder konstitutiv exprimiert wird noch durch S-Lost induzierbar ist (Abb. 21A,B). Die basale mRNA-Expression (Abb. 21A) und Freisetzung (Abb. 21B) von MMP-2 aus diesen Zellen war 24 bzw. 48 Stunden nach Exposition mit S-Lost leicht abgeschwächt.

Hingegen kam es bei der Transkription von TIMP-1 schon 0,5 Stunden nach Exposition mit S-Lost zu einer massiven Stimulation, gefolgt von einer Abschwächung nach 4 und 24 Stunden (Abb. 21A). Die unmittelbare Stimulation nach S-Lost manifestierte sich nach 48 Stunden in einer Akkumulation des Proteins im Medium, wie mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte (Abb. 21B).

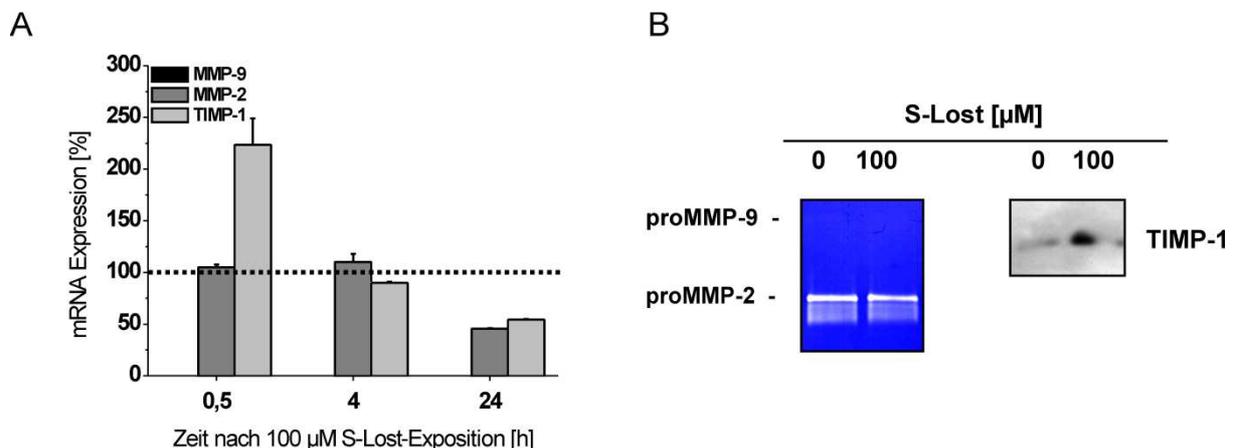


Abb. 21: Einfluss von S-Lost auf die Expression und Sekretion von MMPs und TIMP-1 der hMSC

hMSC wurden 30 Minuten mit 100 µM S-Lost oder nur mit Lösungsmittel (Kontrolle=100 %) behandelt. (A) Die Detektion der mRNA-Expression von MMP-2, -9 und TIMP-1 erfolgte mittels qRT-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten nach S-Lost-Exposition.

(B) Die Kulturüberstände wurden nach 48 Stunden hinsichtlich der Sekretion von MMP-2 und -9 sowie TIMP-1 mittels Zymographie bzw. Western Blot analysiert.

Um zu klären, ob S-Lost auch einen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der hMSC hat, wurden die Zellen 30 Minuten mit dem Wirkstoff (100 μ M) oder entsprechend mit Lösungsmittel exponiert. Im Anschluss daran erfolgte die Induktion der Differenzierung durch Inkubation der Zellen mit speziellen Kulturmedien, die bekanntermaßen eine osteogene bzw. adipogene Reifung auslösen. Nach 14 Tagen wurde die Differenzierung der Zellen lichtmikroskopisch sowie durch Färbung und mRNA-Analyse spezifischer Differenzierungsmarker untersucht.

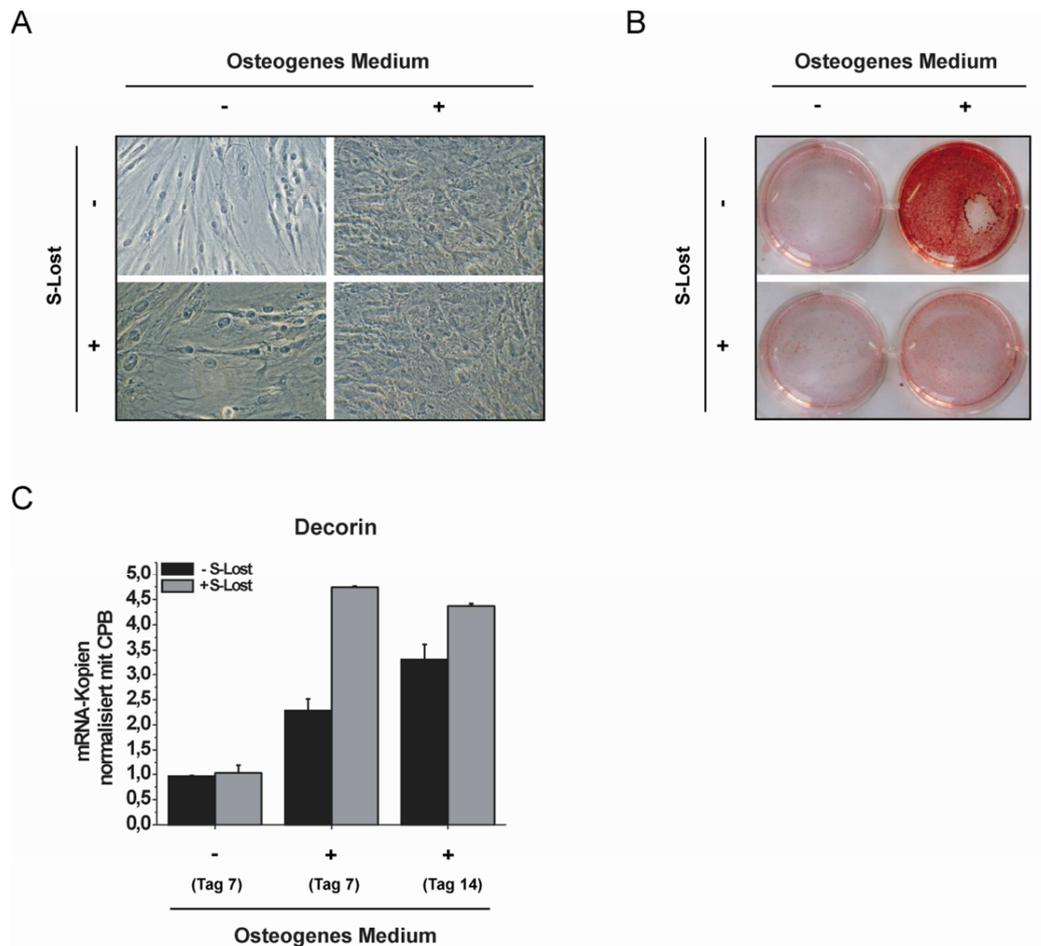


Abb. 22: Osteogenes Differenzierungsvermögen von S-Lost-behandelten hMSC

hMSC wurden mit 100 μ M S-Lost (+) oder der Lösungsmittelkontrolle (-) behandelt und anschließend in einem speziellen Medium für osteogene Differenzierung kultiviert.

(A) Die Zellmorphologie wurde nach 14 Tagen mittels mikroskopischer Aufnahmen dokumentiert.

(B) Durch die Färbung mit Alizarin-Red-S war eine Kalzifizierung osteogen differenzierter Zellen nachzuweisen.

(C) Nach 7 und 14 Tagen erfolgte eine Detektion des osteogenen Differenzierungsmarkers Decorin mittels qRT-PCR.

Die mikroskopische Analyse ergab bezüglich der typischen osteogenen Morphologie keine signifikanten Unterschiede zwischen S-Lost-behandelten und nicht-behandelten Zellen (Abb. 22A). Die Anfärbbarkeit intrazellulärer Ca^{2+} -Ablagerungen mittels Alizarin-Red-S als Merkmal osteogen differenzierter hMSC war jedoch nach Behandlung der Zellen mit S-Lost drastisch reduziert (Abb. 22B).

Diese Resultate lassen vermuten, dass S-Lost die Fähigkeit von hMSC zur Differenzierung in funktionelle Osteoblasten beeinträchtigt, da sie die Fähigkeit zur Kalzifizierung verloren haben.

Auffälligerweise war jedoch die mRNA-Expression des Differenzierungsmarkers Decorin deutlich erhöht (Abb. 22C).

Auch bei Induktion der adipogenen Differenzierung der hMSC erbrachte die mikroskopische Analyse keinen signifikanten Unterschied zwischen S-Lost-behandelten und nicht-behandelten Zellen. Zwar waren die für Adipozyten charakteristischen Fettvakuolen mit dem Farbstoff Oil-Red-O spezifisch anzufärben (Abb. 23A), jedoch ergab die Quantifizierung des Farbstoffes nach Extraktion aus den Zellen eine Abnahme um etwa 20 %, wenn die hMSC zuvor mit S-Lost behandelt worden waren (Abb. 23B).

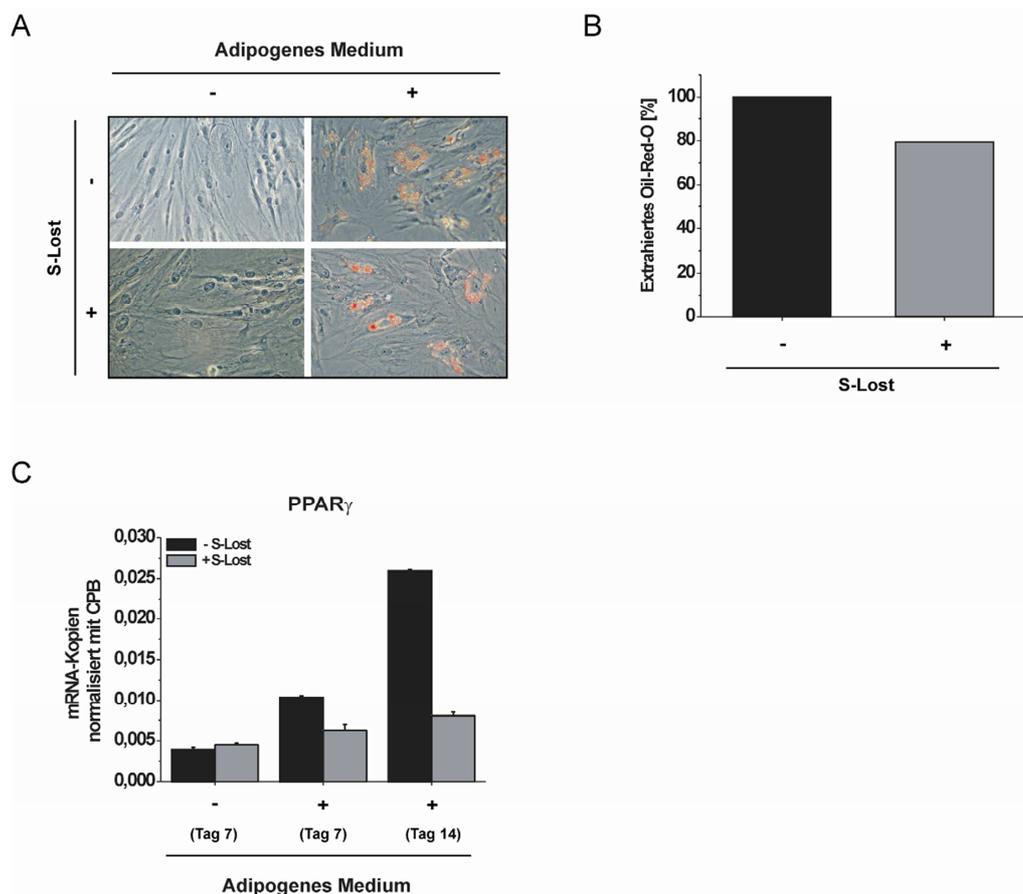


Abb. 23: Adipogenes Differenzierungsvermögen von S-Lost-behandelten hMSC

hMSC wurden 30 Minuten mit 100 μ M S-Lost (+) oder der Lösungsmittelkontrolle (-) behandelt und anschließend in speziellem Medium für adipogene Differenzierung kultiviert.

(A) Nach 14 Tagen wurde eine Oil-Red-O-Färbung zum Nachweis typischer Lipidvakuolenbildung durchgeführt.

(B) Zur Quantifizierung erfolgte eine Extraktion des Farbstoffs und Messung bei einer Wellenlänge von 405 nm. Das Ergebnis ist relativ zur nicht mit S-Lost-behandelten Kontrolle (100 %) dargestellt.

(C) Die mRNA-Expression des adipogenen Differenzierungsmarkers *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) wurde nach 7 und 14 Tagen mittels qRT-PCR bestimmt.

Die Annahme, dass S-Lost die adipogene Reifung in hMSC herabsetzt, konnte durch den Nachweis einer stark verminderten Expression des adipogenen Differenzierungsmarkers *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) bestätigt werden (Abb. 23C).

Zusammenfassend zeigen die Resultate unserer Studien an hMSC, dass S-Lost zu einer Störung der Regulation zellulärer Differenzierung führt, was unter physiologischen Bedingungen zur verminderten Regenerationsfähigkeit von S-Lost-geschädigtem Gewebe beitragen könnte.

E.2 Einfluss von S-Lost auf die zelluläre Funktionalität von Keratinozyten

Die Epidermis ist aus mehreren Lagen von Keratinozyten aufgebaut. Die basale Schicht der Epidermis beherbergt relativ undifferenzierte Keratinozyten, die als epidermale unipotente Stammzellen bezeichnet werden, da sie die Fähigkeit haben, zu proliferieren und terminal zu differenzieren. Hierbei lösen sich die Zellen von der Basalmembran ab und migrieren zur äußeren Schicht der Epidermis. Während dieser Migration durchlaufen die Zellen einen Differenzierungsprozess, der für die Homöostase der Haut sowie bei der Wundheilung eine entscheidende Rolle spielt.

Daher sollte ein Zellkulturmodell etabliert werden an dem der Einfluss von S-Lost auf den Prozess der Differenzierung und das Migrations-/Invasionsverhalten sowie die Beteiligung der MAPK-Signalwege untersucht werden sollte.

E.2.1 Etablierung eines Zellmodells zum Studium der Differenzierung

Um die nach S-Lost-Exposition beobachtete verzögerte Wundheilung, der möglicherweise ein gestörter Differenzierungsprozess von Keratinozyten zugrunde liegt, *in vitro* untersuchen zu können, ist der Einsatz adäquater Zellkulturmodelle von großer Bedeutung.

Im Rahmen unserer Untersuchungen zur Funktionalität von Keratinozyten kamen sowohl immortalisierte Keratinozyten (HaCaT) als auch kommerziell erhältliche primäre Keratinozyten (NHEK) von verschiedenen Anbietern zum Einsatz.

E.2.1.1 Differenzierungsinduktion in immortalisierten Keratinozyten (HaCaT)

Zunächst sollte überprüft werden, ob sich die einfach zu kultivierenden, immortalisierten Keratinozyten (HaCaT) als Zellkulturmodell dafür eignen, zu reiferen Zellen differenziert werden zu können. Hierzu wurden HaCaT für 4 Tage mit erhöhten Konzentrationen von Calcium (Ca^{2+}) kultiviert, eine Bedingung, die bekanntermaßen die epidermale Differenzierung induziert. Die Beurteilung der Zellreife erfolgte dann durch Bestimmung der Proliferationsrate und Quantifizierung der Expression typischer Markerproteine.

Nach Behandlung der HaCaT mit Ca^{2+} nahm die Proliferation bei der höchsten Konzentration (1,5 mM) lediglich um maximal 15 % ab (Abb. 24A), ohne dass ein signifikanter Rückgang der Biosynthese des Proliferationsmarkers PCNA zu verzeichnen war (Abb. 24B). Die Analyse des Differenzierungsmarkers Involucrin mittels Western Blot ließ mit steigender Ca^{2+} -Konzentration keine Zunahme, sondern eher eine Abnahme erkennen (Abb. 24B).

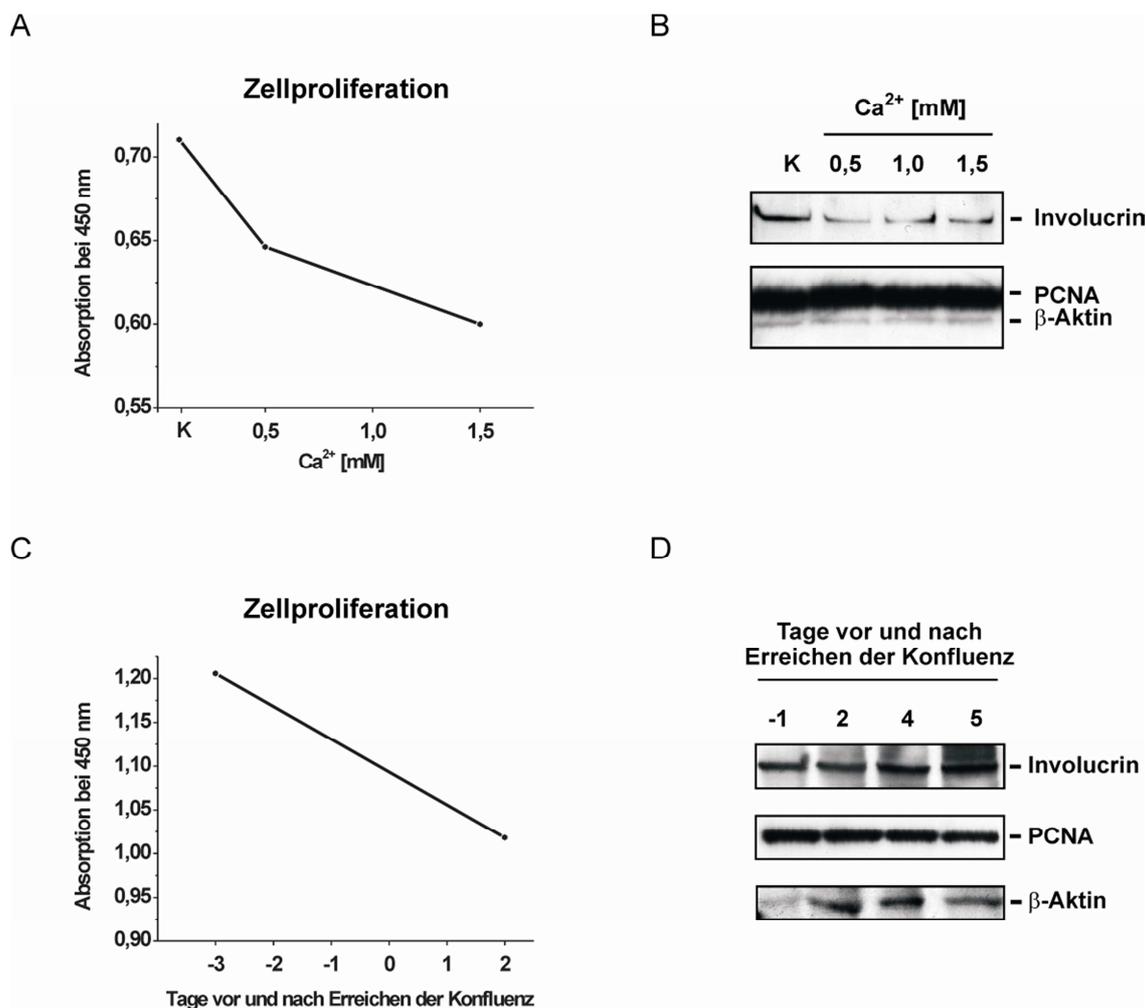


Abb. 24: Differenzierungsinduktion bei immortalisierten Keratinozyten HaCaT

HaCaT-Zellen (Kontrolle; 0,15 mM Ca²⁺) wurden unter erhöhten Konzentrationen von Ca²⁺ 4 Tage kultiviert.

(A) Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte mittels WST-1-Assay und

(B) der Biosynthese von Involucrin und PCNA mittels Western Blot.

Alternativ wurden HaCaT-Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz (Tag 0) und darüber hinaus kultiviert.

(C) Bestimmung der Proliferationsrate wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels WST-1-Assay und

(D) der Marker-Biosynthese mittels Western Blot durchgeführt.

Aufgrund dieser inkonsistenten Ergebnisse mit Ca²⁺ wurde konfluentes Zellwachstum als alternativer Induktor der Differenzierung von Keratinozyten verwendet. Hierzu wurden die Zellen so lange kultiviert, bis sie einen geschlossenen Zellrasen gebildet hatten. Vor und nach Erreichen der Konfluenz wurden die Proliferationsfähigkeit und Differenzierungsmarkerexpression bestimmt. In Übereinstimmung mit der Ca²⁺-Induktion zeigte sich unter Konfluenz eine Abnahme der Zellteilungsrate (Abb. 24C) ohne signifikante Veränderung der PCNA-Biosynthese (Abb. 24D). Hingegen konnte für die Produktion von Involucrin eine leichte Zunahme verzeichnet werden (Abb. 24D).

Diese Ergebnisse ließen auf eine bereits weitgehende Differenzierung der unbehandelten HaCaT-Zellen schließen. Nach Rückfrage beim Lieferanten stellte sich heraus, dass die Zellen unter erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen von 1,5 mM expandiert werden, so dass die so erhaltenen HaCaT für Versuche zur Differenzierungsinduktion ungeeignet waren.

Daher wurde versucht, eine Dedifferenzierung von HaCaT, d.h. eine partielle Umkehr der bereits erfolgten Zelldifferenzierung, zu erreichen. Hierfür kultivierten wir die Zellen über einen Zeitraum von 22 Tagen in drei verschiedenen Ansätzen in Ca^{2+} -freiem DMEM, dem 0,03 mM, 0,15 mM oder 1,5 mM Ca^{2+} zugesetzt wurde.

Zu verschiedenen Zeitpunkten (6, 14, 22 Tage) erfolgte die Messung der mRNA-Expression des frühen Differenzierungsmarkers Keratin-1 mittels qRT-PCR. Es zeigte sich in den beiden Ansätzen mit niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen ein starker Rückgang der Keratin-1-Transkripte über die Zeit, der nach 22 Tagen bei einer Konzentration von 0,03 mM Ca^{2+} am stärksten ausgeprägt war (Abb. 25A).

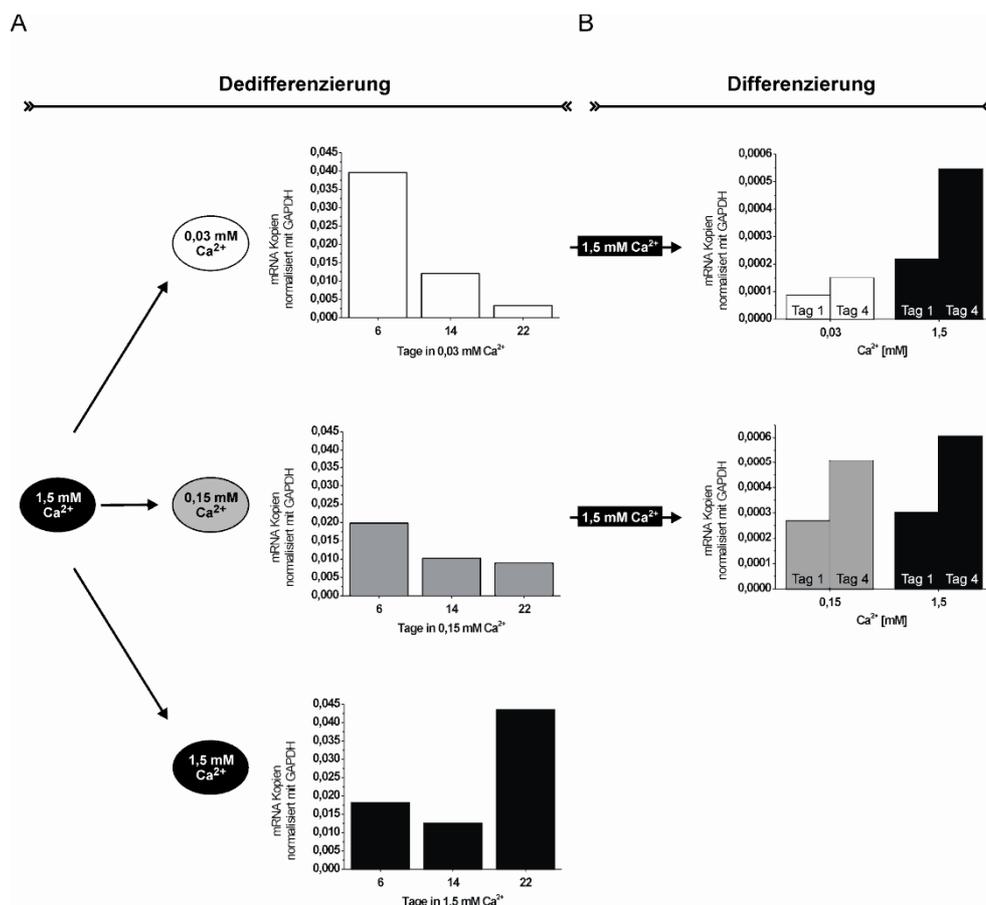


Abb. 25: (De-)Differenzierung von HaCaT-Zellen

Nach Expansion von HaCaT in 1,5 mM Ca^{2+} -haltigen Medium wurden die Zellen unter reduzierten Ca^{2+} -Konzentrationen von 0,03 mM und 0,15 mM oder 1,5 mM Ca^{2+} über einen Zeitraum von 22 Tagen kultiviert. (A) Zu mehreren Zeitpunkten wurde die mRNA-Expression des Differenzierungsmarkers Keratin-1 mittels qRT-PCR bestimmt.

(B) Nachfolgend wurden die Zellen erneut auf 1,5 mM Ca^{2+} umgestellt und die Keratin-1-mRNA-Expression nochmals mittels qRT-PCR nach 1 und 4 Tagen quantifiziert.

Im Anschluss an die 22-tägige Dedifferenzierung wurden die Zellen entweder weiter unter den entsprechend niedrigen Ca^{2+} -Bedingungen kultiviert oder erneut in 1,5 mM Ca^{2+} -haltiges Medium überführt, um zu überprüfen, ob die Zellen die Fähigkeit zur Differenzierung behalten hatten. Hierzu wurden die HaCaT mit unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen über 4 Tage kultiviert. An Tag 1 und Tag 4 wurde mRNA isoliert, um den Differenzierungsverlauf anhand der Keratin-1-Expression erneut zu bestimmen. Tatsächlich konnte bei Behandlung der dedifferenzierten HaCaT mit 1,5 mM Ca^{2+} eine deutliche Stimulation der Keratin-1-Transkription als Zeichen der Differenzierung beobachtet werden (Abb. 25B). Allerdings nahm diese auch in Abwesenheit von 1,5 mM Ca^{2+} über die Zeit zu.

Diese Experimente lassen den Schluss zu, dass durch Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration eine Dedifferenzierung von HaCaT-Zellen innerhalb von drei Wochen erreicht werden kann, ohne dass die Zellen dadurch ihre Fähigkeit zur erneuten Differenzierung verlieren. Dennoch erschien die weitere Verwendung von HaCaT-Zellen für Studien zur Reifung der Keratinozyten als zu umständlich und zu zeitaufwendig.

E.2.1.2 Differenzierungsinduktion in primären Keratinozyten (NHEK)

Ausgehend von den Erfahrungen mit HaCaT-Zellen (E.2.1.1) und Hinweisen aus der Literatur^{107;108} wurden für nachfolgende Untersuchungen unreife primäre Keratinozyten (NHEK) verwendet. Sie wurden in KGM2-Medium mit 0,1 mM Ca^{2+} bis maximal zur 3. Passage expandiert und für die Induktion der Differenzierung mit 2,0 mM Ca^{2+} behandelt.

Diese Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration führte bereits nach einem Tag zu einer signifikanten Zunahme der mRNA-Expression der beiden frühen Differenzierungsmarker Keratin-1 und Involucrin, die am 4. Tag eine 6-fache bzw. 2,5-fache Steigerung erreichte (Abb. 26A). Für den späten Marker Loricrin wurde eine deutliche Erhöhung der Transkription erwartungsgemäß erst später (Tag 4) nachweisbar. Auf Proteinebene konnte bei erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen bereits nach 24 Stunden eine vermehrte Biosynthese von Keratin-1 und Involucrin beobachtet werden (Abb. 26B).

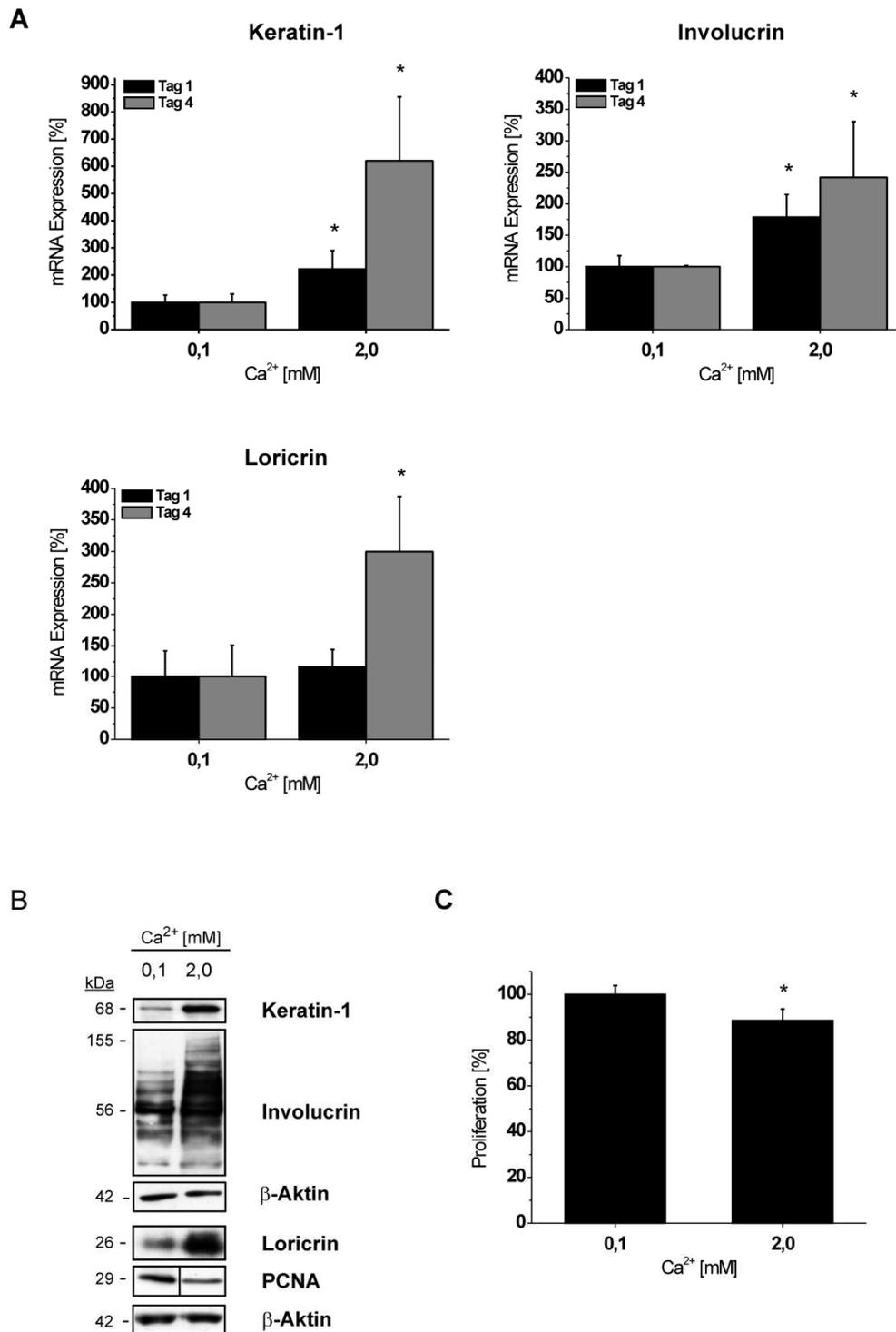


Abb. 26: Differenzierungsinduktion in NHEK durch Erhöhung der Calcium- (Ca²⁺-) Konzentration

Primäre Keratinozyten (NHEK) wurden in Gegenwart von 0,1 mM und 2,0 mM Ca²⁺ im KGM2-Medium über einen Zeitraum von 4 Tagen kultiviert.

(A) Bestimmung der mRNA-Expression der Differenzierungsmarker Keratin-1, Involucrin und Loricrin mittels qRT-PCR an Tag 1 und 4. * $P < 0,05$ bezieht sich auf den jeweiligen Ansatz mit 0,1 mM Ca²⁺.

(B) Detektion der Biosynthese von Keratin-1 (Tag 1), Involucrin (Tag 1), Loricrin (Tag 4) und PCNA (Tag 4) in Zelllysaten mittels Western Blot. Als Ladungskontrolle diente β-Aktin.

(C) Messung des Einflusses verschiedener Ca²⁺-Konzentrationen auf die Proliferation am Tag 4 mittels WST-1-Assay.

* $P < 0,05$ bezieht sich auf die als 100 % gesetzte Kontrolle (0,1 mM Ca²⁺).

Binnen 4 Tagen war auch eine verstärkte Loricrin-Biosynthese detektierbar, während die des Proliferationsmarkers PCNA abnahm. Darüber hinaus konnte 4 Tage nach Inkubation der NHEK mit 2,0 mM Ca^{2+} eine leichte, aber statistisch signifikante Abnahme der Proliferationsrate im WST-1-Assay gemessen werden (Abb. 26C).

Eine Analyse der NHEK im Phasenkontrastmikroskop ließ bei den stark proliferierenden Zellen (0,1 mM Ca^{2+}) auffällig lichtbrechende Zellbegrenzungen erkennen (Abb. 27A), die 4 Tage nach Induktion der Differenzierung (2,0 mM Ca^{2+}) deutlich reduziert waren (Abb. 27B). Diese Veränderung könnte auf den engen Zell-Zell-Kontakt bei Ausbildung eines epithelartigen Monolayers aus differenzierten Keratinozyten zurückzuführen sein.

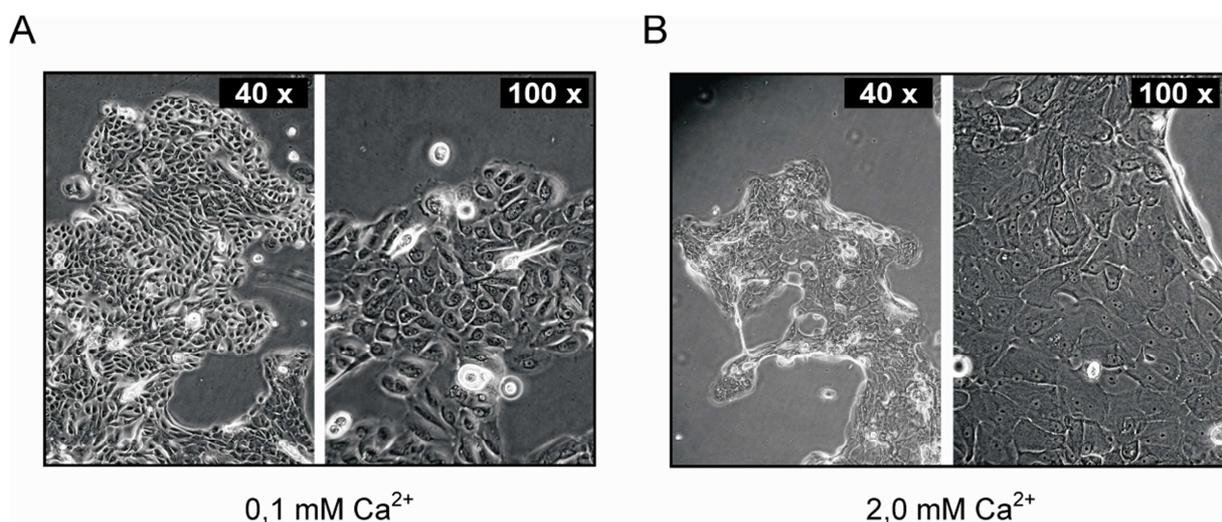


Abb. 27: Mikroskopische Darstellung primärer Keratinozyten (NHEK)

NHEK wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen in KGM2-Medium mit 0,1 mM Ca^{2+} (A) bzw. 2,0 mM Ca^{2+} (B) kultiviert und nachfolgend im Phasenkontrastmikroskop analysiert.

Die so gewonnenen Resultate führten zu der Erkenntnis, dass NHEK im Gegensatz zu HaCaT sowohl auf molekularer als auch morphologischer Ebene ein geeignetes Modell für Untersuchungen zur Differenzierung von Keratinozyten darstellen.

E.2.2 Einfluss von S-Lost auf NHEK

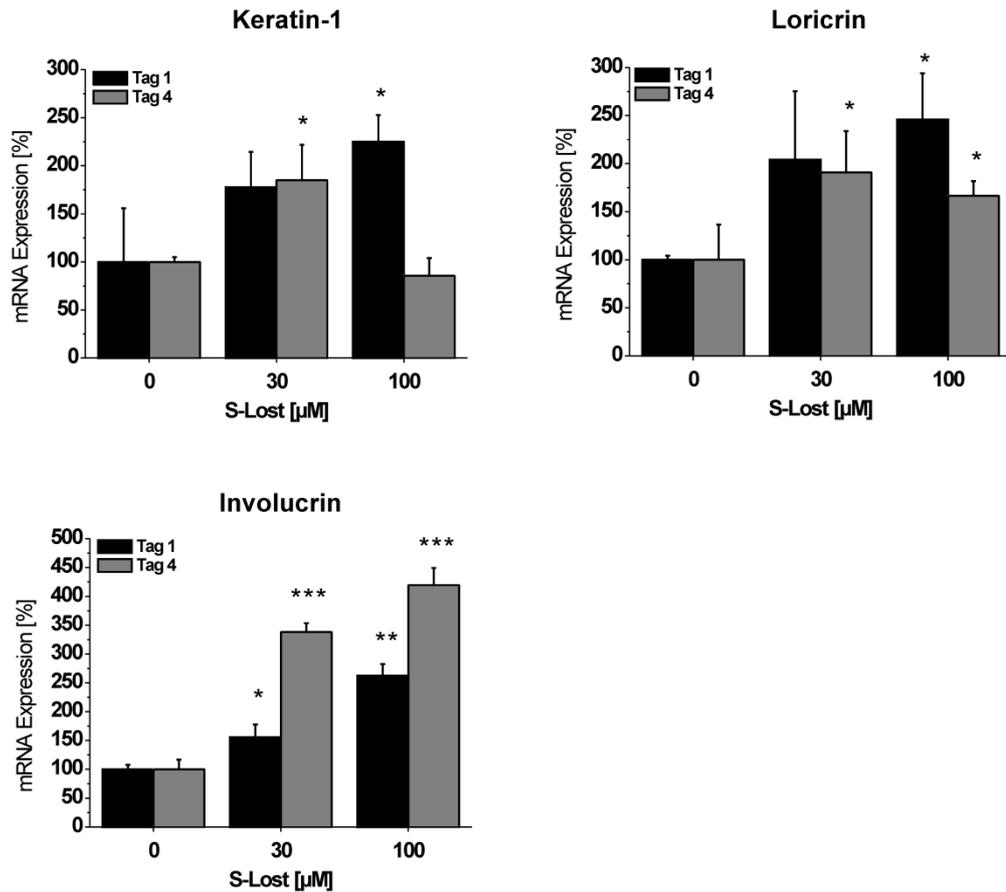
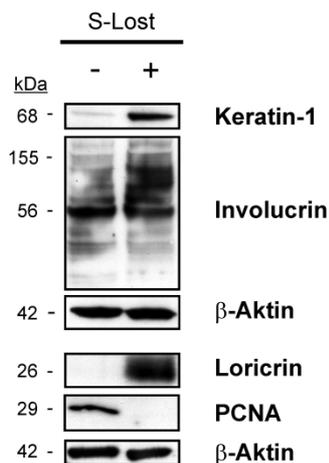
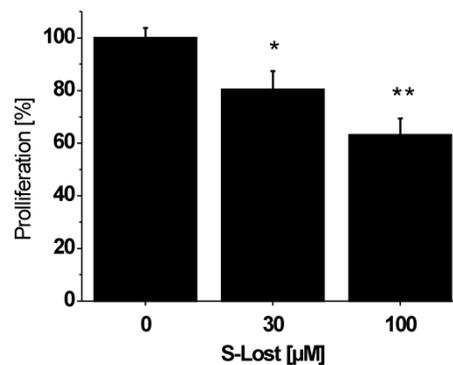
Nach ausführlichen Vergleichsstudien zur reproduzierbaren Kultivierung primärer Keratinozyten (NHEK) von verschiedenen Anbietern wurden die Zellen der Firma Promocell[®] für die nachfolgenden Experimente verwendet, da diese Zellen die am besten reproduzierbaren Ergebnisse bei gutem Wachstum lieferten.

E.2.2.1 Differenzierung

Zur Analyse des Einflusses von S-Lost auf die basale Expression von Differenzierungsmarkern wurden NHEK mit 30 μM und 100 μM des Wirkstoffes exponiert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression zeigte am Tag 1 einen von der S-Lost-Konzentration abhängigen Anstieg der Transkription von Keratin-1, Loricrin und Involucrin. Am Tag 4 war der Transkriptionsanstieg bei Involucrin noch stärker ausgeprägt, während er bei Keratin-1 und Loricrin hingegen wieder eher abnahm (Abb. 28A). Diese Resultate konnten mittels Western Blot auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 28B).

Zudem zeigte sich, dass die Biosynthese des Proliferationsmarkers PCNA nach S-Lost-Behandlung vollständig blockiert war (Abb. 28B). Dies bestätigte sich auch in einem signifikanten, konzentrationsabhängigen Rückgang der Proliferationsrate nach Exposition der NHEK mit S-Lost (Abb. 28C).

Diese Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass es in unreifen Keratinozyten nach Einwirkung von S-Lost zur Auslösung des Differenzierungsprozesses kommt.

A**B****C****Abb. 28: Analyse der Differenzierung und Proliferation von NHEK nach Exposition mit S-Lost**

NHEK wurden für 30 Minuten mit Lösungsmittelkontrolle (0 μM S-Lost) bzw. 30 μM oder 100 μM S-Lost exponiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in frischem Medium kultiviert.

(A) Die mRNA-Expression der Differenzierungsmarker Keratin-1, Involucrin und Loricrin wurde mittels qRT-PCR an Tag 1 und 4 nach S-Lost-Exposition gemessen.

(B) Mittels Western Blot wurden die Zelllysate nach S-Lost-Exposition (+) oder Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle (-) auf die Biosynthese von Keratin-1 und Involucrin nach Tag 1 sowie auf Loricrin und PCNA an Tag 4 detektiert. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin.

(C) Der Einfluss von S-Lost auf die Proliferation wurde mit dem WST-1-Assay analysiert.

*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ bezogen auf die auf Lösungsmittelkontrolle (100 %).

E.2.2.2 Invasionsverhalten

Um die Frage zu klären, ob eine S-Lost-Exposition das Invasionsverhalten von NHEK beeinflusst, wurde das Transwell[®]-System verwendet. Dabei wurde die Fähigkeit der Zellen untersucht, eine rekonstituierte Basalmembran aus humaner extrazellulärer Matrix (hEZM) in Richtung eines Konzentrationsgradienten aus Humanserum zu durchwandern. Nach 48 Stunden wurden die in das untere Kompartiment gewanderten Zellen gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

Diese Untersuchungen zeigten deutlich, dass das basale Invasionsvermögen der Zellen nach Behandlung mit 30 μM S-Lost um etwa 20 % und mit 100 μM S-Lost um 80 % herabgesetzt war (Abb. 29).

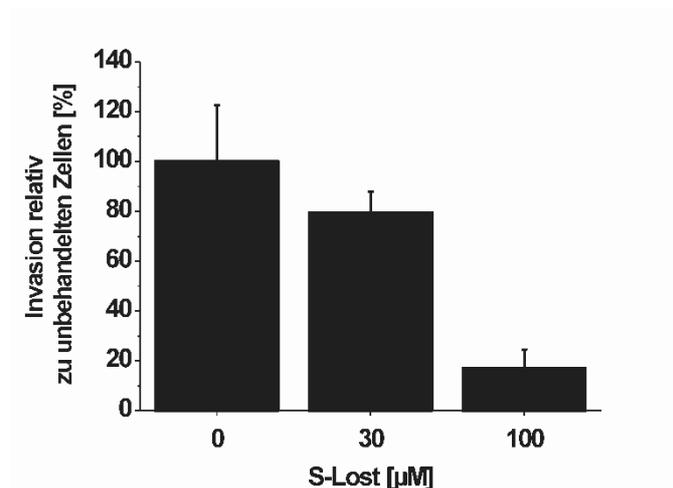


Abb. 29: Invasionsvermögen von NHEK nach S-Lost-Behandlung

NHEK wurden nach Behandlung mit 30 bzw. 100 μM S-Lost sowie unbehandelt (0 μM) in einem Transwell-Invasionsassay eingesetzt. Die Anzahl der durch eine rekonstituierte Basalmembran aus humaner extrazellulärer Matrix (hEZM) gewanderten Zellen wurde nach 48 Stunden im Lichtmikroskop bestimmt.

Somit könnte S-Lost auch unter physiologischen Bedingungen das Vermögen unreifer Keratinozyten zur gerichteten Migration beeinträchtigen und so die Regenerationsfähigkeit von S-Lost-exponiertem Gewebe herabsetzen.

E.2.2.3 MAPK-Aktivität

MAPK-Signalwege spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation vieler an Wachstum und Differenzierung beteiligter Prozesse. Um eine mögliche Beeinflussung von MAPK-Signalwegen in NHEK nach deren Exposition mit S-Lost zu untersuchen, wurden die Zelllysate mittels Western Blot auf den Phosphorylierungsstatus der beiden MAPK p38 und ERK1/2 sowie des p38-Zielproteins Hsp27 hin analysiert. Dabei wurden einerseits spezifische Antikörper (p-) verwendet, die nur die phosphorylierte, aktive Form der Kinasen erkennen. Andererseits fanden auch solche Antikörper Verwendung, die sowohl die phosphorylierte als auch unphosphorylierte Form (t-) des jeweiligen Proteins im Western Blot detektieren.

Bereits 10 Minuten nach Exposition waren Phosphorylierung (p-) und Gesamtbiosynthese (t-) von p38 in NHEK erhöht, was nach 30 Minuten und insbesondere bis Tag 4 noch deutlicher erkennbar war (Abb. 30A). Dieser Effekt war von einem gesteigerten Phosphorylierungsstatus von Hsp27 über den gesamten Zeitraum begleitet (Abb. 30A).

Bei ERK1/2 war 10 Minuten nach S-Lost-Behandlung die Phosphorylierung schon massiv erhöht, jedoch nach 30 Minuten wieder reduziert (Abb. 30B). Dieser dephosphorylierte Status blieb bis zum vierten Tag stabil (Abb. 30B). Die Biosyntheserate des Gesamtproteins von ERK1/2 hingegen änderte sich nicht nach Einwirkung von S-Lost auf die Zellen.

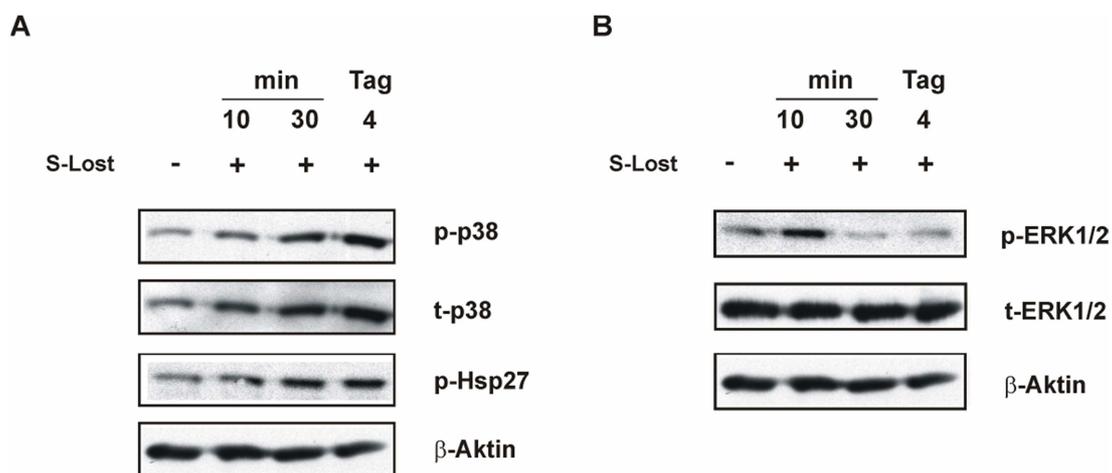


Abb. 30: Phosphorylierungsstatus der MAPK p38 und ERK1/2

NHEK wurden 30 Minuten mit 100 μ M S-Lost (+) behandelt und anschließend in frischem Medium kultiviert. 10 Minuten, 30 Minuten und 4 Tage nach S-Lost-Exposition wurden mittels Western Blot die phosphorylierte Form (p-) sowie die gesamte Proteinmenge (t-) bestimmt.

(A) p38 und Hsp27 als p38-Target

(B) ERK1/2

Als Ladungskontrolle diente β -Aktin.

Für beide Kinasen konnte entsprechend ihrer Phosphorylierung auch eine Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden (in Kooperation mit dem Institut der Bundeswehr; Daten hier nicht gezeigt).

Diese Resultate dokumentieren somit eine Aktivierung der MAPK p38 über einen längeren Zeitpunkt und der ERK1/2 nur unmittelbar nach Inkubation von NHEK mit S-Lost.

E.2.3 Inhibition der MAPK-Signalwege p38 und ERK1/2

Nachdem gezeigt war, dass S-Lost in NHEK zur Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2 führt, sollte unter Verwendung spezifischer Inhibitoren dieser Kinasen eine mögliche Beteiligung beider MAPK-Signalwege an den S-Lost-vermittelten Einflüssen auf Differenzierung, Proliferation und Invasion in diesen Zellen analysiert werden. Darüber hinaus war vorgesehen, entsprechende Ergebnisse im Hautmodell zu bestätigen.

E.2.3.1 Zytotoxizität der verwendeten MAPK-Inhibitoren

Vor Beginn der Inhibitionsstudien sollte die Wirkung der Inhibitoren auf die Vitalität der NHEK mit Hilfe eines Zytotoxizitätstestes (XTT-Assay) überprüft werden.

Der Inhibitor SB203580, der spezifisch die Aktivität von p38 durch Besetzung der Substrat-Bindestelle für ATP hemmt, verursachte in NHEK bei Konzentrationen über 20 μM eine stetige Abnahme der zellulären Vitalität (Abb. 31A). Daher wurde für weitere Experimente mit dem Inhibitor SB203580 eine Höchstkonzentration von 20 μM festgelegt.

Der für MEK1/2 spezifische Inhibitor PD98059 bindet an die inaktive Kinase, wodurch deren Aktivierung durch voraus geschaltete Kinasen verhindert wird. Dies hat zur Folge, dass ERK1/2 nicht mehr durch MEK1/2 phosphoryliert werden kann. Die Vitalitätsuntersuchungen ergaben eine für NHEK maximal verträgliche Konzentration des MEK1/2-Inhibitors PD98059 von 30 μM (Abb. 31B), die für die Studien in NHEK eingesetzt wurde.

Zudem kam ein JNK-Inhibitor (JNK inhibitor II, Calbiochem) zum Einsatz, der jedoch in unseren Zellen bei allen getesteten Konzentrationen eine hohe Zytotoxizität aufwies (Daten hier nicht gezeigt), so dass von einem weiteren Einsatz Abstand genommen wurde.

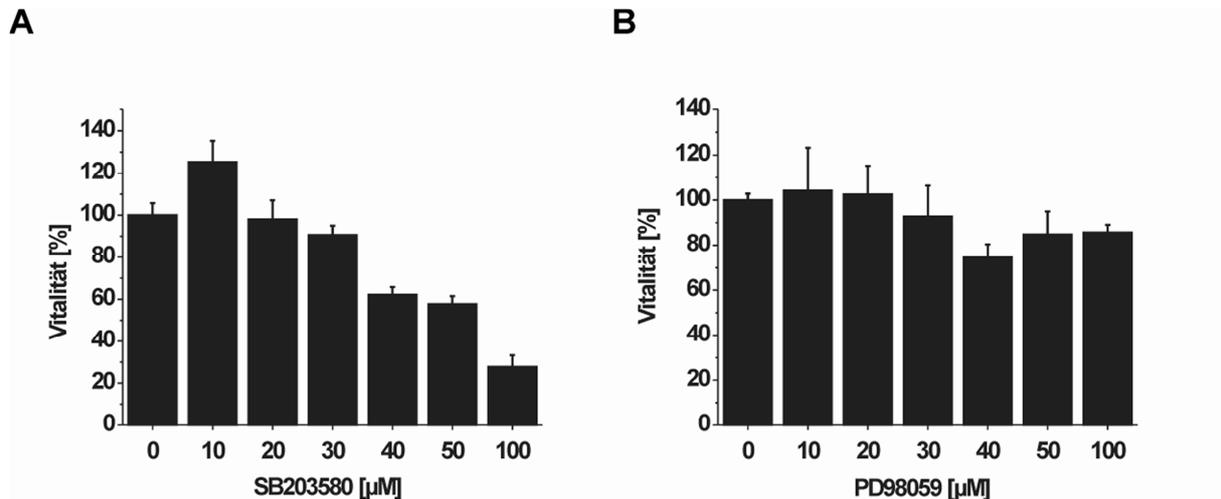


Abb. 31: Bestimmung der Zytotoxizität der MAPK-Inhibitoren

NHEK wurden mit verschiedenen Konzentrationen der MAPK-Inhibitoren über 4 Tage behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Vitalität der Zellen mittels des XTT-Assays.

(A) p38-Inhibitor SB203580

(B) MEK1/2-Inhibitor PD98059

E.2.3.2 Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die basale Expression von Differenzierungsmarkern in unreifen NHEK

Zunächst sollte die Wirkung der MAPK-Inhibitoren in unreifen (nicht-differenzierungs-induzierten) NHEK untersucht werden.

Nach Inkubation der Zellen mit dem MEK1/2-Inhibitor PD98059 nahm die mRNA-Expression von Keratin-1 um das 3-Fache und von Loricrin um das 13-Fache zu.

Hingegen führte eine Hemmung von p38 mittels SB203580 zu einem leichten Rückgang der mRNA-Expression beider Differenzierungsmarker (Abb. 32A).

Die Western Blot-Analyse der Proteinbiosynthese bestätigte diese Ergebnisse (Abb. 32B).

Des Weiteren zeigten Messungen der Zellproliferationsraten einen Rückgang nach der Blockierung des ERK1/2-Signalweges, während die Inhibition von p38 zu keiner signifikanten Veränderung führte (Abb. 32C).

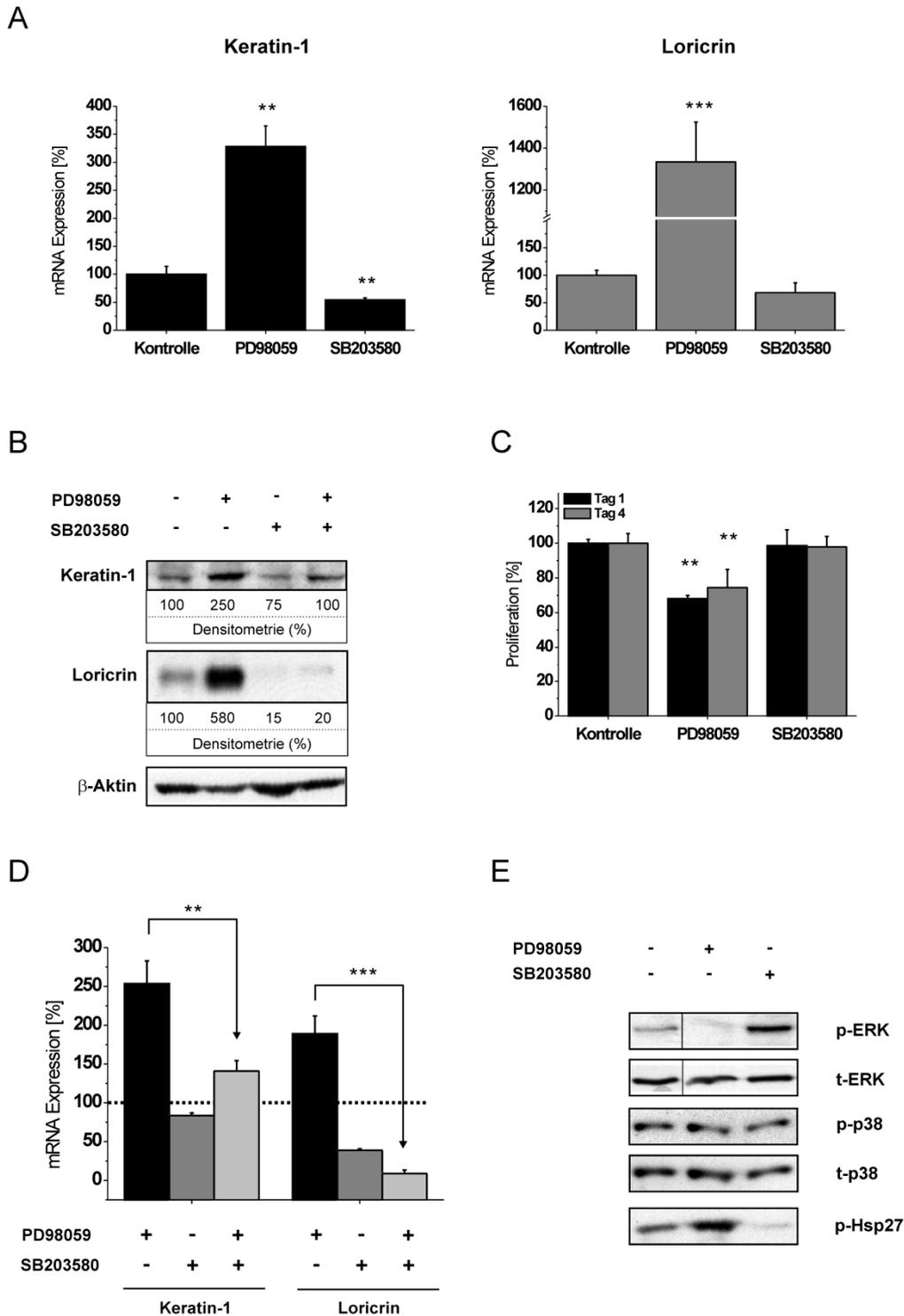


Abb. 32: Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die basale Expression von Differenzierungsmarkern

NHEK wurden mit Inhibitoren der Aktivität von MEK1/2 (PD98059; 30 μ M) und p38 (SB203580; 20 μ M) behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der Differenzierungsmarker Keratin-1 (Tag 1) und Loricrin (Tag 4) auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR (A) und Proteinebene mittels Western Blot (B). Die Bestimmung der Proliferationsrate wurde an Tag 1 und 4 mittels WST-1-Assay durchgeführt (C).

In einem weiteren Ansatz wurden beide Inhibitoren gleichzeitig eingesetzt und die mRNA-Expression (D) und Biosynthese (B) der Differenzierungsmarker bestimmt. Pfeile zeigen die Antagonisierung der durch Hemmung von MEK1/2 stimulierten Expression der Differenzierungsmarker in Gegenwart des p38-Inhibitors (D).

Die Wirkung der MAPK-Inhibitoren auf den Phosphorylierungsstatus und die Aktivität der jeweils anderen Kinase wurde mittels Western Blot bestimmt (E).

*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrolle (100 %).

Aufgrund der so nachgewiesenen, offenbar gegensätzlichen Rolle von ERK1/2 und p38 für die Differenzierung in NHEK wurde zusätzlich eine Doppelinkubation mit beiden Inhibitoren durchgeführt, um Rückschlüsse auf eine mögliche gegenseitige Beeinflussung beider Signalwege ziehen zu können.

Hierbei zeigte sich, dass die nach Einzelinkubation mit dem MEK1/2-Inhibitor verursachte Stimulation der Keratin-1-Expression bei gleichzeitiger Hemmung der p38-Aktivität abgeschwächt und bei Loricrin gänzlich aufgehoben wurde (Abb. 32B,D).

Die Analyse der Wirkung beider MAPK-Inhibitoren auf den Phosphorylierungsstatus von p38 und ERK1/2 ergab, dass eine Blockierung der MEK1/2-Aktivität mittels PD98059 wie erwartet eine ERK1/2-Phosphorylierung verhindert ohne die von p38 zu beeinflussen (Abb. 32E). Dass der p38-Inhibitor SB203580 nicht die Phosphorylierung der MAPK verhindert, sondern die Aktivität von p38, konnte am Verschwinden von Hsp27, einem Substrat von p38, verifiziert werden.

Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Inhibierung der beiden Signalwege jeweils zur Verstärkung des anderen Weges führte. So kam es unter SB203580-Behandlung zum vermehrten Auftreten der p-ERK1/2-Form und bei Zugabe von PD98059 zur Zunahme des phosphorylierten p38-Zielproteins Hsp27 (Abb. 32E).

Die Resultate dieser Untersuchungen machten also erstmals deutlich, dass die Aktivitäten von p38 und ERK1/2 in gegensätzlicher Weise die basale Expression von Differenzierungsmarkern in unreifen Keratinozyten regulieren, wobei p38 die Wirkung von ERK1/2 dominiert und beide Signalwege über einen negativen Crosstalk interagieren.

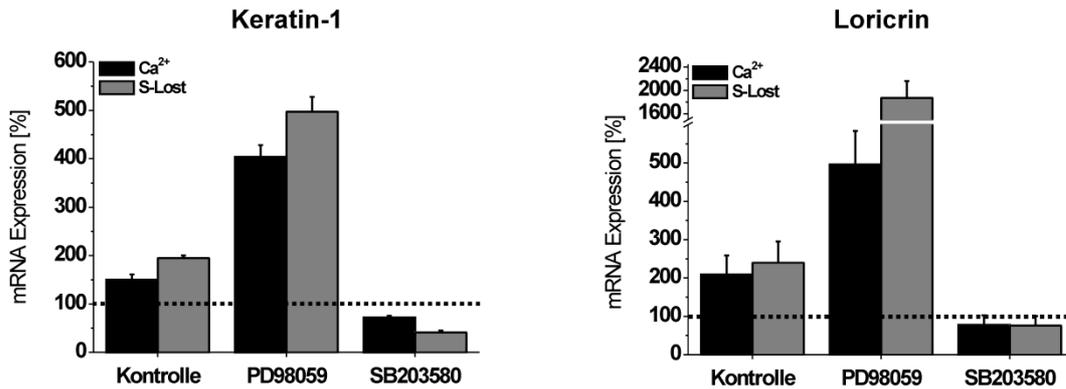
E.2.3.3 Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf den Differenzierungsprozess von NHEK

Um zu analysieren, ob die Signalwege von ERK1/2 und p38 auch in dem durch Ca^{2+} oder S-Lost induzierten Differenzierungsprozess von Keratinozyten beteiligt sind, wurden NHEK mit Ca^{2+} oder S-Lost behandelt und zugleich mit den beiden Inhibitoren PD98059 und SB203580 inkubiert.

Die durch Ca^{2+} bzw. S-Lost stimulierte mRNA-Expression der Differenzierungsmarker Keratin-1 und Loricrin wurde durch eine Hemmung der Aktivität von ERK1/2 bedeutend verstärkt. Die Inhibition von p38 hingegen reduzierte die durch Ca^{2+} oder S-Lost induzierte Expression der Differenzierungsmarker auf ein Level vergleichbar mit dem unbehandelten, unreifen NHEKs (Abb. 33A).

Die Analyse der Proteinbiosynthese mittels Western Blot bestätigte, dass eine Inhibition des ERK1/2-Signalweges in Ca^{2+} - bzw. S-Lost-behandelten NHEK die Synthese der Differenzierungsmarker verstärkte, während eine Hemmung von p38 diese fast vollständig unterband (Abb. 33B).

A



B

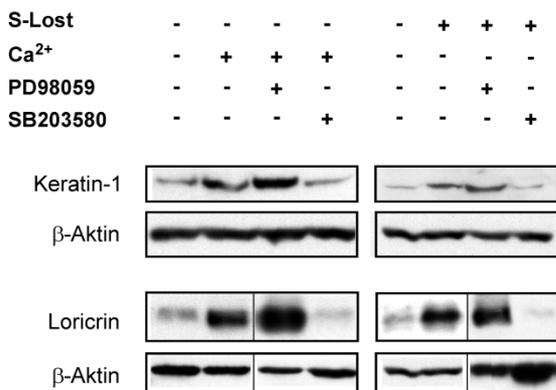


Abb. 33: Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf Expression und Synthese von Differenzierungsmarkern

NHEK wurden zunächst für eine Stunde mit oder ohne die MAPK-Inhibitoren PD98059 (30 μM) und SB203580 (20 μM) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Ca^{2+} (2,0 mM) oder S-Lost (100 μM) oder die Zellen blieben unbehandelt (100 %). Daran schloss sich eine weitere Kultivierung in Gegenwart der MAPK-Inhibitoren PD98059 (30 μM) oder SB203580 (20 μM) an, worauf die Analyse der Differenzierungsmarker Keratin-1 (Tag 1) und Loricrin (Tag 4) erfolgte.

(A) mRNA-Expression (qRT-PCR)

(B) Proteinbiosynthese (Western Blot). Als Ladungskontrolle diente β -Aktin.

E.2.3.4 Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die Invasionskapazität von NHEK

Da vorausgegangene Versuche gezeigt hatten, dass die Invasionskapazität der Keratinozyten nach Exposition mit S-Lost herabgesetzt wird (Abb. 29), sollte nun überprüft werden, ob auch an diesen Veränderungen MAPK-Signalwege beteiligt sind. Hierfür wurden NHEK mit Ca^{2+} oder S-Lost inkubiert und parallel im Transwell[®]-Invasionsassay analysiert.

In auffälliger Weise konnte die durch Behandlung der Zellen mit Ca^{2+} oder S-Lost verursachte deutliche Hemmung der Invasionsrate durch Applikation des p38-Inhibitors SB203580 neutralisiert bzw. in eine erhöhte Invasionsfähigkeit umgekehrt werden (Abb. 34A). Im Gegensatz dazu führte eine Inkubation mit dem MEK1/2-Inhibitor bei den S-Lost-vergifteten Zellen zu einer weiteren Reduktion der Invasionsrate (ohne Abbildung).

Da nach Einwirkung von Ca^{2+} bzw. S-Lost und p38-Inhibitor möglicherweise MMPs zu den Veränderungen im Invasionsverhalten der Keratinozyten führten, wurde beispielhaft nach entsprechender Behandlung der Zellen mit S-Lost die Transkription von MMP-1, MMP-2 und MMP-9 mittels qRT-PCR untersucht.

Bei MMP-1 zeigte sich eine starke Abnahme der mRNA-Expression nach S-Lost-Behandlung, die durch die Gabe des p38-Inhibitors (SB203580) nicht nur wiederhergestellt, sondern sogar deutlich gesteigert wurde (Abb. 34B). Hingegen konnten für MMP-2 und MMP-9 keine vergleichbaren Effekte beobachtet werden.

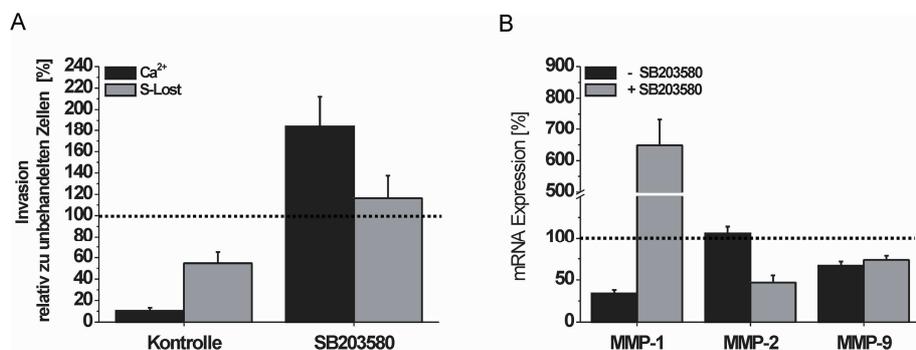


Abb. 34: Einfluss der Hemmung von p38 auf die Invasionskapazität und MMP-mRNA-Expression

NHEK wurden mit 2,0 mM Ca^{2+} oder 100 μM S-Lost behandelt und ohne oder mit gleichzeitiger Gabe des p38-Inhibitors SB203580 in einem Transwell[®]-Invasionsassay auf ihre Invasionskapazität hin untersucht. Unbehandelte Zellen wurden als 100 % gesetzt.

(A) Die Anzahl der durch eine rekonstituierte Basalmembran aus hEZM gewanderten Zellen wurde nach 48 Stunden bestimmt

(B) Ausgewählte MMPs wurden an Tag 1 nach S-Lost-Exposition ohne und mit Inkubation mit dem p38-Inhibitor SB203580 mittels qRT-PCR bestimmt. Nicht-vergiftete Zellen wurden als 100 % gesetzt.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die durch S-Lost induzierte, möglicherweise über MMPs medierte reduzierte Invasionsfähigkeit unreifer Keratinozyten durch Applikation eines p38-Inhibitors antagonisiert werden könnte.

E.2.3.5 Wirkung des p38-Inhibitors SB203580 im Hautmodell

Im nächsten Schritt sollten nun noch die zuvor an Monokulturen gewonnen Erkenntnisse über die Rolle von p38 bei der Differenzierung von Keratinozyten im *in vitro*-3D-Vollhautmodell untersucht werden (Abb. 35A).

Die Oberfläche des Hautmodells wurde für 30 Minuten mit einer S-Lost-Konzentration von 100 μ M S-Lost behandelt und nachfolgend für einen Tag in Gegenwart und Abwesenheit des p38-Inhibitors SB203580 inkubiert.

Eine Analyse der Differenzierungsmarker nach mRNA-Extraktion zeigte eine Verstärkung der Transkription von Loricrin durch S-Lost, die jedoch durch Zugabe des p38-Inhibitors fast vollständig blockiert werden konnte (Abb. 35B). Für die Marker Keratin-1 und Involucrin war ebenfalls eine Verminderung der mRNA-Expression nach Einsatz des Inhibitors nachzuweisen, allerdings waren diese Faktoren im Hautmodell einen Tag nach S-Lost-Exposition nicht verstärkt exprimiert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 35B).

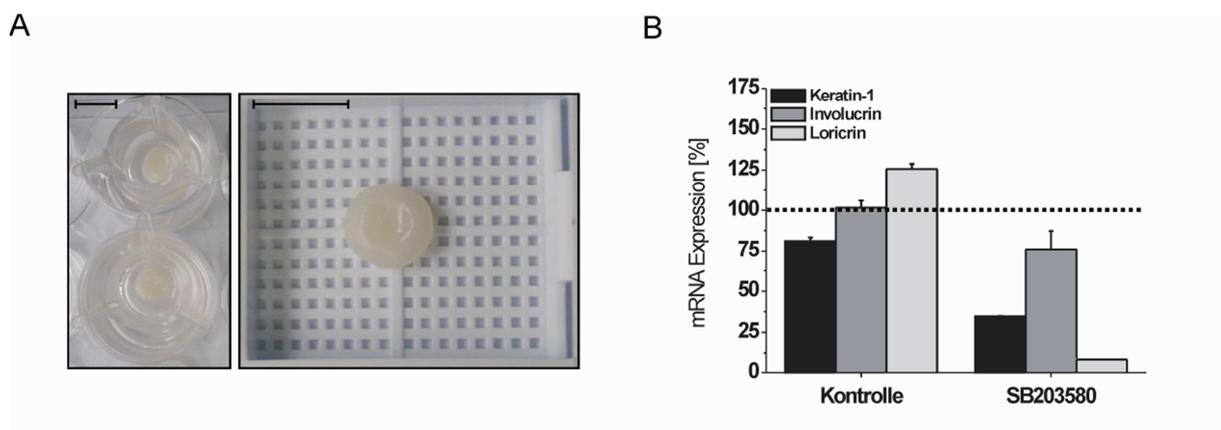


Abb. 35: Wirkung des p38-Inhibitors SB203580 im Hautmodell

- (A) Makroskopische Aufnahme des Hautmodells (Fa. Agenolab), das aufgebaut ist aus einer mehrschichtigen „Epidermis“ aus Keratinozyten mit darunterliegender „Dermis“ bestehend aus Fibroblasten und einer dazwischenliegenden Basalmembran. Balken = 1cm.
- (B) Die Oberfläche des Hautmodells wurde entweder nur mit 100 μ M S-Lost (Kontrolle) exponiert oder zusätzlich mit dem Inhibitor SB203580 (30 μ M) für 24 Stunden inkubiert. Die Veränderungen in der mRNA-Expression (qRT-PCR) der Differenzierungsmarker wurden mit unbehandelten NHEK (100 %) verglichen.

Übereinstimmend mit den Resultaten aus Monokulturen zeigten somit auch die Experimente im Vollhautmodell, dass einer möglicherweise durch S-Lost induzierten erhöhten Expression von Differenzierungsmarkern durch Applikation eines p38-Inhibitors entgegengewirkt werden kann.

F DISKUSSION

Fast 100 Jahre nach dem ersten Einsatz von S-Lost als Giftgas gibt es keine Ursachenorientierte Behandlung für die durch diesen Wirkstoff ausgelösten Hautschäden. Sie können bislang ausschließlich nur symptomatisch versorgt werden. Der Hauptgrund dafür ist das mangelhafte Wissen über die verantwortlichen Pathomechanismen.

Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit waren daher molekulare Untersuchungen zu der durch Exposition der Haut mit S-Lost verursachten Blasenbildung und der nachfolgend auftretenden verzögerten Wundheilung.

F.1 Mechanismen der Blasenbildung:

Einfluss von S-Lost auf die MMP/TIMP-Expression in Hautzellen

Von verschiedenen Hauterkrankungen, wie etwa dem bullösen Pemphigoid, ist bereits bekannt, dass der auftretenden Blasenbildung eine verstärkte Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zugrunde liegt.^{109;110} Da MMPs äußerst potente Modulatoren der extrazellulären Matrix (EZM) darstellen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit speziell die Expression ausgewählter MMPs und ihres endogenen Inhibitors TIMP-1 unter dem Einfluss von S-Lost in diversen in der Haut vorkommenden Zelltypen untersucht. Dabei zeigte sich, dass S-Lost in Abhängigkeit vom Zelltyp die Biosynthese von MMPs und TIMP-1 in unterschiedlicher Weise beeinflusst.

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Untersuchungen im Hautmodell und einzelnen Zellpopulationen in der Haut insbesondere unter Berücksichtigung der Interaktion von Keratinozyten und Fibroblasten im Detail diskutiert.

F.1.1 Selektive Regulation der MMP-9

Die Applikation von S-Lost auf die oberste Schicht der „Epidermis“ im Hautmodell führte zu einem massiven Anstieg der zellulären MMP-9-Transkription und -Sekretion, ohne dass sich die Expression der nah verwandten MMP-2 oder des MMP-9-Inhibitors TIMP-1 veränderte. Diese Beobachtungen lassen auf spezifische Regulationsmechanismen schließen und stimmen mit Berichten anderer Arbeitsgruppen überein, wonach die MMP-9-Biosynthese in der Haut von Schweinen und Mäusen durch S-Lost selektiv hochreguliert wird, nicht aber die von MMP-2.^{84;111} Diese differentielle Regulation der beiden Gelatinasen wurde auch schon bei

anderen Zelltypen mesodermalen Ursprungs wie Fibroblasten, endothelialen Zellen und mesenchymalen Stammzellen gezeigt.¹¹²⁻¹¹⁴ Der divergierende Regulationsmechanismus kann durch die stark unterschiedlichen Promotorstrukturen der beiden Gene erklärt werden, die sich bei MMP-9 durch eine Vielzahl regulatorischer Elemente auszeichnen, während die von MMP-2 die Charakteristika eher konstitutiv exprimierter Gene aufweisen.¹¹⁵

F.1.2 Parakriner Mechanismus der MMP-9-Freisetzung

Weiterführende detaillierte Untersuchungen an den beiden das Hautmodell aufbauenden Zelltypen zeigten, dass S-Lost die MMP-9-Expression in den Monokulturen primärer Fibroblasten (NHDF) und immortalisierten Keratinozyten (HACaT) nicht unmittelbar induzieren kann. Vielmehr gelang es, einen parakrinen Regelkreis zu identifizieren, der auf der konstitutiven Sekretion eines bislang unbekanntes löslichen Faktors aus Keratinozyten beruht und bei Fibroblasten zur Induktion einer basalen Transkription und Sekretion von MMP-9 führt. Eine Behandlung der Keratinozyten mit S-Lost verstärkt offensichtlich die Sekretion dieses parakrinen Faktors und führt letztlich zu einer deutlich erhöhten MMP-9-Expression in Fibroblasten. Diese Befunde betonen die Bedeutsamkeit der Interaktion verschiedener Zelltypen in der Haut und bestätigen entsprechende Daten einer anderen Forschungsgruppe, die eine vermehrte MMP-9-Sekretion bei Fibroblasten nach Cokultivierung mit Keratinozyten zeigten.¹¹⁶

Da auch Brustkrebszellen durch Sekretion von TNF- α und TGF- β in Tumor-assoziierten Fibroblasten eine MMP-9-Expression induzieren können,¹¹⁷ scheinen Fibroblasten für die MMP-9-stimulierenden Signale aus anderen Zelltypen besonders empfänglich zu sein. In ersten eigenen Vorversuchen (Daten hier nicht gezeigt) mit Arrays (RayBiotech, USA) zum Nachweis von Zytokinen und Wachstumsfaktoren konnten im Medium von S-Lost-behandelten Keratinozyten potenzielle Faktoren identifiziert werden, die für die parakrine MMP-9-Induktion verantwortlich sein könnten. So nahm die Konzentration von TNF- α , IL-6 und GRO α nach S-Lost-Exposition zu, wobei es sich hier um Zytokine handelt, die zum Teil bereits als MMP-9-Regulatoren in verschiedenen Zelltypen beschrieben wurden.^{43;118;119} In nachfolgenden Untersuchungen konnten wir jedoch unter Verwendung neutralisierender Antikörper gegen diese Faktoren bislang keine kausale Beteiligung der genannten Zytokine an der S-Lost-induzierten parakrinen MMP-9-Expression in Fibroblasten nachgewiesen.

F.1.3 Pathophysiologische Bedeutung von MMP-9 bei der Blasenbildung

MMP-9 besitzt ein breites Spektrum an Substraten, die wesentliche EZM-Moleküle darstellen wie z.B. Kollagen Typ IV, Laminin, Aggrekan, Elastin und Entaktin.¹²⁰ Somit ist MMP-9 in der Lage vor allem durch Degradation von Kollagen Typ IV, dem Hauptbestandteil der Basalmembran, direkt zur Gewebeerstörung beizutragen.

Aufgrund unserer Erkenntnisse, dass MMP-9 in verschiedenen Hautzelltypen (v.a Fibroblasten und PMN-Granulozyten) nach S-Lost-Vergiftung verstärkt exprimiert wird, ist die Beteiligung dieser Proteinase an der charakteristischen Blasenbildung sehr wahrscheinlich (Abb. 36).

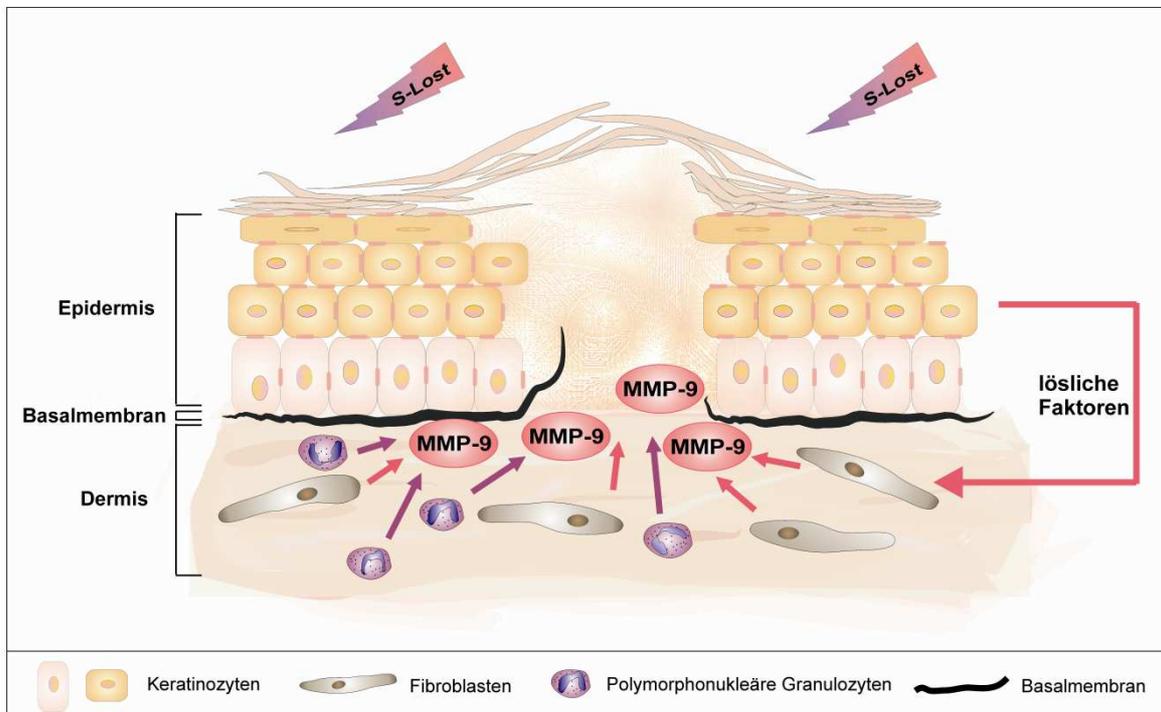


Abb. 36: Modell der S-Lost-induzierten Blasenbildung

Bei S-Lost-exponierter Haut ist stets eine starke Blasenbildung zu beobachten. Unsere Ergebnisse an Zellkulturen zeigen, dass S-Lost offenbar als Induktor der MMP-9-Expression wirkt. Insbesondere Fibroblasten sekretieren dann vermehrt MMP-9, stimuliert durch lösliche Faktoren, die Keratinozyten nach S-Lost-Exposition freisetzen. Zusätzlich tragen PMN-Granulozyten zum verstärkten Vorkommen der MMP-9 im Gewebe bei, da diese bei Kontakt mit S-Lost unmittelbar große Mengen an MMP-9 aus den Speichergranula ausschütten. Diese vermehrte Expression und Sekretion von MMP-9 führt zum Abbau der Basalmembran, wodurch die Epidermis den Kontakt zur Dermis verliert und in der für S-Lost typischen Blasenbildung resultiert.

In der Literatur ist eine bedeutende Rolle von MMP-9 bei verschiedenen Hauterkrankungen ebenso wie bei der normalen Wundheilung beschrieben. So zeigen in einem experimentellen Modell für das bullöse Pemphigoid MMP-9-defiziente Mäuse keine Blasenbildung mehr.¹⁰⁹

Dies weist auf eine kausale Beteiligung von MMP-9 an der Pathophysiologie dieser Erkrankung hin, möglicherweise durch Degradation von Strukturproteinen, die in der Basalmembran für den engen Kontakt zwischen Dermis und Epidermis sorgen. In ähnlicher Weise konnte in einem Modell für eine andere blasenbildende Hauterkrankung namens *Epidermolysis bullosa acquisita* gezeigt werden, dass die Aktivität von MMP-9 essenziell zur proteolytischen Trennung von Epidermis und Dermis beiträgt.¹²¹

Da die S-Lost-vermittelte Blasenbildung ebenfalls durch eine Lösung der Verbindung zwischen Epidermis und Dermis charakterisiert ist,¹²² lassen unsere Ergebnisse den Schluss zu, dass dieser Prozess durch eine erhöhte MMP-9-Sekretion aus Fibroblasten und anderen Zellen (wie z.B. PMN-Granulozyten) begünstigt wird (Abb. 36). Des Weiteren kann MMP-9 durch Inaktivierung des Proteinaseinhibitors $\alpha 1$ -PI, der zu den wichtigsten Inhibitoren des proteolytischen Enzyms Elastase aus PMN-Granulozyten gehört, auch indirekt zu diesen pathologischen Prozessen beitragen, da durch den $\alpha 1$ -PI-Mangel ein vermehrter Abbau von Strukturproteinen (wie z.B. Elastin) oder eine Verstärkung von Entzündungsreaktionen ausgelöst wird.¹²³

Darüber hinaus sind für MMP-9 eine Vielzahl regulatorischer Funktionen bekannt, die durch proteolytische Prozessierung biologisch aktiver Proteine zustande kommt. Hierzu zählt die Aktivierung von TGF- β und Interleukin-8,³⁷ das in PMN-Granulozyten wiederum die MMP-9-Sekretion erhöht¹²⁴ und so über eine positive Rückkopplung die MMP-9-vermittelten Effekte in S-Lost exponiertem Gewebe weiter verstärkt. Dies stimmt überein mit der von uns beobachteten vermehrten MMP-9-Ausschüttung aus frisch isolierten PMN-Granulozyten und immortalisierten Monozyten (THP-1-Zellen) unmittelbar nach S-Lost-Behandlung *in vitro*, was mutmaßlich auch zur Blasenbildung nach S-Lost-Exposition *in vivo* beiträgt.

F.1.4 Bedeutung von MMPs für die Migration von Fibroblasten

Für MMP-9 wurde bereits nachgewiesen, dass sie an der Rekrutierung und Migration von inflammatorischen Zellen sowie Keratinozyten und Fibroblasten im Gewebe während entzündlicher oder regenerativer Prozesse beteiligt ist.^{39;125;126} Dies steht im Einklang mit den eigenen Beobachtungen, wonach die durch S-Lost vermehrte MMP-9-Sekretion aus Fibroblasten sowohl mit der verstärkten Migrationsfähigkeit dieser Zellen im *Scratch*-Assay als auch mit der verbesserten Invasion der Zellen durch eine rekonstituierte Basalmembran einherging.

Wahrscheinlich sind neben MMP-9 aber auch andere EZM-degradierende Proteasen und stimulatorische Faktoren für die Wanderungseigenschaft der Fibroblasten von Bedeutung. Beispielsweise wurde in einem Cokultur-System aus Keratinozyten und Fibroblasten Stratifin (zur 14-3-3-Proteinfamilie zugehörig) als parakriner Stimulator für eine MMP-1-Induktion identifiziert.¹²⁷ In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass MMP-1 von Fibroblasten exprimiert wird, wenn diese mit sezernierten Faktoren der S-Lost-behandelten Keratinozyten inkubiert wurden. Während der Wundheilung erhalten Fibroblasten von epidermalen Zellen spezifische Signale, die für eine Umschaltung der EZM-Produktion auf die Biosynthese von MMPs sorgen, insbesondere von MMP-1, die für die Migration der Zellen und Modellierung des interstitiellen Stromas eine entscheidende Bedeutung hat.¹²⁸ Somit ist anzunehmen, dass für Fibroblasten während des Wundheilungsprozesses nach einer S-Lost-Exposition neben MMP-9 auch MMP-1 für die Mobilität der Zellen benötigt wird.

F.2 Mechanismen der verzögerten Wundheilung: Einfluss von S-Lost auf die Funktionalität von Keratinozyten

F.2.1 Bedeutung des Differenzierungsstatus von Progenitorzellen der Haut

Zur Aufklärung molekularer Mechanismen der durch S-Lost verursachten verzögerten Wundheilung wurden primäre humane Keratinozyten (NHEK) eingesetzt, die als unreife Progenitorzellen für das regenerative Potential der Haut mit verantwortlich sind. Diese Zellen sind in der basalen Schicht der Epidermis zu finden und tragen unter physiologischen Bedingungen zur Homöostase in der Haut bei. Während der Wundheilung dienen sie der Regeneration des Gewebes.²²

Der unreife Status der für unsere Experimente verwendeten NHEK wurde in Kulturen durch Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration und so durch die damit eingeleitete Differenzierung *in vitro* von uns verifiziert. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration spiegelt die *in vivo*-Situation in der Epidermis wider, in der die Reifung von Keratinozyten in der Basalschicht anhand eines steigenden Ca^{2+} -Gradienten in Richtung der äußeren Zellschichten mit ausgelöst wird.¹⁰

Unsere Untersuchungen zeigten, dass S-Lost in ähnlicher Weise wie Ca^{2+} eine terminale Differenzierung in NHEK induziert. Dabei erhöhte S-Lost in unseren Experimenten nicht nur die Biosynthese früher Reifungsmarker⁸³ wie Keratin-1 und Involucrin, sondern stimulierte darüber hinaus auch die Expression des späten Markers Loricrin, was darauf schließen lässt,

dass eine terminale Differenzierung in den Zellen eingeleitet wurde. Für Involucrin konnten wir nach S-Lost-Behandlung sowohl Monomere als auch kovalent verknüpfte Oligomere des Proteins detektieren, wie dies auch in Untersuchungen anderer Autoren nachgewiesen wurde.¹²⁹

Die S-Lost-vermittelte Induktion der Differenzierungsmarker in unseren Experimenten mit den NHEK war begleitet von einer Abnahme der Proliferationsrate, was typischerweise nach Beginn des Reifungsprozesses in Keratinozyten zu beobachten ist.¹³⁰ In Übereinstimmung damit nahm nach S-Lost-Behandlung der NHEK-Zellen auch die Expression von Amphiregulin ab (Daten hier nicht gezeigt), einem wichtigen Regulator des Zellwachstums in Keratinozyten.¹³¹

Somit lässt sich aus unseren Ergebnissen schließen, dass es in unreifen Keratinozyten nach einer S-Lost-Exposition zu einer verfrühten Differenzierung kommt, die unabhängig von der exogenen Ca^{2+} -Konzentration ist. Dies könnte in der basalen Schicht des von S-Lost-betroffenen Gewebes zu einer Beeinträchtigung der Funktionalität der Progenitorzellen führen, so dass diese nicht mehr im vollen Umfang für die Re-Epithelialisierung und Regeneration der Haut zur Verfügung stehen und so zur Pathophysiologie der eingeschränkten Wundheilung in den geschädigten Geweben beitragen könnten.

Im Hinblick auf die Bedeutung von Progenitorzellen für die Wundheilung sind auch humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) zu nennen, die nach dermalen Verletzungen aus dem Knochenmark über die Zirkulation in die Haut einwandern und dort zur Geweberegeneration beitragen.¹⁸ Durch die Differenzierung in Keratinozyten unterstützen sie die Re-Epithelialisierung, während ihre Umwandlung in Myofibroblasten die kontraktilen Kräfte für den Wundschluss verstärkt.^{18;132-134} Zudem üben hMSC über die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen in parakriner Weise immunmodulatorische Effekte bei der Heilung einer Wunde aus.^{19;133}

Unsere Ergebnisse liefern nun erstmals Hinweise auf eine Dysregulation der Differenzierung von hMSC nach Kontakt mit S-Lost, was ebenfalls zur Pathophysiologie der verlangsamten Wundheilung beitragen könnte.

F.2.2 Bedeutung von MMPs für die Migration von Keratinozyten

Neben der regulären Differenzierung ist auch die Migrationsfähigkeit der Keratinozyten essentiell für die normale Wundheilung.^{135;136} So wandern insbesondere während der Re-Epithelialisierung der Haut unversehrte Zellen der Basalschicht und des Wundrandes in das verletzte Gewebe ein.²¹

Unsere Daten zeigen nun, dass S-Lost die Fähigkeit unreifer Keratinozyten beeinträchtigt, durch extrazelluläre Matrix zu migrieren. Diese Einschränkung könnte auch *in vivo* zu der verzögerten Geweberegeneration beitragen, die typischerweise bei S-Lost-geschädigter Haut beobachtet wird.

Die verringerte Mobilität nach S-Lost-Exposition in unseren Experimenten ging mit einer geringeren basalen Expression von MMP-1 und MMP-9 einher. Normalerweise ist jedoch zu beobachten, dass MMP-9 während des Wundheilungsprozesses besonders bei wandernden Keratinozyten verstärkt sekretiert wird.³³ Auch im Mausmodell gibt es Belege für die Beteiligung der MMP-9 an der Geweberegeneration, da die Tiere nach MMP-9-Knockout bei einer *Full-Thickness*^{**}-Verletzung eine verzögerte Re-Epithelialisierung aufweisen, die unter anderem auf die geringeren Wanderungsraten der Keratinozyten zurückzuführen ist.¹³⁷

Bei tiefer Verwundung der Haut kommt es stets auch zur Zerstörung von Basalmembranstrukturen, so dass Keratinozyten der Epidermis mit Matrixbestandteilen der Dermis wie Kollagen I in Kontakt kommen. Dadurch wird in diesen Zellen MMP-1 induziert, die die Keratinozyten zur Wanderung über die provisorische Matrix nutzen, welche während der frühen Phase der Wundheilung gebildet wird.¹³⁸

Dass eine erhöhte Expression bestimmter MMPs für die Heilung förderlich sein kann, ist auch aus Untersuchungen an chronischen Wunden (wie dem diabetischen Ulcus) bekannt. Hier korreliert die Höhe der MMP-1-Expression unmittelbar mit einer verbesserten Wundheilungsrate.¹³⁹ Umgekehrt führt eine schwache Expression dieser Proteinase zu einem reduzierten Migrationspotential von Keratinozyten während des Heilungsprozesses und bedingt so eine verzögerte Re-Epithelialisierung.

Verglichen mit der durch erhöhte MMP-Aktivität verursachten Blasenbildung als frühes Symptom einer S-Lost-exponierten Haut, sind für die später zu beobachtende verzögerte Wundheilung offenbar erniedrigte MMP-Expressionen mitverantwortlich. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer zeitlich abgegrenzten Intervention hinsichtlich spezifischer MMPs als therapeutische Targets.

^{**} Hautverletzung, bei der Epidermis und Dermis betroffen sind

Interessanterweise konnte in unseren Untersuchungen die durch S-Lost-Exposition blockierte Migration und MMP-1-Expression von NHEK durch Inhibition der MAPK p38 wiederhergestellt werden. Unsere Resultate zeigen somit, dass die verzögerte Re-Epithelialisierung der durch S-Lost geschädigten Haut auf eine Migrationshemmung bei Keratinozyten beruhen könnte, der ihrerseits eine verringerte MMP-Expression zugrunde liegt und der möglicherweise durch Applikation eines p38-MAPK-Inhibitors therapeutisch begegnet werden könnte.

F.2.3 Bedeutung der beteiligten MAPK-Signalwege

Eine exakte Regulation zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Migration ist von grundlegender Bedeutung für die Funktionalität von Stamm- und Progenitorzellen. Dies gilt besonders für deren Aktivierung aus dem Ruhezustand, etwa im Rahmen der Geweberegeneration oder Wundheilung nach spezifischer Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen.¹⁴⁰ Möglicherweise führt S-Lost zu einer Störung dieser Regulationsmechanismen und der intrazellulären Signalübertragung, was die von uns beschriebene vorzeitige Differenzierungsinduktion in NHEK bedingen könnte.

Bezüglich der beteiligten Signalwege zeigte sich in unseren Versuchen nach S-Lost-Exposition der Keratinozyten eine Zunahme der phosphorylierten Formen der MAPK p38 und ERK1/2 (Details siehe Abb. 37). Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen aus Untersuchungen mit anderen Stressfaktoren wie UV-Strahlung überein, die in verschiedenen Zelltypen eine Aktivierung von p38 bewirken.¹⁴¹⁻¹⁴³ Im Gegensatz zu p38 wird ERK1/2 hingegen typischerweise durch Wachstumsfaktoren und Zytokine induziert.¹⁴¹

In unseren Experimenten erfolgte ein Anstieg der Phosphorylierung von p38 innerhalb der ersten halben Stunde nach S-Lost-Exposition, wie dies auch schon in anderen Studien mit humanen und murinen Keratinozyten nach Behandlung mit S-Lost oder dessen Analogon 2-Chlorethyl-Ethylsulfid (CEES) gezeigt wurde.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷ Dies belegt die zentrale Rolle des p38-MAPK-Signalweges als Antwort der Zellen auf S-Lost. Der von uns nachgewiesenen verfrühten Differenzierung liegt die verstärkte p38-Aktivierung sowie die Phosphorylierung dessen Zielproteins Hsp27 zugrunde, was mit einem aktuellen Bericht übereinstimmt, in dem p38 und Hsp27 als essenzielle Faktoren der geregelten epidermalen Differenzierung genannt werden.¹⁴⁸

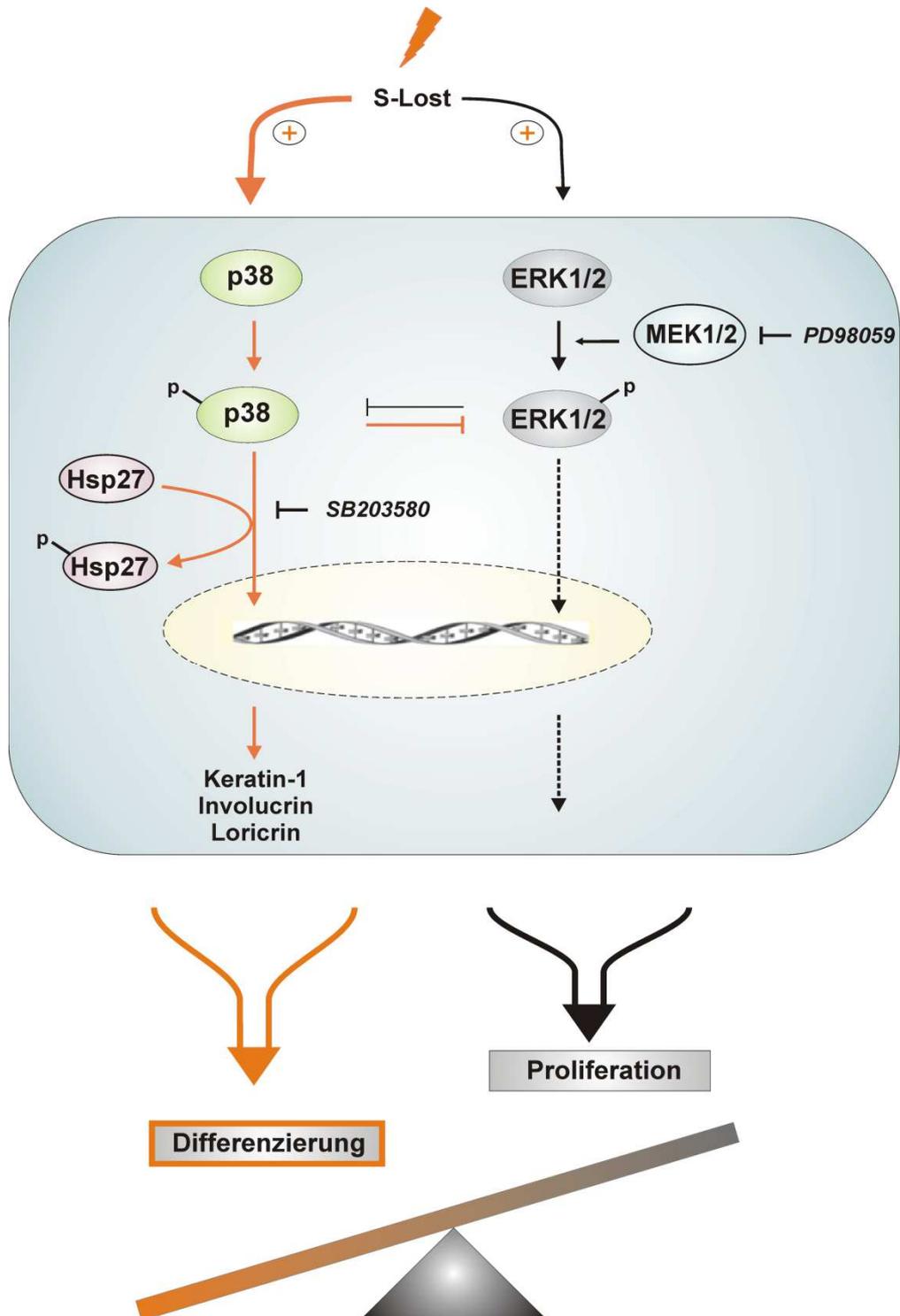


Abb. 37: Schematischer Überblick über die S-Lost-induzierten Signalkaskaden in Keratinozyten

Nach Exposition unreifer Keratinozyten mit S-Lost wird in den Zellen der Differenzierungsprozess eingeleitet. Dies ist insbesondere durch eine dauerhaft verstärkte Aktivität der MAPK p38 gekennzeichnet, wohingegen die von ERK1/2 nur kurzzeitig erhöht ist. Wie der Einsatz von spezifischen Inhibitoren (SB203580 bzw. PD98059) zeigte, scheint ERK1/2 für die proliferativen Eigenschaften der unreifen Zellen verantwortlich zu sein. p38 hingegen ist offenbar essentiell für den Differenzierungsprozess, der durch ERK1/2 negativ moduliert wird. In Übereinstimmung damit ließ sich durch Blockierung von p38 die S-Lost-induzierte Differenzierung verhindern. Somit könnte die Applikation eines selektiven p38-Inhibitors eine neue, sinnvoll erscheinende Option für die Behandlung der Wundheilungsstörung in S-Lost-exponierter Haut darstellen.

Aus Untersuchungen an Mäusen ist bekannt, dass ERK1/2 nach S-Lost-Behandlung in Keratinozyten stabil hochreguliert wird.¹⁴⁴ Unsere Resultate an humanen Keratinozyten belegen einen massiven Anstieg des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 innerhalb von 10 Minuten nach S-Lost-Exposition, der jedoch nach 30 Minuten wieder vollständig in einen dephosphorylierten Status überging und der dann über mehrere Tage stabil blieb. Möglicherweise können diese Unterschiede durch Spezies-spezifische Regulationsmechanismen oder auch durch eine Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung durch p38 zu erklären sein.¹⁴⁹

Interessanterweise zeigten unsere Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren von p38 und ERK1/2 eine gegenseitige Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus beider MAPK. Verschiedene andere Arbeitsgruppen berichten ebenfalls von komplexen Interaktionen beider Signalwege, die einen bidirektionalen negativen Crosstalk einschließen.¹⁴⁹⁻¹⁵² So wurde in HeLa-Zellen eine Hemmung der ERK1/2-Aktivität unter dem Einfluss von p38 nachgewiesen.¹⁴⁹ Ein anderer Mechanismus beruht auf der Dephosphorylierung von ERK1/2 durch eine p38-vermittelte Aktivierung spezifischer Phosphatasen.¹⁵³

In unseren MAPK-Inhibitor-Studien gelang zudem erstmals der Nachweis dafür, dass p38 sowohl für die physiologische (durch Ca^{2+} induzierte) als auch für die pathophysiologische (durch S-Lost ausgelöste) Differenzierung ursächlich verantwortlich ist. Dies stimmt mit Beobachtungen einer anderer Forschungsgruppe überein, wonach eine Inhibition von p38 die Expansion von Keratinozyten stark erleichtert, da in diesen Zellen die basale Expression von Differenzierungsmarkern niedrig gehalten und so die Proliferation gefördert wird.¹⁵⁴ Auch in anderen Zelltypen wie Myoblasten und Osteoklasten scheint p38 eine wichtige Rolle beim zellulären Reifungsprozess zu spielen.^{155;156}

Interessanterweise aktivierte S-Lost in den Experimenten mit primären Keratinozyten (NHEK) sowohl p38 als auch ERK1/2, obwohl beide Signalwege offenbar unterschiedliche Rollen in der Kontrolle der Differenzierung dieser Zellen einnehmen. Im Gegensatz zur Hemmung von p38 wurde bei Inhibition von ERK1/2 der durch S-Lost bzw. Ca^{2+} induzierte Reifungsprozess signifikant gesteigert. Das impliziert eine negative Wirkung der ERK1/2-Aktivität bei diesem Vorgang. In ähnlicher Weise hat in Myoblasten die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges eine Hemmung der Differenzierung zur Folge.¹⁵⁷

Zusammenfassend weisen die eigenen Resultate an unreifen Keratinozyten darauf hin, dass die S-Lost-induzierte Differenzierung auf eine stabile Aktivierung der p38-MAPK zurückzuführen ist, die nur von einer kurzzeitigen ERK1/2-Stimulation antagonisiert wird. Es verschiebt sich demnach die Balance zwischen den Signalwegen von ERK1/2 und p38 bei S-Lost-Behandlung in Richtung der p38-Aktivität, so dass der Phänotyp proliferierender Progenitorzellen vermehrt zu dem der reifen Keratinozyten wechselt (Abb. 37). Somit ist anzunehmen, dass p38 bei der Initiierung der Differenzierung von Keratinozyten nach S-Lost-Exposition von entscheidender Bedeutung ist und die dominierende MAPK bei diesem Vorgang darstellt.

Sowohl unsere Experimente mit Keratinozyten-Monokulturen als auch erste Vorversuche im Hautmodell zeigen, dass einer S-Lost-induzierten vorzeitigen Differenzierung von Keratinozyten durch Applikation eines p38-Inhibitors entgegengewirkt werden kann.

Entsprechend aller Resultate erscheint somit der Einsatz selektiver Inhibitoren gegen p38, nicht aber gegen ERK1/2, als sinnvoll bei der Erwägung innovativer Strategien zur Behandlung von Wundheilungsstörungen der Haut nach Exposition mit S-Lost.

G SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Bis heute gibt es kein spezifisches Antidot zur Behandlung von S-Lost-induzierten Schädigungen der Haut. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation können nun möglicherweise zur Entwicklung innovativer Therapien basierend auf der Applikation spezifischer Inhibitoren beitragen.

Bezüglich der Blasenbildung als frühes Symptom einer S-Lost-Exposition der Haut lassen eigene Resultate die Hochregulation diverser MMPs, insbesondere der MMP-9, in verschiedenen Hautzelltypen erkennen. Korrespondierende Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen führten bereits zur Annahme, dass der therapeutische Einsatz selektiver niedermolekularer MMP-Inhibitoren zur verbesserten Wundheilung auch bei S-Lost-verursachten Hautläsionen beitragen könnte.¹⁵⁸⁻¹⁶¹ Diese These wurde durch Studien an Hautbiopsien bestätigt, wonach die S-Lost-induzierte Separation von Epidermis und Dermis durch Gabe des MMP-Breitband-Inhibitors Ilomastat (GM6001) verhindert werden konnte.¹⁶² Auch für die durch S-Lost hervorgerufenen Symptome in der Lunge und in den Augen konnte im Tiermodell bei Verabreichung von Ilomastat oder des unspezifischen MMP-Inhibitors Doxycyclin nach Inhalation bzw. topischer Behandlung eine Abschwächung inflammatorischer Prozesse sowie eine Reduktion der MMP-9-Expression beobachtet werden.¹⁶³⁻¹⁶⁵

In klinischen Studien führte jedoch die Applikation von GM6001 bei Patienten mit künstlich gesetzten Blasen langfristig zu einer verlangsamten Wundheilung, was die Notwendigkeit einer zeitlich begrenzten Therapie mit derartigen Wirkstoffen deutlich macht.¹⁶⁶ Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte die in unseren Untersuchungen gezeigte Bedeutung der MMP-Expression für die Migration regenerierender epidermaler Progenitorzellen bei dem nachfolgenden Wundheilungsprozess liefern. Denn offensichtlich blockiert S-Lost langfristig sowohl die Expression spezifischer MMPs (z.B. MMP-1) als auch die Migrationskapazität von Keratinozyten und trägt dadurch möglicherweise zur verzögerten Re-Epithelialisierung entsprechend verletzter Haut bei.

Unsere Resultate legen somit den Schluss nahe, dass eine therapeutische Applikation von MMP-Inhibitoren zur Behandlung von Hautblasen nach S-Lost-Exposition in einem zeitlich begrenzten Rahmen stattfinden sollte, um die MMP-Aktivität nicht zu beeinträchtigen, die später für die Wanderung regenerierender Zellen während der Wundheilung von entscheidender Bedeutung ist.

Um den langfristigen Auswirkungen von S-Lost auf die Wundheilung entgegenzutreten, würde sich nach den jetzt vorliegenden Erkenntnissen die Verabreichung von Inhibitoren der p38-MAPK-Signalweges anbieten. Diese Intervention könnte nicht nur dem Verlust der zellulären Mobilität durch Wiederherstellung der MMP-Expression entgegenwirken, sondern auch die frühzeitige Differenzierung der S-Lost-vergifteten Keratinozyten und somit den Verlust essentieller Haut-Progenitorzellen verhindern, wie insbesondere die eigenen *in vitro*-Untersuchungen im Hautmodell zeigen konnten.

Diese Empfehlung wird zudem durch neueste Daten unterstützt, die in einem Mausmodell für Wundheilungsstörungen generiert wurden. Dementsprechend hatte die topische Applikation eines selektiven p38-Inhibitors einen positiven Effekt auf die Wundkontraktion, die Formation des Granulationsgewebes und den Prozess der Re-Epithelialisierung.⁶⁶

H LITERATURVERZEICHNIS

1. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2009;10:207-217.
2. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J.Invest Dermatol.* 2003;121:231-241.
3. Alonso L, Fuchs E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev.* 2003;17:1189-1200.
4. Wertz PW. Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm.Venereol.Suppl (Stockh)* 2000;208:7-11.
5. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2005;6:328-340.
6. Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature* 2007;445:834-842.
7. Tsuji T, Kitajima S, Koashi Y. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis related antigen (LeY) in epithelial skin tumors. *Am.J.Dermatopathol.* 1998;20:164-169.
8. Koster MI. Making an epidermis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2009;1170:7-10.
9. Halprin KM. Epidermal "turnover time"--a re-examination. *Br.J.Dermatol.* 1972;86:14-19.
10. Elias PM, Ahn SK, Denda M et al. Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J.Invest Dermatol.* 2002;119:1128-1136.
11. Porter RM, Lane EB. Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function. *Trends Genet.* 2003;19:278-285.
12. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J.Cell Sci.* 2005;118:1341-1353.
13. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 2004;20:33-43.
14. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound.Repair Regen.* 2009;17:153-162.
15. O'Toole EA. Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin.Exp.Dermatol.* 2001;26:525-530.
16. Toriseva M, Kahari VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol.Life Sci.* 2009;66:203-224.
17. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276:75-81.
18. Sasaki M, Abe R, Fujita Y et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J.Immunol.* 2008;180:2581-2587.

19. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-1822.
20. Sellheyer K, Krahl D. Skin mesenchymal stem cells: Prospects for clinical dermatology. *J.Am.Acad.Dermatol.* 2010;63:859-865.
21. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N.Engl.J.Med.* 1999;341:738-746.
22. Ito M, Liu Y, Yang Z et al. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat.Med.* 2005;11:1351-1354.
23. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol.Surg.* 2005;31:674-686.
24. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;141:52-67.
25. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ.Res.* 2003;92:827-839.
26. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat.Rev.Cancer* 2003;3:422-433.
27. Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002;70:561-573.
28. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim.Biophys.Acta* 2005;1755:37-69.
29. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000;14:2123-2133.
30. Roderfeld M, Graf J, Giese B et al. Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biol.Chem.* 2007;388:1227-1234.
31. Steffensen B, Hakkinen L, Larjava H. Proteolytic events of wound-healing--coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* 2001;12:373-398.
32. Tandara AA, Mustoe TA. MMP- and TIMP-secretion by human cutaneous keratinocytes and fibroblasts - Impact of coculture and hydration. *J.Plast.Reconstr.Aesthet.Surg.* 2010;64:108-116.
33. Salo T, Makela M, Kylmaniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 1994;70:176-182.
34. Woodley DT, Reepithelialization. In: *The molecular and cellular biology of wound repair.* 1996;
35. Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD et al. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J.Cell Biol.* 1997;137:1445-1457.
36. Krampert M, Bloch W, Sasaki T et al. Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin. *Mol.Biol.Cell* 2004;15:5242-5254.

37. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:163-176.
38. Nakamura H, Fujii Y, Ohuchi E, Yamamoto E, Okada Y. Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases. *Eur.J.Biochem.* 1998;253:67-75.
39. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 2004;4:617-629.
40. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2007;8:221-233.
41. Hijova E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl.Lek.Listy* 2005;106:127-132.
42. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci.* 2006;11:1696-1701.
43. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 1995;376:345-355.
44. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990;87:5578-5582.
45. Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990;87:364-368.
46. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim.Biophys.Acta* 2010;1803:55-71.
47. De Clerck YA, Shimada H, Taylor SM, Langley KE. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor progression. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1994;732:222-232.
48. Soo C, Shaw WW, Zhang X et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast.Reconstr.Surg.* 2000;105:638-647.
49. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci.Signal.* 2008;1:re6.
50. Fingleton B. MMP Inhibitor Clinical Trials – The Past, Present, and Future. *The Cancer Degradome.* 2008:759-785.
51. Arlt M, Kopitz C, Pennington C et al. Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res.* 2002;62:5543-5550.
52. Haase I, Hobbs RM, Romero MR, Broad S, Watt FM. A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis. *J.Clin.Invest* 2001;108:527-536.

53. Wang S, Uchi H, Hayashida S et al. Differential expression of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2, phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB p105/p50 in chronic inflammatory skin diseases. *J.Dermatol.* 2009;36:534-540.
54. Pearson G, Robinson F, Beers GT et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr.Rev.* 2001;22:153-183.
55. Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim.Biophys.Acta* 2007;1773:1213-1226.
56. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006;24:21-44.
57. Johansen C, Kragballe K, Westergaard M et al. The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. *Br.J.Dermatol.* 2005;152:37-42.
58. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim.Biophys.Acta* 2010;1802:396-405.
59. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem.J.* 2010;429:403-417.
60. Muthusamy V, Piva TJ. The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFkappaB and TNFalpha signal transduction pathways. *Arch.Dermatol.Res.* 2010;302:5-17.
61. Hammaker D, Firestein GS. "Go upstream, young man": lessons learned from the p38 saga. *Ann.Rheum.Dis.* 2010;69 Suppl 1:i77-i82.
62. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005;15:11-18.
63. English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol.Sci.* 2002;23:40-45.
64. Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin.Cancer Res.* 2010;16:3329-3334.
65. Schindler JF, Monahan JB, Smith WG. p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets. *J.Dent.Res.* 2007;86:800-811.
66. Medicherla S, Wadsworth S, Cullen C et al. p38 MAPK inhibition reduces diabetes-induced impairment of wound healing. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, DovePress* 2009;2:91-100.
67. Medicherla S, Cullen C, Reddy M et al. Topical alpha-selective p38 MAP kinase inhibition reduces scute skin inflammation in guinea pig. *Journal of Inflammation Research, DovePress* 2010;3:9-16.
68. Hoesel LM, Mattar AF, Arbabi S et al. Local wound p38 MAPK inhibition attenuates burn-induced cardiac dysfunction. *Surgery* 2009;146:775-785.
69. Illig L, Paul E, Eyer P, Weger N, Born W. [Treatment of psoriasis vulgaris with external sulfur mustard gas with particular reference to its potential carcinogenic risk. III. Clinical and experimental studies on the extent of percutaneous and inhalational uptake of sulfur mustard gas]. *Z.Hautkr.* 1979;54:941-951.

70. Neidle S, Thurston DE. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. *Nat.Rev.Cancer* 2005;5:285-296.
71. Synthetische Gifte. Chemie, Wirkung und militärische Bedeutung. Deutscher Militärverlag 1963;
72. Dacre JC, Goldman M. Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard. *Pharmacol.Rev.* 1996;48:289-326.
73. Balali-Mood M., Hefazi M. The clinical toxicology of sulfur mustard. *Archives of Iranian Medicine* 2005;8:162-179.
74. Habermehl G., Hamann P., Krebs H.C. Nucleoside, Nucleotide und Nucleinsäuren. *Naturstoffchemie.: Springer-Lehrbuch;* 2008:425-466.
75. U.S.Army Edgewood Chemical Biological Center (ECBC). MSDS Distilled Mustard (HD). ATTN: AMSRD-ECB-CB-CR 2004
76. Kehe K, Szincz L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology* 2005;214:198-209.
77. Smith KJ, Smith WJ, Hamilton T et al. Histopathologic and immunohistochemical features in human skin after exposure to nitrogen and sulfur mustard. *Am.J.Dermatopathol.* 1998;20:22-28.
78. Paromov V, Suntres Z, Smith M, Stone WL. Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: role of oxidative stress, and antioxidant therapy. *J.Burns Wounds.* 2007;7:e7.
79. Jowsey PA, Williams FM, Blain PG. DNA damage, signalling and repair after exposure of cells to the sulphur mustard analogue 2-chloroethyl ethyl sulphide. *Toxicology* 2009;257:105-112.
80. Jowsey PA, Williams FM, Blain PG. The role of homologous recombination in the cellular response to sulphur mustard. *Toxicol.Lett.* 2010;197:12-18.
81. Bhat KR, Benton BJ, Rosenthal DS, Smulson ME, Ray R. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair in sulfur mustard-exposed normal human epidermal keratinocytes (NHEK). *J.Appl.Toxicol.* 2000;20 Suppl 1:S13-S17.
82. Rosenthal DS, Velena A, Chou FP et al. Expression of dominant-negative Fas-associated death domain blocks human keratinocyte apoptosis and vesication induced by sulfur mustard. *J.Biol.Chem.* 2003;278:8531-8540.
83. Rosenthal DS, Simbulan-Rosenthal CM, Iyer S et al. Sulfur mustard induces markers of terminal differentiation and apoptosis in keratinocytes via a Ca²⁺-calmodulin and caspase-dependent pathway. *J.Invest Dermatol.* 1998;111:64-71.
84. Shakarjian MP, Bhatt P, Gordon MK et al. Preferential expression of matrix metalloproteinase-9 in mouse skin after sulfur mustard exposure. *J.Appl.Toxicol.* 2006;26:239-246.
85. Niemann A, Ueber die Einwirkung des braunen Chlorschwefels auf Elaylgas. *Justus Liebigs Annalen der Chemie.*1860;
86. Ghabili K, Agutter PS, Ghanei M, Ansarin K, Shoja MM. Mustard gas toxicity: the acute and chronic pathological effects. *J.Appl.Toxicol.* 2010;30:627-643.

87. Zilker T. Medical management of incidents with chemical warfare agents. *Toxicology* 2005;214:221-231.
88. Shakarjian MP, Heck DE, Gray JP et al. Mechanisms mediating the vesicant actions of sulfur mustard after cutaneous exposure. *Toxicol.Sci.* 2010;114:5-19.
89. Graham JS, Schomacker KT, Glatter RD et al. Efficacy of laser debridement with autologous split-thickness skin grafting in promoting improved healing of deep cutaneous sulfur mustard burns. *Burns* 2002;28:719-730.
90. Gestewitz HR, Steiner ER, Militärmedizin, Hochschullehrbuch für Studenten der Medizin und Stomatologie. Militärverlag 1981; ISBN: 3327005486
91. Munro NB, Watson AP, Ambrose KR, Griffin GD. Treating exposure to chemical warfare agents: implications for health care providers and community emergency planning. *Environ.Health Perspect.* 1990;89:205-215.
92. Agency for Toxic Substances and Disease Registry/Division of Toxicology and Environmental Medicine. Medical Management Guidelines for Blister Agents: Sulfur Mustard Agent. <http://www.atsdr.cdc.gov/> 2010
93. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J.Cell Biol.* 1988;106:761-771.
94. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J.Invest Dermatol.* 1992;99:683-690.
95. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int.J.Cancer* 1980;26:171-176.
96. Lee YS, Yuspa SH, Dlugosz AA. Differentiation of cultured human epidermal keratinocytes at high cell densities is mediated by endogenous activation of the protein kinase C signaling pathway. *J.Invest Dermatol.* 1998;111:762-766.
97. Stanley JR, Yuspa SH. Specific epidermal protein markers are modulated during calcium-induced terminal differentiation. *J.Cell Biol.* 1983;96:1809-1814.
98. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
99. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J.Cell Biochem.* 1997;64:295-312.
100. Gareth EJ, *Human Cell Culture Protocols.* Humana Press 2009; ISBN: 0-89603-335-X
101. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat.Protoc.* 2007;2:329-333.
102. Egea, V. The role of matrix metalloproteinases and inflammatory cytokines on human mesenchymal stem cell invasiveness and differentiation capacity, Dissertation, 2008
103. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976;72:248-254.

104. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal.Biochem.* 1980;102:196-202.
105. Moll UM, Youngleib GL, Rosinski KB, Quigley JP. Tumor promoter-stimulated Mr 92,000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells: isolation and characterization of the enzyme from HT1080 tumor cells. *Cancer Res.* 1990;50:6162-6170.
106. Schneider J., Abend M., Kehe K., Szinicz L. Alkylating agents like sulfur mustard induce upregulation of TNF- α gene expression in cocultures of human epidermal keratinocytes and resting fibroblasts. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 2004;369:
107. Hennings H, Michael D, Cheng C et al. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 1980;19:245-254.
108. Perez DS, Armstrong-Lea L, Fox MH, Yang RS, Campain JA. Arsenic and benzo[a]pyrene differentially alter the capacity for differentiation and growth properties of primary human epidermal keratinocytes. *Toxicol.Sci.* 2003;76:280-290.
109. Liu Z, Shipley JM, Vu TH et al. Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *J.Exp.Med.* 1998;188:475-482.
110. Narbutt J, Waszczykowska E, Lukamowicz J et al. Disturbances of the expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors cause destruction of the basement membrane in pemphigoid. *Pol.J.Pathol.* 2006;57:71-76.
111. Sabourin CL, Danne MM, Buxton KL, Casillas RP, Schlager JJ. Cytokine, chemokine, and matrix metalloproteinase response after sulfur mustard injury to weanling pig skin. *J.Biochem.Mol.Toxicol.* 2002;16:263-272.
112. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 1999;13:781-792.
113. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2001;33:960-970.
114. Ries C, Egea V, Karow M et al. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 2007;109:4055-4063.
115. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J.Cell Physiol* 2007;211:19-26.
116. Sawicki G, Marcoux Y, Sarkhosh K, Tredget EE, Ghahary A. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Mol.Cell Biochem.* 2005;269:209-216.
117. Stuelten CH, DaCosta BS, Arany PR et al. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF- α and TGF- β . *J.Cell Sci.* 2005;118:2143-2153.
118. Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C et al. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1999;94:2080-2089.

119. Heidinger M, Kolb H, Krell HW, Jochum M, Ries C. Modulation of autocrine TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression by mitogen-activated protein kinases in THP-1 monocytic cells. *Biol.Chem.* 2006;387:69-78.
120. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I et al. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* 2002;37:375-536.
121. Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ et al. Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J.Pathol.* 2004;204:519-527.
122. Cowan FM, Broomfield CA. Putative roles of inflammation in the dermatopathology of sulfur mustard. *Cell Biol.Toxicol.* 1993;9:201-213.
123. Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* 2008;90:227-242.
124. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van DJ, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 2000;96:2673-2681.
125. Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J.Immunol.* 1996;156:1-4.
126. Ravanti L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int.J.Mol.Med.* 2000;6:391-407.
127. Li M, Moeen RA, Chavez-Munoz C, Lai A, Ghahary A. Keratinocyte-releasable factors increased the expression of MMP1 and MMP3 in co-cultured fibroblasts under both 2D and 3D culture conditions. *Mol.Cell Biochem.* 2009;332:1-8.
128. Medina A, Ghaffari A, Kilani RT, Ghahary A. The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Mol.Cell Biochem.* 2007;305:255-264.
129. Yaffe MB, Murthy S, Eckert RL. Evidence that involucrin is a covalently linked constituent of highly purified cultured keratinocyte cornified envelopes. *J.Invest Dermatol.* 1993;100:3-9.
130. Topley GI, Okuyama R, Gonzales JG, Conti C, Dotto GP. p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:9089-9094.
131. Stoll SW, Johnson JL, Li Y, Rittie L, Elder JT. Amphiregulin carboxy-terminal domain is required for autocrine keratinocyte growth. *J.Invest Dermatol.* 2010;130:2031-2040.
132. Sivamani RK, Schwartz MP, Anseth KS, Isseroff RR. Keratinocyte proximity and contact can play a significant role in determining mesenchymal stem cell fate in human tissue. *FASEB J.* 2011;25:122-131.
133. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007;25:2648-2659.
134. Schneider RK, Neuss S, Stainforth R et al. Three-dimensional epidermis-like growth of human mesenchymal stem cells on dermal equivalents: contribution to tissue organization by adaptation of myofibroblastic phenotype and function. *Differentiation* 2008;76:156-167.

135. Hosoya A, Lee JM, Cho SW et al. Morphological evidence of basal keratinocyte migration during the re-epithelialization process. *Histochem.Cell Biol.* 2008;130:1165-1175.
136. Patel GK, Wilson CH, Harding KG, Finlay AY, Bowden PE. Numerous keratinocyte subtypes involved in wound re-epithelialization. *J.Invest Dermatol.* 2006;126:497-502.
137. Kyriakides TR, Wulsin D, Skokos EA et al. Mice that lack matrix metalloproteinase-9 display delayed wound healing associated with delayed reepithelization and disordered collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol.* 2009;28:65-73.
138. Pilcher BK, Sudbeck BD, Dumin JA, Welgus HG, Parks WC. Collagenase-1 and collagen in epidermal repair. *Arch.Dermatol.Res.* 1998;290 Suppl:S37-S46.
139. Muller M, Trocme C, Lardy B et al. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet.Med.* 2008;25:419-426.
140. Grose R, Werner S. An aPPARently protective mechanism for keratinocytes in wounded skin. *Trends Mol.Med.* 2002;8:149-151.
141. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2004;68:320-344.
142. Seo M, Cho CH, Lee YI et al. Cdc42-dependent mediation of UV-induced p38 activation by G protein betagamma subunits. *J.Biol.Chem.* 2004;279:17366-17375.
143. Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, Mukhtar H. Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 2001;176:110-117.
144. Rebholz B, Kehe K, Ruzicka T, Rupec RA. Role of NF-kappaB/RelA and MAPK pathways in keratinocytes in response to sulfur mustard. *J.Invest Dermatol.* 2008;128:1626-1632.
145. Dillman JF, McGary KL, Schlager JJ. An inhibitor of p38 MAP kinase downregulates cytokine release induced by sulfur mustard exposure in human epidermal keratinocytes. *Toxicol.In Vitro* 2004;18:593-599.
146. Black AT, Joseph LB, Casillas RP et al. Role of MAP kinases in regulating expression of antioxidants and inflammatory mediators in mouse keratinocytes following exposure to the half mustard, 2-chloroethyl ethyl sulfide. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 2010;245:352-360.
147. Ruff AL, Dillman JF. Sulfur mustard induced cytokine production and cell death: Investigating the potential roles of the p38, p53, and NF-kappaB signaling pathways with RNA interference. *J.Biochem.Mol.Toxicol.* 2010;24:155-164.
148. Jonak C, Mildner M, Klosner G et al. The hsp27kD heat shock protein and p38-MAPK signaling are required for regular epidermal differentiation. *J.Dermatol.Sci.* 2011;61:32-37.
149. Zhang H, Shi X, Hampong M, Blanis L, Pelech S. Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. *J.Biol.Chem.* 2001;276:6905-6908.
150. Efimova T, Broome AM, Eckert RL. A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J.Biol.Chem.* 2003;278:34277-34285.

151. Eckert RL, Crish JF, Efimova T et al. Regulation of involucrin gene expression. *J.Invest Dermatol.* 2004;123:13-22.
152. Chen W, Bowden GT. Activation of p38 MAP kinase and ERK are required for ultraviolet-B induced c-fos gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* 1999;18:7469-7476.
153. Wang Z, Yang H, Tachado SD et al. Phosphatase-mediated crosstalk control of ERK and p38 MAPK signaling in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2006;47:5267-5275.
154. Peng J, Li W, Li H, Jia Y, Liu Z. Inhibition of p38 MAPK facilitates ex vivo expansion of skin epithelial progenitor cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* 2009;45:558-565.
155. Al-Shanti N, Stewart CE. PD98059 enhances C2 myoblast differentiation through p38 MAPK activation: a novel role for PD98059. *J.Endocrinol.* 2008;198:243-252.
156. Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H, Tsujimoto M. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J.Biol.Chem.* 2000;275:31155-31161.
157. Al-Shanti N, Stewart CE. PD98059 enhances C2 myoblast differentiation through p38 MAPK activation: a novel role for PD98059. *J.Endocrinol.* 2008;198:243-252.
158. Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2007;6:480-498.
159. Wormser U, Brodsky B, Reich R. Topical treatment with povidone iodine reduces nitrogen mustard-induced skin collagenolytic activity. *Arch.Toxicol.* 2002;76:119-121.
160. Lindsay CD, Gentilhomme E, Mathieu JD. The use of doxycycline as a protectant against sulphur mustard in HaCaT cells. *J.Appl.Toxicol.* 2008;28:665-673.
161. Witte MB, Thornton FJ, Kiyama T et al. Metalloproteinase inhibitors and wound healing: a novel enhancer of wound strength. *Surgery* 1998;124:464-470.
162. Mol MA, van den Berg RM, Benschop HP. Involvement of caspases and transmembrane metalloproteases in sulphur mustard-induced microvesication in adult human skin in organ culture: directions for therapy. *Toxicology* 2009;258:39-46.
163. Guignabert C, Taysse L, Calvet JH et al. Effect of doxycycline on sulfur mustard-induced respiratory lesions in guinea pigs. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2005;289:L67-L74.
164. Anumolu SS, DeSantis AS, Menjoge AR et al. Doxycycline loaded poly(ethylene glycol) hydrogels for healing vesicant-induced ocular wounds. *Biomaterials* 2010;31:964-974.
165. Anderson DR, Taylor SL, Fetterer DP, Holmes WW. Evaluation of protease inhibitors and an antioxidant for treatment of sulfur mustard-induced toxic lung injury. *Toxicology* 2009;263:41-46.
166. Agren MS, Mirastschijski U, Karlsmark T, Saarialho-Kere UK. Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds. *Exp.Dermatol.* 2001;10:337-348.

I CURRICULUM VITAE

■ Persönliche Daten

Name: Tanja Popp
 Geburtstagsdatum und -ort: 31.07.1979 in München
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

■ Schulbildung

1986 – 1990 Grundschole an der Haldenbergerstrasse, München
 1990 – 1999 Elsa-Brändström-Gymnasium, München
 Abschluss: Abitur

■ Hochschulausbildung

Okt. 1999 – Mrz. 2005 Studium der Biologie an der
 Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München
Diplomarbeit:
Die Bcl-2 Proteinfamilie in *Hydra*
 Abschluss: Diplom-Biologin

seit Juni 2005 Promotionsarbeit:
**Molekulare Mechanismen in der Haut nach Einwirkung
 von S-Lost: Regulation der Expression von Matrix-
 Metalloproteinasen und der Differenzierungsprozesse in
 Haut-, Stroma- und Stammzellen**
 Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie;
 Klinikum Innenstadt; LMU, München
 Betreuung: Prof. Dr. Marianne Jochum und PD Dr. Christian Ries
 und Fakultät der für Biologie Department II, Institut für Zell-
 und Entwicklungsbiologie; LMU, München
 Betreuung: Prof. Dr. Angelika Böttger

■ Lehrtätigkeit

seit Sept. 2005 Mitbetreuung von Medizinstudierenden im Praktikum für
 „Klinische Chemie und Hämatologie“
 Medizinische Fakultät der LMU, München

■ Vorträge und Posterpräsentationen

2006

Analysis of matrix metalloproteinase (MMP) expression in different cell types of skin and lung after exposure to sulfur mustard. (Poster)

10. Medizinische C-Schutz-Tagung Bundeswehr, Neuherberg, 26.04. - 27.04.06

2007

Regulation of MMPs and TIMPs in cells of the skin after treatment with alkylating agents: From pure cell culture to skin model analysis. (Vortrag)

Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers, 28.02. - 04.03.07

Analysis of MMP and TIMP expression in various cell types from human skin after exposure to sulfur mustard. (Poster)

European Tissue Repair Society, Southampton, 26.09. - 28.09.07

Analysis of MMP and TIMP expression in various cell types from human skin after exposure to sulfur mustard. (Poster)

International Proteolysis Society, Patras, 20.10. - 24.10.07

Molecular mechanisms in the skin after exposure to alkylating substances. Regulation of MMPs and intracellular signaling after sulfur mustard exposure. (Vortrag)

Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie, Martinsried, 15.11.07

2008

Influence of sulfur mustard on MMP-9 expression and cellular differentiation in skin cells: role of p38 MAPK. (Vortrag)

Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers, 27.02. - 02.03.08

2009

MMP-9 expression and release from skin fibroblasts interacting with keratinocytes: Upregulation in response to sulphur mustard. (Vortrag)

Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers, 25.02. - 01.03.09

2010

Sulfur mustard induces cellular differentiation and blocks MMP-1 expression in human primary keratinocytes: essential role of p38 MAPK. (Vortrag)

Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers, 24.02. - 28.02.10

Induction of MMP-9 release and cellular differentiation in human skin cells: a MAPK-dependent response to sulfur mustard. (Poster)

ISSCR 8th Annual Meeting, San Francisco, 16.-19.06.10

Therapeutische Optionen zur Regeneration S-Lost-geschädigter Haut: Eigene Ergebnisse und Ausblick (Vortrag)

Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Bundeswehr, Neuherberg, 22.09.10

■ Publikationen

Ries C*, **Popp T***, Egea V, Kehe K, Jochum M.

Matrix metalloproteinase-9 expression and release from skin fibroblasts interacting with keratinocytes: Upregulation in response to sulphur mustard.
Toxicology 2009;263:26-31.

Karow M, **Popp T**, Egea V, Ries, C, Jochum, M, Neth, P.

Wnt signalling in mouse mesenchymal stem cells: impact on proliferation, invasion and MMP expression.
J.Cell Mol.Med. 2009;13:2506-2520.

Lasi, M, Pauly, B, Schmidt, N, Cikala, M, Stiening, B, Käsbauer, T, Zenner, G., **Popp, T**, Wagner, A, Knapp, RT, Huber, AH, Grunert, M, Söding, J, David, CN, Böttger, A.

The molecular cell death machinery in the simple cnidarian Hydra includes an expanded caspase family and pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins.
Cell Res. 2010, 20, 812–825

Egea, V, von Baumgarten, L, Schichor, C, Berninger, B, **Popp, T**, Neth, P, Goldbrunner, R, Kienast, Y, Winkler, F, Jochum, M, Ries C.

TNF-alpha respecifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and promotes migration toward experimental glioma.
Cell Death.Differ. 2010

Popp, T, Egea, V, Kehe, K, Steinritz, D, Schmidt, A, Jochum, M, Ries, C.

Sulfur mustard induces differentiation in human primary keratinocytes: opposite roles of p38 and ERK1/2 MAPK.
Toxicology Letters, 2011, DOI 10.1016/j.toxlet.2011.04.007, [Epub ahead of print]

** these authors contributed equally to this work*

J DANKSAGUNG

„Am Anfang jeder Forschung steht das Staunen.“

Wolfgang Wickler

Mein Dank gilt all denen, die mich während der Doktorarbeit stets unterstützt und mit mir gemeinsam gestaunt haben.

Frau Prof. Dr. Marianne Jochum, Leiterin der Abteilung Klinische Chemie und Klinische Biochemie am Klinikum der LMU München, hat mir die Ausübung meiner Tätigkeit als Doktorandin ermöglicht. Dafür und für das stets offene Ohr möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Nicht nur fachlich stand sie mir jederzeit zur Seite.

Außerordentlich dankbar bin ich Frau Prof. Dr. Angelika Böttger, Leiterin des *Lehrstuhls* für Zell- und Entwicklungsbiologie im Department Biologie II der LMU München, für die Vertretung meiner Promotion an der Fakultät der Biologie.

Insbesondere danke ich Herrn PD Dr. Christian Ries, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir vollstes Vertrauen entgegenbrachte. Stets war er mit fachlichem Rat und seiner Erfahrung eine große Unterstützung. Voller Respekt danke ich auch für das freundschaftliche Verhältnis, das sich über die Jahre entwickelt hat.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Kai Kehe, der mir in unserer Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Thomas Pitsch danke ich vor allem für seine Hilfe im Laboralltag und für seine Art den Tag oft bunter zu machen.

Dr. Virginia Egea, muchas gracias! Ich bin glücklich in unserem Labor nicht nur eine tolle Kollegin, sondern eine Freundin gefunden zu haben. Uns verbinden viele wundervolle, besondere Labor- und Alltagsgeschichten. „Be sure to wear some flowers in your hair“

Dr. Marisa Karow danke ich für ihren fachlichen Rat und vor allem ihrer Freundschaft, die mich durch viele schöne und auch manch schwere Zeit getragen hat.

Den folgenden ehemaligen und jetzigen Kollegen des Instituts bin ich überaus dankbar für das fröhliche und kollegiale Umfeld:

Prof. Dr. Edwin Fink, PD Dr. Sascha Faussner, PD Dr. Dorit Nägler, PD Dr. Peter Neth, Prof. Dr. Christian Sommerhoff, Dr. Viktoryia Sidarovich, Dr. Göran Wennerberg, Simon Capovilla, Jens Feierler, Maresa Grundhuber, Steffen Kraus, Jasmin Leschner, Christian Mahl, Iris Peröbner, Larisa Ring, Lourdes Ruiz-Heinrich, sowie allen hier nicht genannten Mitarbeitern der Abteilung.

Karola Rügamer-Biese und Evelyn Themel, den guten Seelen unseres Instituts, danke ich sehr für die Unterstützung bei allen bürokratischen Angelegenheiten sowie für die stets fröhliche Stimmung im Sekretariat.

Herzlichster Dank gebührt Daniel Walkowiak, der mit viel Verständnis immer hinter mir stand und mit starker Schulter stets Stabilität gab. Durch seine Geduld und Loyalität hat er zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen.

In tiefer Verbundenheit möchte ich meinen Eltern, Ursula und Werner Popp, danken. Sie haben mir dies alles erst ermöglicht. Sie haben mich gelehrt alle Aufgaben mit Ehrgeiz anzugehen, Herausforderungen anzunehmen, nie aufzugeben und jedoch dabei niemals den Blick für das Leben und seine Mitmenschen zu verlieren.

Ihr habt mir mein Lachen geschenkt und mir durch Eure Liebe den Mut und die Sicherheit gegeben durchs Leben, mit allem was es für einen bereit hält, mit sicherem Tritt zu gehen.

Ich bin aufrichtig dankbar für das starke Band, das uns verbindet!

*Schamlos soll unser Glück sein.
Hemmungslos soll es sich feiern und lieben.
Inmitten all der Friedhofsgesichter und
Packerisgesichter und -gemüter.
Soll es vor Freude glühen und funkeln
wie ein ferner Stern, Wunder wirkend
und zu schön, um wahr zu sein.*

U. Popp

