

Aus der  
Abteilung für Hand-, Plastische und Ästhetische Chirurgie  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Riccardo Giunta

**Bioaktivierung von Hautersatzmaterial zur Verbesserung der  
Lymphangiogenese**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Benedikt Fuchs

aus  
Viersen

Jahr  
2024

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dipl.-Wi.-ing. Thilo Ludwig Schenck

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Iris Helfrich  
Prof. Dr. André Brändli  
PD Dr. Heike Beck

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Nicholas Möllhoff

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract (English)</b> .....	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Chronische Wunden</b> .....	<b>8</b>
1.1.1 Definition.....	8
1.1.2 Epidemiologie .....	8
1.1.3 Sozioökonomische Folgen .....	9
1.1.4 Ätiologie und Pathophysiologie .....	10
<b>1.2 Lymphangiogenese</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 Funktion und Bedeutung des Lymphsystems für die Wundheilung.....	12
1.2.2 Molekulare Mechanismen der Lymphangiogenese .....	13
1.2.3 Einfluss von Hyaluronsäure auf die Lymphangiogenese.....	14
1.2.3.1 Eigenschaften von Hyaluronsäure.....	14
1.2.3.2 HA-Stimulation der Lymphangiogenese .....	15
1.2.3.3 Die Rolle des Rezeptors LYVE-1.....	16
<b>1.3 Therapeutische Ansätze der Lymphangiogenese in der Wundheilung</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4 Transgene Cyanobakterien</b> .....	<b>19</b>
1.4.1 Mikrobielle Hyaluronsäuresynthese.....	19
1.4.2 Konstruktion transgener Cyanobakterien-Stämme.....	20
1.4.3 Optimierung der Biosynthese von Hyaluronsäure .....	21
<b>2 Fragestellung</b> .....	<b>23</b>
<b>3 Material</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Bakterienstämme</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2 Scaffold</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3 Medien</b> .....	<b>24</b>
<b>3.4 Lösungen und Puffer</b> .....	<b>25</b>
<b>3.5 Reagenzien</b> .....	<b>26</b>
<b>3.6 Kits und Assays</b> .....	<b>29</b>
<b>3.7 Antikörper</b> .....	<b>30</b>
<b>3.8 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>30</b>
<b>3.9 Geräte</b> .....	<b>32</b>
<b>3.10 Software</b> .....	<b>34</b>

<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Methoden der Aquakultur</b> .....	<b>35</b>
4.1.1	Kultivierung von <i>Synechococcus sp.</i> PCC 7002 .....	35
4.1.2	Bakterienzählung .....	36
4.1.3	Gewinnung der Bakterienüberstände .....	36
4.1.4	Besiedelung von Hautersatzmaterialien .....	36
4.1.5	Sauerstoff-Messung .....	37
4.1.6	Chlorophyll-Messung .....	38
4.1.7	Quantifizierung der Hyaluronsäure (Hyaluronan Quantikine ELISA-Kit) .....	38
<b>4.2</b>	<b>Zellkultur</b> .....	<b>39</b>
4.2.1	Kultivierung lymphatischer Endothelzellen .....	40
4.2.2	Kultivierung von HaCaT Keratinozyten.....	40
4.2.3	Kultivierung von 3T3 Fibroblasten .....	41
4.2.4	Splitten und Passagieren.....	41
4.2.5	Zellzahlbestimmung.....	42
4.2.6	Kryokonservierung und Auftauen .....	42
4.2.7	Inkubation in Hypoxie .....	43
4.2.8	Kokultivierung der Zellen mit Aquakulturen .....	43
4.2.8.1	Kokultur der LECs mit SynHA.....	45
4.2.8.2	Kokultur der 3T3-Fibroblasten mit SynHA .....	45
4.2.8.3	Kokultur der HaCaT-Keratinozyten mit SynHA.....	45
4.2.9	Stimulation der Zellen mit konditionierten Medien.....	45
<b>4.3</b>	<b>Methoden zur Beurteilung der Zellmorphologie</b> .....	<b>47</b>
4.3.1	AlamarBlue-Assay .....	47
4.3.2	PicoGreen-Assay.....	47
4.3.3	LDH-Assay.....	48
4.3.4	Wachstumskinetik.....	49
4.3.5	Tube-Formation-Assay .....	50
<b>4.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>52</b>
4.4.1	Vorbereitung und Gewinnung der Proben .....	52
4.4.2	RNA-Extraktion .....	52
4.4.3	cDNA-Synthese .....	53
4.4.4	Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR) .....	54
<b>4.5</b>	<b>Immunhistologische Methoden</b> .....	<b>55</b>
4.5.1	Immunfluoreszenz .....	55
4.5.1.1	Immunhistochemische Färbung von LYVE-1 und VEGFR-3.....	55

4.5.1.2	Immunhistochemische Färbung der F-Aktin-Filamente in LECs .....	56
4.5.2	Immunhistologischer Nachweis von Hyaluronsäure (b-HABP-Assay) .....	56
4.5.2.1	Fixierung und Herstellung von Paraffinschnitte .....	56
4.5.2.2	Enzymatische Vorbehandlung .....	57
4.5.2.3	Hyaluronsäurenachweis mit der ABC-Technik .....	58
<b>4.6</b>	<b>Statistische und bioinformatische Methoden .....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
<b>5.1</b>	<b>Adaptation von Cyanobakterien an humane Zellkulturbedingungen.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2</b>	<b>Biokompatibilität von Cyanobakterien und humanen dermalen Zellen <i>in vitro</i>.....</b>	<b>63</b>
5.2.1	Biokompatibilität von 3T3 Fibroblasten mit Syn7002.....	63
5.2.2	Biokompatibilität von HaCaT Keratinozyten mit SynHA .....	66
5.2.3	Biokompatibilität von LECs mit SynHA.....	67
<b>5.3</b>	<b>Photosynthetisch produzierter Sauerstoff der SynHA verbessert die Viabilität dermalen Zellen unter Hypoxie .....</b>	<b>68</b>
5.3.1	Verbesserung der Zellvitalität von LECs durch Kokultivierung mit SynHA unter Hypoxie .....	68
5.3.2	Verbesserung der Zellvitalität von HaCaT Keratinozyten und 3T3 Fibroblasten durch Kokultivierung mit SynHA unter Hypoxie .....	71
<b>5.4</b>	<b>Produzierte Hyaluronsäure der SynHA induzieren die Expression lymphangiogener Gene in LECs .....</b>	<b>72</b>
<b>5.5</b>	<b>Produzierte Hyaluronsäure der SynHA stimulieren Zellviabilität von LECs und Lymphgefäßbildung .....</b>	<b>74</b>
<b>5.6</b>	<b>Photosynthetische bioaktivierte Scaffolds stimulieren Lymphangiogenese <i>in vitro</i> .....</b>	<b>78</b>
5.6.1	Biokompatibilität der SynHA und dermalen Hautersatzmaterialien.....	78
5.6.2	Nachweis der Hyaluronsäureproduktion in Scaffolds .....	80
5.6.3	Stimulierende Effekte der SynHA(+)-Scaffolds auf die Lymphangiogenese .....	81
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>84</b>
<b>6.1</b>	<b>Hintergrund für die Verwendung von <i>Synechococcus sp. PCC 7002</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>6.2</b>	<b>Biokompatibilität von <i>Synechococcus sp. Stamm PCC 7002</i> mit humanen dermalen Zellen .....</b>	<b>86</b>
<b>6.3</b>	<b>Herstellung einer adäquaten Sauerstoffversorgung für dermale Zellen unter hypoxischen Bedingungen.....</b>	<b>87</b>
<b>6.4</b>	<b>Einfluss der bakteriell-synthetisierten Hyaluronsäure auf Gen- und Proteinexpression der LECs.....</b>	<b>88</b>
<b>6.5</b>	<b>Metabolische und morphologische Veränderungen der LECs durch sekretierte Hyaluronsäure.....</b>	<b>90</b>
<b>6.6</b>	<b>Kultivierung transgener Cyanobakterien in kollagenbasiertem Hautersatzmaterial.....</b>	<b>91</b>

6.7	Einfluss bioaktiver Scaffolds auf die Lymphangiogenese unter Hypoxie	92
6.8	Fazit und Ausblick .....	93
7	Veröffentlichungen .....	95
	Literaturverzeichnis .....	96
	Abbildungsverzeichnis .....	110
	Tabellenverzeichnis .....	111
	Abkürzungsverzeichnis .....	112
	Danksagung .....	115
	Affidavit .....	116

## Zusammenfassung

Chronische Wunden stellen ein ungelöstes Gesundheitsproblem in der alternden Weltbevölkerung dar, das mit einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten verbunden ist. Es werden verschiedene Ursachen diskutiert, jedoch sind ischämisch-hypoxische Zustände und überschießende Entzündungen gemeinsame pathologische Merkmale, die die Wiederherstellung von Gewebe behindern und zur Persistenz der inflammatorischen Phase der Wundheilung beitragen. Ziel ist daher die Förderung eines normoxischen, regenerationsfördernden Umfelds und die Reduktion der lokalen Entzündungsreaktion. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei der gestörte Lymphflüssigkeitstransport, der für den Abtransport inflammatorischer Zellen und Zytokine sowie für die lokale Versorgung mit Wachstumsfaktoren und Fibroblasten essenziell ist. Die Wiederherstellung des Lymphtransports könnte somit die Wiederaufnahme des Wundheilungsprozesses ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurden funktionelle Kollagengerüste (Scaffolds) verwendet, die mit transgenen Cyanobakterien des Stammes *Synechococcus sp. PCC 7002* (SynHA) besiedelt wurden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese in der Lage sind, ausreichend Sauerstoff und pro-lymphangiogene Hyaluronsäure (HA) zu produzieren, um verwundetes Gewebe mit pro-regenerativen extrazellulären Matrixmolekülen zu versorgen. Zunächst wurden die Bakterien an humane Zellbedingungen adaptiert und ihre Biokompatibilität mit dermalen Zellen überprüft. Anschließend konnte gezeigt werden, dass der produzierte Sauerstoff bei Kokultivierung mit Cyanobakterien das Überleben und die Proliferation von Lymphendothelzellen (LECs) und weiteren dermalen Zellen unter hypoxischen Bedingungen (<1% O<sub>2</sub>) verbesserte. Zweitens wurde das lymphangiogene Potenzial der von Bakterien sezernierten Hyaluronsäure untersucht. Es ist gelungen eine verstärkte Expression von lymphangiogenen Proteinmarkern in LECs nachzuweisen. Der Einfluss der bakteriellen Hyaluronsäure verdeutlichte sich in einer erhöhten metabolischen Aktivität, sowie der Induktion einer gesteigerten Lymphgefäßbildung. Zudem konnten mittels Immunfluoreszenzfärbung Veränderungen im Zytoskelett der LECs nachgewiesen werden. Drittens folgte die Bioaktivierung von Hautersatzmaterialien durch die Aussaat von SynHA in Materialien zur dermalen Regeneration (DRM), um ein lebensfähiges photosynthetisches Gerüst zu erhalten. Es wurde der produzierte Sauerstoffgehalt und die Konzentration an Hyaluronsäure in SynHA-Gerüsten gemessen. Schließlich konnte gezeigt werden, dass SynHA-Scaffolds in der Lage sind, unter hypoxischen Bedingungen nachhaltig und kontinuierlich Sauerstoff zu produzieren und eine signifikante Sekretion von Hyaluronsäure zu erzeugen, die ausreicht, um die Bildung von Lymphgefäßen *in vitro* zu fördern. Die erzielten Ergebnisse deuten auf eine mögliche Alternative zur Behandlung chronischer Wunden durch ein bioaktiviertes Gerüst auf Grundlage transgener

Cyanobakterien hin, die eine kontinuierliche Zufuhr von Sauerstoff und Regenerationsfaktoren direkt in den Wundbereich ermöglichen.[1]

## Abstract (English)

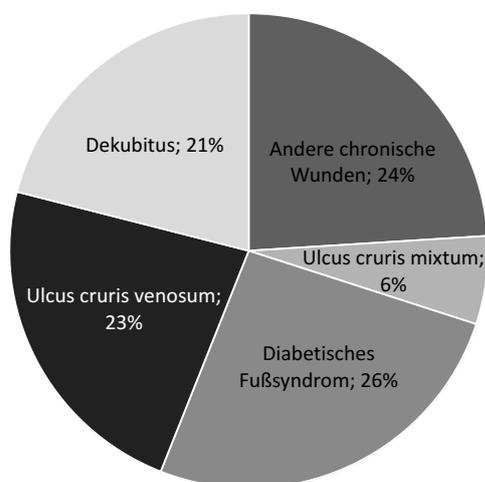
Chronic wounds represent an unsolved health problem in the aging world population, which significantly impairs patients' quality of life. Various causes have been discussed, with ischemic-hypoxic conditions and excessive inflammation being common pathological features hindering tissue restoration, leading to persistence in the inflammatory phase of wound healing. The objective, therefore, is to promote a normoxic, regeneration-supportive environment and expedite the resolution of inflammation. A key player in this context is disrupted lymphatic fluid transport, essential for the removal of inflammatory cells and the transportation of growth factors and fibroblasts. The restoration of lymphatic fluid transport could facilitate the resumption of the wound-healing process. In this study, functional collagen scaffolds were employed and colonized with transgenic *Synechococcus sp. PCC 7002* cyanobacteria (SynHA). The hypothesis posited was that these cyanobacteria could produce sufficient oxygen and prolymphangiogenic hyaluronic acid (HA) to supply wounded tissue with pro-regenerative extracellular matrix molecules, thus promoting wound healing. Initially, the bacteria were adapted to human cell conditions, and their biocompatibility with dermal cells was assessed. Subsequently, it was demonstrated that the oxygen produced during co-cultivation with cyanobacteria enhanced the survival and proliferation of lymphatic endothelial cells (LECs) under hypoxic conditions (<1% O<sub>2</sub>). Secondly, the lymphangiogenic potential of bacterially secreted hyaluronic acid was examined, revealing increased expression of lymphangiogenic protein markers in LECs. The influence of bacterial hyaluronic acid manifested in heightened metabolic activity and the induction of enhanced lymphatic vessel formation. Changes in the cytoskeleton of LECs were also evidenced through immunofluorescence staining. Thirdly, the bioactivation of dermal regeneration materials (DRM) was pursued by seeding SynHA into the materials to obtain a viable photosynthetic framework. The oxygen content and hyaluronic acid concentration in SynHA scaffolds were measured. Ultimately, it was demonstrated that SynHA scaffolds could sustainably and continuously produce oxygen under hypoxic conditions, along with significant hyaluronic acid secretion sufficient to promote lymphatic vessel formation in vitro. The achieved results suggest a potential alternative for treating chronic wounds through a bioactivated framework based on transgenic cyanobacteria, providing a continuous supply of oxygen and regenerative factors directly to the wound site. [1]

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronische Wunden

### 1.1.1 Definition

Hautwunden stellen eine dermale, anatomische und funktionelle Störung dar und werden als chronisch definiert, sofern kein ordnungsgemäßer Heilungsprozess in einem physiologisch angemessenen Zeitraum durchlaufen wird [2]. Im Vergleich zu akuten Wunden fehlt bei chronischen Wunden der zeitnahe Reparaturprozess zur Wiederherstellung der anatomischen und funktionellen Integrität [3]. Allerdings konnte bislang keine kohärente systematische Klassifikation für chronische Wunden durch den Mangel an Konsens für Chronizität und eines definierten Zeitrahmens für einen adäquaten Heilungsprozess etabliert werden [4]. Die Indikation chronischer Wunden umfasst ein großes Spektrum unterschiedlicher Krankheitsbilder, deren Verteilung in Abb. 1 dargestellt ist [5].



**Abbildung 1: Gesundheitsökonomische Analyse; Verteilung der Indikationen bei chronischen Wunden (Quelle: [5] - teilweise modifiziert).**

Die Literaturanalyse (n=492 Arbeiten) zeigt eine gleichmäßige Verteilung der Manifestation chronischer Wunden. Am häufigsten manifestieren sich chronische Wunden als diabetisches Fußsyndrom (26 %), gefolgt von anderen chronischen Wunden (24 %), sowie dem Ulcus cruris venosum (23 %) und dem Dekubitus (21 %).

### 1.1.2 Epidemiologie

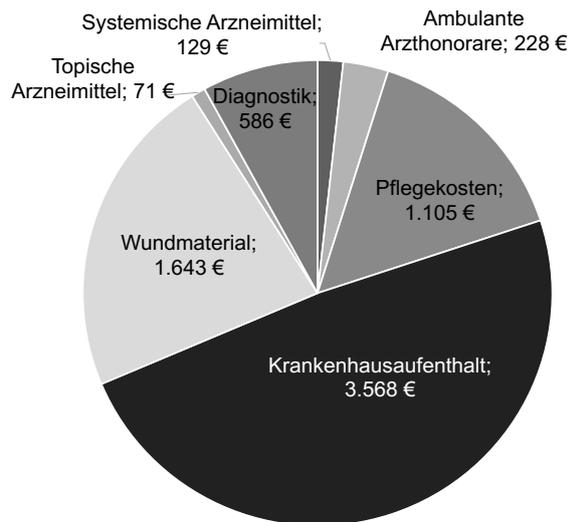
Allgemein werden circa 1-2 % der Bevölkerung in ihrem Leben von einem chronischen Wunddefekt betroffen sein [6]. In den Industrieländern leiden durchschnittlich 2,21 von 1000 Einwohnern an chronischen Wunden [4]. Im Zeitraum von 2005 bis 2015 hat die globale Prävalenz von 492.883.000 auf 605.036.000 deutlich zugenommen [7]. Auch in Deutschland zeigt sich eine jährlich zunehmende Häufung chronischer Wunden. Eine Wunddiagnose wurde

im Jahr 2012 bei 1,04 % der Bevölkerung in Deutschland angezeigt, dabei handelte es sich mit einer Prävalenz von 786.407 Fällen und einer Inzidenz von 196.602 Fällen um rein chronische Wunden [8]. Im Jahr 2012 waren zudem 61 % Frauen und 39 % Männer betroffen. Aufgrund fehlender einheitlicher Messmethoden und Definitionen sind chronische Wunden jedoch ein unterberichtetes Gesundheitsproblem [4, 9, 10]. Viele Wunden werden statistisch nicht erfasst, da sie in der Kategorie „sonstige Haut- und Unterhautkrankheiten“ aufgenommen werden, die laut einer Studie von Global Burden of Disease (GBM) 2010 und 2013 weltweit die vierthäufigste nicht tödlich verlaufende Ursache für Behinderungen darstellt [11, 12]. Zudem werden Wunden häufig als Komplikation typischer Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus und Adipositas gewertet, was zu einer Überschattung der Bedeutung für das Gesundheitssystem führt [10]. In den USA wurde mit durchschnittlich 6,5 Millionen Betroffenen an chronischen Hautulzera von einer „stillen Epidemie“ berichtet [10, 13]. Chronische Wunddefekte verursachen somit im globalen Kontext eine große Herausforderung mit zunehmender Inzidenz.

### 1.1.3 Sozioökonomische Folgen

Chronische Wunden haben erhebliche sozioökonomische Auswirkungen auf den Staat und die Gesellschaft. Die regelmäßige Wundpflege, Krankenhausaufenthalte und der Verbrauch von Verbandsmaterial zur Versorgung von Wunden verursachen, wie in Abb. 2 veranschaulicht, hohe direkte und indirekte Kosten für das Gesundheitswesen [14]. Wesentliche Kostenfaktoren sind unter anderem die topische Anwendung von Wundtherapeutika mit 1.643 € und die ambulante Pflege mit 1.105 € [5]. Die höchsten Kosten entstehen dabei durch stationäre Krankenhausbehandlungen, die in Deutschland durchschnittlich 3.568 € pro Fall betragen. Im internationalen Vergleich können die Kosten beispielsweise in den USA mit 12-16.000 US\$ deutlich höher ausfallen [5, 14]. Die Behandlung eines einzelnen diabetischen Ulkus wird in den USA auf 50.000 US\$ beziffert [15]. Insgesamt betragen die jährlichen Behandlungskosten chronischer Hautdefekte alleine in den USA 25 Milliarden US\$ [10]. Auch in Europa sind steigende Ausgaben für den Gesundheitssektor zu beobachten. In skandinavischen Ländern fallen rund 2-4 % aller Gesundheitsausgaben auf Therapien von chronischen Hautulzera [16]. 2027 werden die globalen Ausgaben alleine für die Wundpflegeprodukte auf rund 18,7 Milliarden US\$ geschätzt. [10, 17]. Zusätzlich zu einem erhöhten Ressourcenverbrauch zeigt sich, dass die Kosten für die Patientenversorgung von nicht adäquat heilenden Wunden um bis zu 135 % höher sein können als bei regulär heilenden Wunden [18]. Neben den ökonomischen Kosten gehen chronische Wunden auch mit hohen immateriellen Kosten einher [5]. Dabei erleben Patienten Einbußen in ihrer Lebensqualität vor allem durch den Verlust von Mobilität, unangenehme Gerüche, Exsudate aus der Wunde

sowie starken Schmerzen. Bei protrahierten Krankheitsverläufen lässt sich eine deutliche psychische Belastung durch Verlust von Autonomie sowie Angst vor weiterer Krankheitsprogression nachweisen [5]. Insgesamt entstehen durch chronische Hautdefekte neben körperlichen, psychischen und sozialen Belastungen der Patienten hohe Kosten für die Gesellschaft und das Gesundheitssystem.



**Abbildung 2: Kostenverteilung in der Versorgung chronischer Wunden nach Kostengruppen (Quelle: [5] - teilweise modifiziert).**

Die Literaturanalyse der größten Kostenfaktoren der Behandlung chronischer Wunden (n=562 Patienten) zeigt ein Überwiegen der Krankenhausaufenthalte mit 3.568 €. Weitere Ausgaben entstehen durch Wundmaterial (1.643 €), Pflegekosten (1.105 €), Diagnostik (586 €), ambulante Arzthonorare (228 €), sowie topische (71 €) und systemische Arzneimittel (129 €).

### 1.1.4 Ätiologie und Pathophysiologie

Ursachen für chronische Wunden sind vielfältig [3, 19]. Eine Assoziation mit zunehmendem Alter und komorbiden Zuständen wie Diabetes mellitus, Adipositas, Neuropathien und Herz-Kreislauf-Erkrankungen zeigt sich in über 80 % der Fälle [10]. Pathophysiologisch stellen chronische Wunden eine Verzögerung einer oder mehrerer Phasen des Wundheilungsprozesses dar. Der Wundheilungsprozess ist vor allem in der inflammatorischen Phase eingeschlossen, sodass sich die eigentlich selbstlimitierende Entzündung zu einem selbsterhaltenden Zustand entwickelt. Hintergrund ist eine autokrine Synthese proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  [20], multipliziert durch Faktoren wie bakterieller Besiedelung, Nekrose, Exsudat, Seneszenz, Gewebhypoxie und Ischämie-Reperfusionverletzungen [21].

Vor allem die Gewebhypoxie spielt eine wesentliche Rolle. In chronischen Wunden konnte ein Sauerstoffgehalt von nur 5-20 mmHg (pO<sub>2</sub>), im Vergleich zu Kontrollgewebe mit 30-50 mmHg (pO<sub>2</sub>), nachgewiesen werden [22]. Hypoxische Wundbedingungen gehen mit einem erhöhten Infektionsrisiko einher. Studien zeigen eine inverse Korrelation zwischen Infektion und Wundoxygenierung [19, 23-26]. Dabei spielt die sauerstoffabhängige Aktivierung

antimikrobieller Enzyme (Myeloperoxidasen) [19] und der Bedarf an über 25 mmHg ( $pO_2$ ) zur Entstehung von Superoxiden zur Bakterientötung [27] eine wesentliche Rolle. Das deutlich erhöhte Infektionsrisiko bei bereits moderat reduziertem Sauerstoffgehalt im Gewebe lässt sich auch auf den Verlust der antibakteriellen Wirkung von Neutrophilen bei einem Sauerstoffpartialdruck unter 40 mmHg ( $pO_2$ ) zurückführen [27, 28]. Sauerstoff ist als Mediator der Wundheilung an verschiedenen Prozessen beteiligt und spielt eine wesentliche Rolle in der Reepithelialisierung, Proliferation von Fibroblasten und Kollagensynthese [19, 29]. Eine aktive Zellteilung von Fibroblasten kann laut Studien nur bei  $pO_2$  von über 15 mmHg beobachtet werden [30]. Ein niedriger Sauerstoffpartialdruck beeinträchtigt die Bindungsaffinität von Wachstumsfaktoren an dermale Fibroblasten mit resultierender Reduktion der Kollagensynthese [31, 32]. Die stimulierenden Faktoren EGF und TGF- $\beta$ 1 zeigen unter Hypoxie (2 %  $pO_2$ ) im Vergleich zu normoxischen Bedingungen (20 %  $pO_2$ ) eine um 62 % reduzierte Rezeptoraffinität sowie eine um circa ein Drittel reduzierte Anzahl an Bindungsstellen [31, 33]. Zudem ist die Genexpression für  $\alpha$ 1-Prokollagen und der mRNA-Spiegel für TGF- $\beta$ 1-Typ2-Rezeptoren um das 10-Fache vermindert [33].

Hypoxie beeinträchtigt unter anderem die ATP-Synthese durch eine verminderte mitochondriale oxidative Phosphorylierung. Folglich führen eine Funktionsreduktion der ATP-abhängigen Membranproteine zu einem instabilen Transmembranpotential mit resultierender Zellschwellung und Apoptose [34]. Außerdem potenziert ein Mangel an Sauerstoff die Entzündungsreaktion, durch eine verstärkte Expression vaskulärer endothelialer Leukozytenadhäsionsmoleküle (LFA 1 und 4) [20, 35]. Dies führt zur Extravasation und Invasion von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, mit einer daraus resultierenden Amplifikation an ROS, Proteasen und Zytokinen [29]. Die sauerstoffabhängige Produktion protektiver Antioxidantien, wie Stickstoffmonoxid (NO), ist bei Hypoxie deutlich vermindert [36], sodass die Entzündung durch eine fehlende Downregulation von inflammatorischen Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B) nicht reguliert werden kann [37]. Die Reduktion von NO hat zudem eine Vasokonstriktion zur Folge, was zu einem sogenannten „No-Reflow-Phänomen“ führt und damit die Hypoxie verstärkt [24]. Nahezu alle Entgiftungsmechanismen sind sauerstoffabhängig und durch Hypoxie betroffen. Eine schlechte Sauerstoffversorgung der Wunde könnte demnach sogar als Parameter zur Vorhersage chronischer Wundheilungskomplikationen und als diagnostisches Kriterium für die Wundbehandlung dienen [10, 11].

Durch diese additiven pathogenen Faktoren werden zahlreiche Entzündungszellen in das Wundgebiet rekrutiert [24, 31] und resultieren in einer übermäßigen Entzündungsreaktion. Die überschießende zelluläre Immunantwort dominieren Leukozyten, einschließlich Neutrophile und Makrophagen, die mit der Überproduktion von ROS, Serinproteasen (Elastase, Cathepsin) [38] und Matrix-Metalloproteinasen (MMP -2, -3, -8, -9 und -13) eine Gewebedegeneration

initiieren [38-41]. Die Autoren beschreiben gleichzeitig einen deutlichen Mangel an Wachstumsfaktoren im Wundexsudat. Physiologisch werden die Proteasen durch  $\alpha$ 1-Antiproteinase und  $\alpha$ 2-Makroglobulin gehemmt. Durch den Mangel an Inhibitoren entsteht eine Dysbalance zu den entzündungsfördernden Zytokinen, Chemokinen und Proteasen [19]. Dies resultiert in einem übermäßigen Abbau von Wachstumsfaktoren (TGF, PDGF) und Komponenten der extrazellulären Matrix (Fibronectin, Vitronectin, Kollagen), was sich wiederum negativ auf die Zellmigration und Proliferation gesunder Zellen auswirkt [42]. Ein fehlender Abtransport von entstehenden Abbauprodukten über das Lymphsystem fördert die Entzündung zusätzlich [43]. Diese feindliche Mikroumgebung macht einen Übergang in eine proliferative Heilungsphase und Geweberegeneration unmöglich.

## 1.2 Lymphangiogenese

### 1.2.1 Funktion und Bedeutung des Lymphsystems für die Wundheilung

Insgesamt entstehen täglich durch hydrostatischen und kolloidosmotischen Druck in Gefäßen 20 L interstitielle Flüssigkeit, die zu 90 % direkt über die Venen resorbiert wird [44-46]. Die verbleibenden 10 % werden als Lymphflüssigkeit (2-3L) über die Lymphkapillaren aufgenommen [45, 47]. Abgesehen von der Regulierung der Homöostase und Flüssigkeitsdrainage übernimmt das Lymphsystem eine bedeutende Funktion in der Aufnahme und dem Transport von großen Makromolekülen, Matrixproteinen sowie Fremdkörpern, bedingt durch die hohe Permeabilität der Kapillaren [45, 48]. Dabei spielt die lokale Entfernung von Phagozyten und entzündungsfördernden Rückständen aus dem Wundgebiet über das Lymphsystem eine entscheidende Rolle für die Regulation der Inflammation und Geweberegeneration [49, 50]. Saaristo et al. haben beispielsweise die Wundheilung bei diabetischen Mäusen durch gentherapeutische Ansätze zur Steigerung der Lymphangiogenese signifikant verbessert [51]. Viele Studien bestätigen, dass die anhaltende Entzündungsreaktion eine koordinierte Heilung verhindert und mit Rezidiven und mangelhaften funktionellen und anatomischen Zuständen der Haut einhergehen [52, 53]. Andererseits ist das lymphatische Netzwerk das primäre anatomische Kompartiment des adaptiven Immunsystems. Funktionelle Bedeutung in der Infektabwehr gewinnen Lymphgefäße durch den Transit von antigenpräsentierender dendritischer Zellen zu den Lymphknoten und der Induktion einer Immunantwort [45]. Die Lymphe dient somit als Transportmedium für wichtige Immunzellen. Besonders reich an lymphatischen Gefäßen sind daher Organe mit hohem Kontakt zu fremden Antigenen, wie der Haut und der intestinalen Mukosa. Ausgenommen sind bei der Ausprägung eines Lymphsystems allerdings das Knochenmark, das zentrale Nervensystem und verschiedene avaskuläre Strukturen [44].

Zahlreiche Studien belegen eine Reduktion funktioneller entzündungsbedingter Störungen durch die Förderung des Lymphgefäßwachstums. Die Applikation pro-lymphangiogener Faktoren [54] oder lymphatisch aktivierter Transplantate [55, 56] führt zur Begrenzung akuter Entzündung der Haut, Vermeidung von Ödemen und zur Reduktion des Entzündungsausmaßes. In Anbetracht der vorteilhaften Wirkungen stellt die Wiederherstellung eines lymphatischen Netzwerkes bei Entzündungen einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Förderung des Wundheilungsprozesses dar [54, 57].

## 1.2.2 Molekulare Mechanismen der Lymphangiogenese

Lymphangiogenese beschreibt die Neubildung von Lymphgefäßen durch Keimung und Verzweigung aus bestehenden Strukturen [58, 59]. Dieser Prozess tritt physiologisch bei der Entwicklung des embryonalen Lymphsystems auf [60]. Darüber hinaus spielt die Lymphangiogenese bei der Tumormetastasierung, bei Infektionen sowie Gewebeerletzungen zur Regeneration von Lymphgefäßen und während der Wundheilung eine entscheidende Rolle [44, 59-63]. Dabei durchläuft die Entwicklung von lymphatischen Gefäßen eine komplizierte Kaskade, die bisher noch wenig erforscht ist. Zunehmend steht die Lymphangiogenese im Fokus der Wissenschaft mit dem Ziel spezifischer Marker für Lymphendothelzellen (LEC) zu finden sowie den molekularen Mechanismus und seine stimulierenden und hemmenden Faktoren zu verstehen. Viele Studien unterstützen die Hypothese, dass lymphatische Endothelzellen einer Subpopulation veränderter venöser Endothelzellen entstammen [64-66]. Während der Embryogenese kann eine Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor-3 (VEGFR-3) [59, 67] auf allen frühen Endothelzellen beobachtet werden. Daneben lassen sich bestimmte lymphatische Endothelzellen durch eine zusätzliche Hochregulation von endothelialelem Hyaluranrezeptor LYVE-1 [68, 69], der als der spezifischste lymphatische endotheliale Marker gilt, abgrenzen. Dem Rezeptor wurde die Funktion zur Induktion der Lymphangiogenese durch Hyaluronsäure (siehe Kapitel 1.3.4), sowie die Regulation des Eintritts von Leukozyten in die Lymphkapillaren nachgewiesen. Bisher bleibt der präzise molekulare Mechanismus unklar.

Ein bisher gut erforschter Prozess, der die Lymphangiogenese in Gang setzt, erfolgt über die Gruppe der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF-C, -D), den Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGF-2) und Angiopoietin (Ang -1, -2). Zur Realisierung dieses Prozesses exprimieren lymphendotheliale Zellen (LEC) den Transkriptionsfaktor SRY-Box 18 (SOX18) [70], welcher wiederum Prospero homeobox Protein 1 (PROX1) beeinflusst [65, 71]. PROX1 kommt dabei eine entscheidende Rolle zu, da es einerseits die Unterdrückung der Genexpression für Blutgefäße, andererseits die Regulation der Expression LEC spezifischer

Gene initiiert [59, 68]. Der Endothelmarker VEGFR-3 geht auf Endotheloberflächen von Blutgefäßen wieder verloren, mit Ausnahme von gefensterem Endothel in endokrinen Organen. Daher ist er postpartal spezifisch für lymphatische Zellen [44, 72]. Der nächste Schritt in der Kaskade ist die Expression von Neuropilin-2, welches die Empfindlichkeit der Lymphzellen auf exogene Reize verstärkt [67]. Die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren C und D (VEGF-C/-D) fördern durch Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase 3 (VEGFR-3) das Aussprossen der LEC aus venösen Gefäßen und die Bildung primärer Lymphsäcke [44, 61, 67]. Sie entstehen aus Vorläuferproteinen durch Proproteinkonvertasen sowie einer proteolytischen Spaltung und stimulieren zudem die Proliferation, Migration und das Überleben der Endothelzellen [44]. Zu den Wachstumsfaktoren der Lymphangiogenese zählen neben den bereits genannten VEGF-C und D, auch FGF-2, IGF-1 und 2, HGF, ET-1, PDGF- $\beta$  [59, 67]. Die Regulation einer überschießende Stimulation kann durch Inhibitoren wie TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  erfolgen [44]. Nach der Bildung eigenständiger Lymphgefäße wird das venöse Blutgefäßsystem vom Lymphsystem durch die Bildung einer thrombotischen Separationszone getrennt [44]. Die Expression von Podoplanin, einem membranständigen Glykoprotein [73, 74], aktiviert den C-Typ-Lectin-like-Rezeptor-2 (CLEC-2 Rezeptor) auf Thrombozyten [75] und initiiert über die Phosphorylierung des Adapterproteins Slp76 durch die Tyrosinkinase SYK eine Akkumulation von Leukozyten und Aggregation der Blutplättchen [76]. Es folgt eine weitere Differenzierung der Gefäße zu Lymphkapillaren und Sammelgefäßen. Zusammenfassend dienen LYVE-1, PROX1, VEGFR-3 sowie Podoplanin als spezifische Marker zur Identifizierung lymphatischer Endothelzellen. Auf diese Weise können sie auf molekularer Ebene von vaskulären Gefäßen unterschieden werden.

### **1.2.3 Einfluss von Hyaluronsäure auf die Lymphangiogenese**

#### **1.2.3.1 Eigenschaften von Hyaluronsäure**

Der Prozess der Lymphangiogenese kann neben den bereits genannten Wachstumsfaktoren auch durch Hyaluronsäure (HA) induziert werden. Hyaluronsäure (HA) ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix [60] mit dem häufigsten Vorkommen in der Haut, was 50 % der gesamten körperlichen Hyaluronsäure ausmacht [77, 78]. Das lineare negativ geladene Biopolymer ist ein nicht-sulfatiertes Glykosaminoglykan, bestehend aus alternierenden Disaccherideinheiten von (1,4) D-Glucuronsäure  $\beta$ -(1,3) N-Acetylglucosamin [60, 79, 80]. Viele Studien enträtselten in den letzten Jahren die Rolle und Funktionen von HA und verweisen auf eine Korrelation erhöhter HA-Spiegel und Malignität von Tumoren. Die Tumorprogression sei einer Steigerung der Zellmotilität [81], des Zellwachstums, der Angiogenese [82] und

Lymphangiogenese [83] zuzuschreiben [84]. Zu den physiologischen Funktionen von HA zählt neben dem Schmieren von Gelenken, der Hydratation des Epithels auch die Bildung eines Gerüsts zur Zellmigration [85, 86]. Es spielt eine wichtige Rolle bei Gewebeverletzungen und der Wundheilung durch Induktion der Angiogenese [87, 88], Aktivierung von Entzündungszellen [89-91] und Förderung der Fibroblasten Migration [92, 93]. Physiologisch wird Hyaluronsäure intrazellulär durch HA-Synthetasen (HAS) an der Innenseite der Plasmamembran synthetisiert und über Poren in die extrazelluläre Matrix extrudiert [94, 95]. Es werden drei verschiedene Typen HAS-1, -2, und -3 unterschieden, die verschiedenen Längen von Hyaluronsäure synthetisieren. Die Halbwertszeit (HWZ) variiert je nach Gewebe und inflammatorischem Zustand und kann im Blutplasma 3-5 min, in der Haut unter einem Tag und im Knorpel bis zu 3 Wochen andauern [96, 97]. Der Abbau erfolgt mittels sechs verschiedener Subtypen der Hyaluronidasen (HYAL), welche durch Hydrolyse der  $\beta$  (1-4) Bindung zwischen N-Acetyl-D-Glucosamin und D-Glucuronsäure kurze HA-Fragmente mit 20 kDa Gewicht erzeugen [98].

### **1.2.3.2 HA-Stimulation der Lymphangiogenese**

Studien zeigen einen signifikanten Einfluss von HA auf die Regulation der Lymphangiogenese [60]. Bereits nach 24 Stunden Stimulation mit HA bei einer optimalen Konzentration von 1-10  $\mu\text{g/ml}$  zeigen lymphendotheliale Zellen in vitro einen 2- bis 7-fachen Anstieg der Proliferation, der Migration und der Bildung eines röhrenförmigen Netzwerkes (Tube Formation) [58, 60]. Diese Formationsveränderung der Zellen zur Ausbildung lymphatischer Röhren setzt eine ausreichende Beweglichkeit und Motilität voraus. Hierfür konnten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts mit rosettenartigen Strukturen, Ausläufern der Zellmembran und einer Intensivierung der F-Aktin-Stressfasern nach Stimulation mit HA beobachtet werden [60]. Auch ex vitro wird durch HA-Stimulation das Lymphgefäßwachstum und die LYVE-1-Genexpression gefördert. Die biologische Aktivität der LECs ist dabei entscheidend von dem molekularen Gewicht der HA abhängig [86]. Eine erste Studie von Wu et al. [60] zu dieser Hypothese zeigte, dass hochmolekulare Hyaluronsäure (HMW-HA) mit einem Gewicht von  $>1000$  kDa, die vor allem im intakten Gewebe exprimiert wird, antiangiogene, immunsuppressive Eigenschaften und keine Auswirkung auf die Lymphangiogenese hat [99]. Im Gegensatz dazu hat Hyaluronsäure mit einem niedrigen Molekulargewicht (LMW-HA) mit einer Länge von circa 3-16 Disaccharid-Polymeren proinflammatorische und pro-lymphogene Eigenschaften [60, 89, 100-102]. Dieses Phänomen der zweigeteilten Wirkung von HA wurde in mehreren Studien bestätigt und konnte auch an den CD44 Rezeptoren in Blutgefäßen beobachtet werden [58, 103]. Kurzkettige HA-Fragmente mit geringem molekularem Gewicht werden entweder de novo synthetisiert [104] oder entstehen durch den Abbau langkettiger HA mittels Hyaluronidasen, welche vermehrt in der EZM von entzündlichem Gewebe exprimiert werden

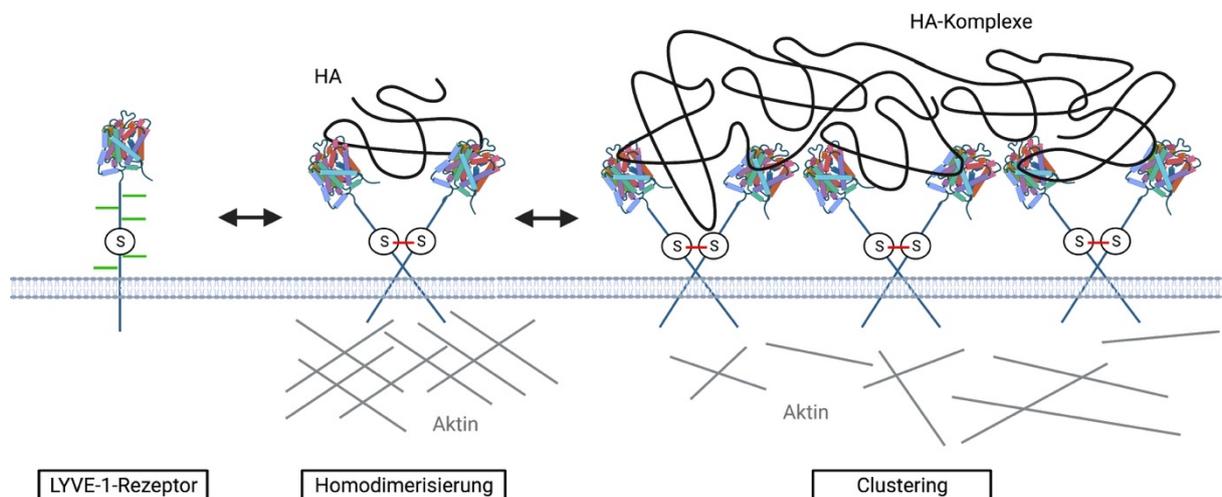
[60, 105]. Verschiedene Studien beschreiben die Beteiligung von Hyaluronidasen an inflammatorischen Prozessen, so zeigt Monzon et al. [106] eine erhöhte Expression von Hyaluronidasen im Epithel der Atemwege bei asthmatischen Patienten. Somit unterliegt HA während Entzündungen einer kurzen Halbwertszeit und erfährt einen schnellen Umsatz in kurze niedrigmolekulare HA-Fragmente [50, 96, 105]. Durch die Veränderung der molekularen Größe von HA und den resultierenden unterschiedlichen Eigenschaften kann eine Regulation der Inflammation vorgenommen werden [103].

### **1.2.3.3 Die Rolle des Rezeptors LYVE-1**

Neue Studien belegen, dass der Effekt der Induktion der Lymphangiogenese durch die Bindung von Hyaluronsäure an den endothelialen Hyaluronrezeptor LYVE-1 vermittelt wird [107-109]. Wu et al. [60] zeigte erstmals durch eine Inhibierung von LYVE-1 mit mAbs oder siRNA eine Störung der HA induzierten Lymphangiogenese. Die genaue intrazelluläre Signalkaskade ist noch nicht vollständig aufgeklärt und Teil aktueller Forschung [58, 110]. Bisher konnte kein Hinweis auf eine katalytische Aktivität oder Phosphorylierung des intrazellulären Rezeptoranteils gefunden werden [107, 109]. Daher wird spekuliert, dass eine Rekrutierung der Kinaseaktivität bereits genannter Wachstumsfaktor-Rezeptoren stattfindet. Es wird eine Assoziation von LYVE-1 mit den Rezeptoren für VEGF und PDGF angenommen, die zur Aktivierung verschiedener Tyrosinkinasen (MAP, Erk, PI3K, Src) führen sollte [58]. Die Bindung von Hyaluronsäure auf der Zelloberfläche erfolgt über verschiedene spezifische Rezeptoren.

Der integrale lymphendotheliale Rezeptor LYVE-1 ist dabei auf das Lymphsystem beschränkt und wird sowohl luminal als auch basolateral, vor allem auf Lymphkapillaren exprimiert [58, 109]. Er fungiert als einziger Docking-Rezeptor für HA-Liganden zur Induktion der Lymphangiogenese. Der dem LYVE-1 Rezeptor zu 44 % homologe Rezeptor CD44 sowie der RHAMM Rezeptor sind ausschließlich auf vaskulären, mesenchymalen und hämatopoetischen Zelllinien verbreitet, jedoch nicht auf lymphatischen Zellen [58, 107, 111]. Der genaue Aufbau und die Eigenschaften des LYVE-1 Rezeptors wurden erst in den letzten Jahren durch Banerji et al. [112, 113] beschrieben und ist in Abbildung 3 dargestellt. Bisher haben Studien eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege nur durch niedrigmolekulare, nicht aber durch hochmolekulare HA belegt. Dennoch haben auch große HA-Moleküle eine Wirkung auf das lymphatische System, wie beispielsweise die Leukozytenmigration. Jackson et al. [58] beschreibt die Bindung von LYVE-1 an eine Matrix aus hochmolekularer HA-Glykokalyx ( $2 \times 10^3$  kDa) auf der Oberfläche von Leukozyten [114]. Diese Wechselwirkung ermöglicht Adhäsion und Migration in das Lymphgefäß, wodurch Leukozyten aus dem Entzündungsgebiet transportiert werden können [115]. Für die Bindung von großen

Hyaluronsäure Molekülen lagern sich die LYVE-1 Rezeptoren zu sogenannten „Clustern“ zusammen, um eine größere Bindungsfläche auf den LECs zu schaffen [50, 112]. Hierfür sind intrazelluläre Veränderungen und ein Abbau von F-Aktin-Fasern notwendig, um ausreichend Mobilität der Rezeptoren zu ermöglichen. Stanley et al. [110] haben durch die Wirkung von Hyaluronsäure auf LECs eine Depolymerisierung durch Abnahme der Filamentlänge, Verzweigungen und Netzwerkgröße des Aktin-Zytoskeletts entdeckt. LYVE-1 kann somit durch Bildung von Clustern zwischen hoch- und niedermolekularer Hyaluronsäure unterscheiden und unterschiedliche Effekte erzeugen [58].



**Abbildung 3: Aufbau und Eigenschaften des Rezeptors LYVE-1 (Quelle: [58] - teilweise modifiziert mit Biorender)**

Der Aufbau des LYVE-1 Rezeptors besteht aus einer polaren HA-Bindungsdomäne (farbig) und einer glykosylierten Stielregion (grün) mit einem ungepaarten Cystein (S). Die Bindung von Hyaluronsäure erfolgt über schwache elektrostatische Wechselwirkungen. Das Cystein ermöglicht eine Dimerisierung, zu der Konformation einer offenen Schere, deren Scharnier durch eine intermolekulare Disulfidbrücke gebildet wird [112]. Die Avidität zu HA wird durch die Anordnung in Homodimere um das 15-Fache erhöht [112]. Durch Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts (grau) wird eine Umlagerung der LYVE-Rezeptoren zu „Clustern“ ermöglicht, sodass auch Wechselwirkungen mit großen HA-Komplexen aufgebaut werden können.

### 1.3 Therapeutische Ansätze der Lymphangiogenese in der Wundheilung

Chronische Wunden stellen Therapeuten bis heute vor eine große Herausforderung und erfordern durch ihre Komplexität einen multidisziplinären Ansatz [116]. Herkömmliche topische Standardtherapeutika, wie Schaumverbände, Hydrokolloide und Alginat sind essenziell, haben meist keine ausreichende Wirkung und erfordern zusätzliche Optionen [116]. Der Therapieerfolg wird durch eine inhärente hypoxische Umgebung und metabolischen und proliferativen Anforderungen eines sich regenerierenden Gewebes limitiert. Das

therapeutische Ziel und Schlüsselrolle zugleich besteht darin, sowohl der Entzündung entgegenzuwirken als auch ein wachstumsfreundliches zelluläres Milieu zu erzeugen [116]. Die topische hyperbare Sauerstofftherapie (HBOT) stellt einen möglichen Therapieansatz dar, Gewebeoxygenierung zu verbessern [117]. Seit 2 Jahrzehnten wird sie als vorteilhaft für die chronische Wundbehandlung postuliert, allerdings mit moderater Evidenz. Lange Zeit fehlten ausreichend Belege durch formale Studien [118-120], jedoch deuten neueste Studien darauf hin, dass eine positive Wirkung auf die chronische Wundheilung besteht [121, 122]. Zur Bereitstellung einer proliferativen Zellumgebung gibt es die Möglichkeit der topischen Applikation biotechnologischer Cremes und Sprays mit rekombinanten Wachstumsfaktoren PDGF, EGF und FGF [116]. Die Anwendung ist allerdings nur von kurzer Dauer und zeigt im Beispiel von Repifermin® (FGF-10) keinen signifikanten Effekt gegenüber einer Kontrollgruppe [116, 123]. Der Goldstandard zur Behandlung transmuraler Hautdefekte stellen aktuell autologe Hauttransplantate dar [124]. Nachteilig sind hier jedoch die begrenzte Verfügbarkeit sowie die Morbidität an der Spenderstelle. Neue Versuche mit Xenografts und Allografts zeigen vielversprechende Ansätze, gehen jedoch häufig mit einer starken Immunreaktion und einem hohen Infektionsrisiko einher [124, 125].

Daher gewinnt das Tissue Engineering mit der Entwicklung von biologischen 3D-Gerüsten zur mechanischen Unterstützung der Gefäßinvasion sowie der Migration und Proliferation von Zellen in der Geweberegeneration zunehmend an Bedeutung [125, 126]. Rahmani Del Bakhshayesh et al. [125] haben hierzu die Verwendung verschiedener Biomaterialien wie Kollagen und Fibrin verglichen. Fibrin zeigt großes Potential in der Wundheilung und Geweberegeneration. Das durch Fibrinogen und Thrombin induzierte Fibrin-Hydrogel bildet ein biologisches Gerüst für Stamm- und Primärzellen [127]. Auch Kollagen hat sich mit einer hohen Biokompatibilität und mechanischen Festigkeit sowie geringer Antigenität als wirksamer und sicherer Hautersatz bewährt [125]. Durch die Kombination von Hai-Glykosaminoglykanen mit Chondroitin-6-sulfat auf Rinderkollagenbasis wurde das azelluläre Hautersatzmaterial Integra® entwickelt und zum häufigsten verwendeten Biopolymer [128, 129]. Die zusätzliche temporäre epidermale semipermeable Silikonschicht soll dabei die Austrocknung der Wunde vermeiden [129]. Bei der Anwendung von Integra® bei akuten Verbrennungswunden ist laut Chang et al. [129] zunächst eine deutliche Schwellung und bereits nach 2-4 Wochen eine ausreichende Vaskularisation festgestellt worden. Wong et al. [130] bestätigt den Nachweis von Lymphendothelzellen bereits nach 14 Tagen in einem gesunden Wundbett. Chronische Wunden werden hingegen von einer lymphatischen Dysfunktion begleitet, die eine Weichteilschwellung, Beeinträchtigung der Immunantwort, Flüssigkeitsansammlungen sowie Ödeme zur Folge hat [57, 116, 131, 132].

Für chronische Wunden entwickelt sich somit ein Bedarf an weiterentwickelten Wundaufgaben, die an die Physiologie der Wundheilung und der Chronizität angepasst sind [124]. Vor allem

durch die Wiederherstellung des Lymphtransports kann die Wirkung und Effizienz von Hautersatzmaterialien deutlich verbessert werden. Gegenwärtig sind die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung lymphatisch bedingter Krankheiten begrenzt [57]. Mit der Entwicklung von Hautersatztransplantaten mit einem in vitro vorgeformten Gefäßplexus aus Lymph- und Blutgefäßen zur Implantation bei Ratten, hat Marino et al. [53] eine mögliche Option zur Unterstützung der Flüssigkeitsdrainage und Begrenzung der Entzündung vorgestellt. Auch in weiteren Studien hat sich die Anwendung dermalen Regenerationsmaterialien (DRM) in Kombination mit therapeutisch aktiven gen-, protein- oder zellbasierten Ansätzen, wie beispielsweise Fibrin-gebundenes VEGF-C [131], zur Verbesserung der Lymphangiogenese als möglicher therapeutischer Ansatz erwiesen. Aus diesem Grund liegt der Fokus in der vorliegenden Arbeit auf der Verbesserung des Lymphgefäßabflusses als Schlüssel zur chronischen Wundheilung.

## 1.4 Transgene Cyanobakterien

### 1.4.1 Mikrobielle Hyaluronsäuresynthese

Die hydratisierenden und viskoelastischen Eigenschaften ohne toxische Zusatzwirkungen machen Hyaluronsäure zu einem zunehmend gefragten kosmetischen und biomedizinischen Produkt. Der Markt für Hyaluronsäure wurde 2016 von Grand View Research Inc. mit 7,2 Mrd. USD bewertet und wird 2027 auf 16,6 Mrd. USD geschätzt [133]. Herkömmlich wird Hyaluronsäure aus dem Gewebe von Wirbeltieren oder von Bakterien mit einer schützenden Polysaccharid-Kapsel extrahiert [134, 135]. Dabei ist die größte Herausforderung die Integrität des Makromoleküls bei der Zersetzung durch tierische oder bakterielle Hyaluronidasen zu erhalten. Für die mikrobielle Synthese haben sich bisher geschwächte *Streptokokken*-Stämme der Gruppe A, B und C geeignet, jedoch gehen sie mit einem Risiko der Kontamination des HA-Sekretes mit ihren Endotoxinen einher [136]. In den letzten Jahren wurden viele neue mikrobielle Methoden etabliert und auch Bakterien ohne natürliche HA-Produktion mittels Plasmide mit den entsprechenden Genen für die notwendigen Enzyme modifiziert. Dabei konnte neben den *Streptokokken* [135], auch bei *Pasteurella multocida*, *Bacillus subtilis* [137, 138] und *Escherichia coli* [139-142] eine HA-Produktion erfolgreich nachgewiesen werden. Der Biosyntheseweg in allen Bakterien basiert auf der in der Abbildung 4 dargestellten Fermentation und der Verwendung von Kohlenstoff zur Produktion von Hyaluronsäure [137, 141]. Dabei greift die Biosynthese von HA auf die Enzyme der Zellwandsynthese zurück [141, 143]. Diese Enzyme sind an der Herstellung von Cellulose beteiligt und bilden regulär die notwendigen HA-Vorläufer UDP-Zuckermoleküle [144]. Zum Nachteil der Hyaluronsäurebildung konkurriert die Zellwandsynthese zur Bildung von Cellulose um die für

die HA-Produktion erforderlichen UDP-GlcUA und UDP-GlcNAc, was ein eingeschränktes Synthesepotenzial zur Folge hat [143].

#### 1.4.2 Konstruktion transgener Cyanobakterien-Stämme

Die Verwendung von Cyanobakterien für die HA-Synthese ist von Vorteil gegenüber herkömmlich genutzten heterotrophen Bakterien, da sie zusätzlich photosynthetische Eigenschaften besitzen [145, 146]. Das einzellige euryhalin-Cyanobakterium kann somit als strategischer Ansatz zur lokalen Erhöhung der Sauerstoffversorgung dienen. Zudem werden sie durch die Photosynthese befähigt, die anfallende Glukose direkt für die HA-Synthese zu verwenden [143]. Diese Umleitung des Kohlenstoffstroms zum Endprodukt Hyaluronsäure ermöglicht eine nachhaltige und uneingeschränkte Produktion biomedizinischer Polysaccharide [147]. Aufgrund der Verdopplungszeit, der leichten Kultivierung sowie ihrer Fähigkeit zur genetischen Manipulation, haben Cyanobakterien ein erhebliches biomedizinisches und biotechnologisches Potenzial und finden bereits jetzt eine industrielle und experimentelle Nutzung in der Herstellung von Heparosan [148], Isopropanol [149] und anderen relevanten Produkten [147, 150-153].

Eine natürliche HA-Produktion konnte bei Cyanobakterien bisher nicht nachgewiesen werden. Allerdings sind alle notwendigen Enzyme zur Bildung von HA-Vorläufer-Zuckermolekülen UDP-GlcUA und UDP-GlcNAc vorhanden [148]. Zhang et al. [143] haben erstmals durch die Manipulation photosynthetischer Cyanobakterien entscheidende Grundlagen für diese Arbeit gelegt. Sie haben den Stamm *Synechococcus sp. PCC 7002* (Syn 7002) mittels Transformation der entsprechenden HA-Synthetasen genetisch modifiziert und somit die Basis für eine biotechnologische Plattform für die Herstellung rekombinanter Faktoren geschaffen. Die HA-Synthetasen (HAS) katalysieren wie beim Menschen den letzten Schritt zur Bildung der Hyaluronsäure aus einem UDP-Zucker [142]. Dabei wurde auf die industriell häufigsten genutzten HA-Synthetasen *pmHAS* der *Pasteurella multocida* und die *seHasA* (oder *szHasA*) der *Streptokokken* zurückgegriffen [143]. Die Gene beider Synthetasen *pmHAS* und die *seHasA* wurden an die *acsA*-Genlokalisierung von Syn 7002 integriert [143]. Hierzu wurden verschiedene Stämme mit unterschiedlicher genetischer Modifikation erstellt und in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Zur Regulation der HA-Produktion wurde über das Plasmid *pAcsA-PcLac143-YFP* das Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierte Expressionssystem PcLac143 eingeführt [154]. Erst durch Zugabe des Promoters IPTG (ein molekulares Analogon von Allolaktose) kann durch Entfernen eines Repressors aus dem lac-Operon eine verstärkte Genexpression der HA-Synthetasen erfolgen. Die Quantifizierung der synthetisierten

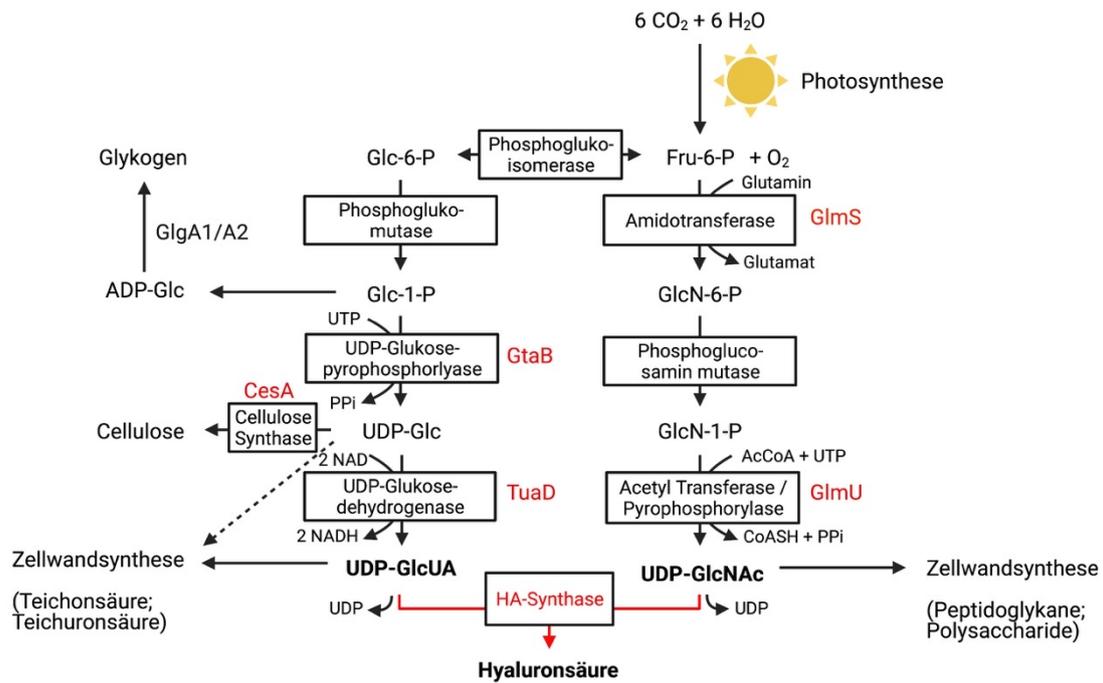
Hyaluronsäure im Medium der Bakterien mittels ELISA zeigte im Stamm HA01 mit *pmHAS* insgesamt einen mit 9,8 mg/L höheren HA-Titer als im HA03 mit *seHasA* und wurde somit Grundlage weiterer Folgeversuche [143, 155]. Eine GFP-Markierung der Stämme HA02 und HA04 ermöglichte eine sichere Identifikation der HA-Produkte [143]. Die Bestimmung der molekularen Größe mittels Chromatografie ergab einen Höhepunkt bei >1 MDa für die Stämme HA08 und HA12, wobei HA13 und HA01 den größten Ausschlag zwischen 2 und 2,2 MDa zeigten [143].

### 1.4.3 Optimierung der Biosynthese von Hyaluronsäure

Die ursprünglich entwickelten Methoden zur Steigerung der Biosynthese von HA in *Synechococcus sp. PCC 7002* wurden bereits auf andere Bakterienarten übertragen [135]. Im Folgenden wird nur auf relevante Modifikationen der in dieser Arbeit verwendeten Stämme eingegangen. Wie bereits erwähnt, konkurrieren die Stoffwechselwege für die Zellwandsynthese mit der Bildung von HA-Polymeren. Es ist daher naheliegend, mittels Hemmung der Bildung von Zellwandpolysacchariden eine Steigerung der HA-Vorläufer und somit auch der HA-Synthese zu induzieren [143]. Eine geringe Verbesserung der HA-Synthese konnte durch Inhibition der Glykogensynthese erreicht werden [143].

Deutlich erfolgreicher war die Deletion des Gens für die Cellulose-Synthetase (*cesA*) im Stamm HA08, da nicht nur vermehrt Kohlenstoffprodukte für die HA-Bildung bereitgestellt wurden, sondern auch die extrazelluläre Freisetzung der Hyaluronsäure durch die fehlende Zellwand erleichtert werden konnte [143]. Der Export hochmolekularer HA wird durch die physikalische Barriere der Cellulose-Schicht deutlich reduziert [156]. Zhang et al. [143] haben nachgewiesen, dass 42-88 % der insgesamt produzierten Hyaluronsäure intrazellulär verbleibt. Ein weiterer Ansatz zur Optimierung der HA-Ausbeute bestand in der Steigerung der Enzymexpression der Vorläufermoleküle UDP-GlcNAc und UDP-GlcUA [135]. Zur Verbesserung der UDP-GlcNAc Biosynthese wurden Gene für die Enzyme Glutamintransferase (*glmS*) der *E.coli* und Acetyl-CoA-Acetyltransferase (*glmU*) in den neutralen *glpK*-Lokus für den Stamm HA11 und an die *glgA1*-Lokus im HA12 integriert und über den Promoter *Pcpt* kontrolliert [143]. Der Stamm HA13 wurde im *glgA2* Locus mit den Genen für die UDP-Glukose Dehydrogenase (*tuaD*) und UDP-Glukose Pyrophosphorylase (*gtaB*) modifiziert. Die Gene werden unter der Kontrolle des künstlichen Operons *Pcpc560* kontrolliert und steigern die Produktion von UDP-GlcUA. Vor jedem ATG-Start-Codon wurde eine Ribosomen-Bindungs-Sequenz (RBS) mit acht zufälligen Basenpaaren platziert. Die genetischen Manipulationen sind nach Zhang et al. [143] in der Abbildung 4 zusammengefasst. Dabei zeigte der Stamm HA12 eine deutlich stärkere Verbesserung der

HA-Synthese als der HA11 und der HA13 und wurde daher in den meisten experimentellen Versuchen dieser Arbeit angewendet [143].



**Abbildung 4: Schematische HA-Produktion in Syn7002 (Quelle: [141, 143] - teilweise modifiziert mit Biorender)**

Dargestellt ist der Biosyntheseweg von Hyaluronsäure in *Synechococcus sp. PCC 7002*, modifiziert nach Widner et al. und Zhang et al.. Rot angezeigt sind die genetischen Modifikationen zur Überexpression vorhandener Enzyme mit verstärkter Bildung von HA-Vorläufern. Im Falle der HA-Synthese werden Gene für ein fehlendes Enzym in Syn7002 integriert. Verdeutlicht werden auch die konkurrierenden Wege der Cellulose-, Glykogen- und Zellwandbiosynthese. Glc-6-P: Glucose-6-phosphat; Glc-1-P: Glucose-1-phosphat; ADP-Glc: ADP-Glucose; UDP-Glc: UDP-Glucose; UDP-GlcUA: UDP-Glucuronsäure; Fru-6-P: Fructose-6-phosphat; GlcN-6-P: Glucosamin-6-phosphat; GlcN-1-P: Glucosamin-1-phosphat; GlcNAc-1-P: N-Acetylglucosamin-1-phosphat; UDP-GlcNAc: UDP-N-Acetylglucosamin; GlgA1 / A2: Glykogensynthase A1 / A2.

## 2 Fragestellung

Das Regenerationspotenzial chronischer Wunden ist durch einen Mangel an Wachstumsfaktoren und Sauerstoff im Wundbett deutlich beeinträchtigt. Dieses zytotoxische Milieu bedingt eine inadäquate Lymphangiogenese, Vaskularisation und Wundheilung. Das Lymphsystem spielt für die Wundheilung durch den Abtransport inflammatorischer Zellen und Wundflüssigkeit sowie den Transport von Wachstumsfaktoren eine essenzielle Rolle. Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Verbesserung der Lymphangiogenese durch sauerstoffproduzierende Mikroorganismen und sezernierte regenerative Faktoren (insbesondere HA).

In der vorliegenden Dissertation wird der Einfluss transgener photosynthetischer Cyanobakterien auf die Lymphangiogenese *in vitro* untersucht. Konkret werden folgende Fragen untersucht:

1. Können Cyanobakterien an humane Zellbedingungen adaptiert werden?
2. Sind Cyanobakterien mit verschiedenen humanen dermalen und lymphendothelialen Zellen biokompatibel?
3. Ermöglicht der von Cyanobakterien photosynthetisch produzierte Sauerstoff eine lokale Verbesserung des Zellüberlebens von LECs und anderen dermalen Zellen unter hypoxischen Bedingungen?
4. Welchen Einfluss hat die bakteriell synthetisierte Hyaluronsäure nach Zugabe des Promotors IPTG auf die Lymphangiogenese?
5. Kann eine Kultivierung transgener Cyanobakterien in herkömmlichen kollagenbasierten Hautersatzmaterialien zur Entwicklung bioaktivierter Scaffolds erfolgen?
6. Welchen Einfluss haben bioaktivierte Scaffolds auf die Lymphangiogenese unter Hypoxie *in vitro*?

### 3 Material

#### 3.1 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme wurden von Prof. Nickelsen (Biozentrum der LMU Dept. Biologie I – Botanik) bezogen. Folgende Stämme der *Synechococcus sp. PCC 7002* wurden in dieser Arbeit verwendet:

Bezeichnung	Plasmid	Eigenschaften
HA01(HA02)	$\Delta AcsA::P_{cLac143}-pmHAS(-sfGFP)$	HA-Produktion mit w/o. sfGFP
HA03(HA04)	$\Delta AcsA::P_{cLac143}-seHasA(-sfGFP)$	HA-Produktion mit w/o. sfGFP
HA08	$\Delta cesA::Cm^R + AcsA::P_{cLac143}-pmHAS$	Cellulose Depletion, HA-Produktion
HA12	$\Delta glgA1::P_{cpt} - glmS-glmU-Cm^R + \Delta AcsA::P_{cLac143}-pmHAS$	Überexpression heterologer UDP-GlcNAc-Biosynthese-Enzyme, partielle Glykogenverarmung, HA-Produktion

Tabelle 1: Transgene Bakterienstämme von *Synechococcus sp. PCC 7002*; adaptiert von [143]

#### 3.2 Scaffold

Bezeichnung	Hersteller
Integra© Dermal Regeneration Template (Bilayer; 10 x 12,5 cm)	Matrix Life Science Cooperation, Plainsboro, NJ, USA Lagerung erfolgte bei 4°C

Tabelle 2: Hautersatzmaterial

#### 3.3 Medien

Bezeichnung	Hersteller
A-D7-Agarplatten	1,2% Agar 1 g/L $Na_2S_2O_3$ w/o. Chloramphenicol 0,1% autoklaviert und bei 4°C gelagert.
A-D7-Flüssigmedium	1L ADPT Base Lösung 1 ml 30 mM $FeCl_3$ in 0,1N HCl und 1ml 6µM Vitamin B <sub>12</sub> .
Basalmedium für LECs	Basal Medium; 1% Penicillin/Streptomycin; 1% Amphotericin B; Die Lagerung erfolgte bei 4°C.
Medium für 3T3 Fibroblasten	DMEM; 10% Fetal Bovin Serum (FBS),

	1% Penicillin/Streptomycin; 1% Amphotericin B; Die Lagerung erfolgte bei 4°C.
Medium für HaCaT Keratinozyten	DMEM; zusätzlich supplementiert mit 10% Fetal Bovin Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin; 1% Amphotericin B; Die Lagerung erfolgte bei 4°C.
TAPS	Herstellung von 1L Medium: 25 ml TAP (40x), 25 ml Beijerinck salts (40x) 1 ml Trace 949 ml H <sub>2</sub> O pH 7,0 mit Essigsäure eingestellt 10 g Sorbitol autoklaviert und bei RT gelagert.
Wachstumsmedium für LECs	ECGM MV2; zusätzlich supplementiert mit 1% Penicillin/Streptomycin; 1% Amphotericin B, Das Medium wurde bei 4°C gelagert.

Tabelle 3: Medien

### 3.4 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Hersteller
A Base	18 g/L 5M NaCl, 0,6 g/L 1M KCl, 1,0 g/L 1M NaNO <sub>4</sub> , 5,0 g/L 1M MgSO <sub>4</sub> , 0,2775 g/L 1M CaCl <sub>4</sub> .
ADPT Base	1L A Base Stocklösung 1 ml D7-V micronutrients, 0,37 ml 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 8,3 ml 1M Tris-HCl (pH 8,2) anschließend autoklaviert.
Alamar-Blue-Arbeitslösung	0,1 mg/ml AlamarBlue Cell Viability Reagent in zellspezifischem Medium
Beijerinck salts (40x)	1 Liter dH <sub>2</sub> O 16g NH <sub>4</sub> Cl; 2g CaCl <sub>2</sub> ; 4g MgSO <sub>4</sub> autoklaviert und bei 4°C gelagert.
Citratpuffer (PH 6,0)	18 ml Stammlösung A (5,25 g Citronensäure-Monohydrat in 250 ml sterilem dH <sub>2</sub> O gelöst) 82 ml Stammlösung B (14,7 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat in 500 ml sterilem dH <sub>2</sub> O) in 1L sterilem dH <sub>2</sub> O gemischt.
DAB-Färbelösung	30 µl DAB-Chromogen 1,5 ml DAB-Substrat
EDTA-Puffer (PH 8,0)	2 ml 0,5M EDTA 1L sterilem dH <sub>2</sub> O pH-Wert 8,0 mit HCl eingestellt.
PicoGreen Farblösung	Für 30 Proben je 100 µl: 15 µl der PicoGreen Stammlösung 2985 µl TE-Puffer

Proteinase K Arbeitslösung	Für 1 Probe: 5 µl Stammlösung (50mg/ml Proteinase K) in 995 µl K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> zusammen.
TAP (40x)	1 Liter dH <sub>2</sub> O, 40 ml 1M KPO <sub>4</sub> 96,8g Tris pH 7,0 mit Essigsäure eingestellt bei 4°C gelagert.
TE-Puffer (10 mM, PH 8,0)	0,0605 g Tris 0,186 g EDTA In 450 ml dH <sub>2</sub> O pH-Wert 8,0 mit 2M HCl eingestellt. Auf 500 ml mit dH <sub>2</sub> O bis auffüllen
Trace	Lösung1 (400 ml dH <sub>2</sub> O supplementieren mit 4,99 g FeSO <sub>4</sub> ; 50 g Na-EDTA; pH-Wert 5,5 mit KOH eingestellt) Lösung 2 (400 ml dH <sub>2</sub> O supplementieren mit 22 g ZnSO <sub>4</sub> , 11,4 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 5,06 g MnCl <sub>2</sub> , 1,61 g CoCl <sub>2</sub> , 1,57 g CuSO <sub>4</sub> und 1,1 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ) Beide Lösungen wurden vorsichtig gemischt, pH-Wert 6,5-6,8 mit KOH eingestellt, auf 1L mit dH <sub>2</sub> O auffüllen. Die Lösung wird für 4 Wochen einmal täglich geschüttelt und anschließend bei - 20°C gelagert.
Tris-HCL-Puffer (7,6)	1Liter dH <sub>2</sub> O 500 µl Tween 100 ml Tris-Stammlösung
Tris-Stammlösung	900 ml sterilem dH <sub>2</sub> O 60,55 g Trizma Base 87,66 NaCl, pH-Wert 7,625 mit HCl eingestellt; Mit sterilem dH <sub>2</sub> O auf 1L aufgefüllt.

Tabelle 4: Lösungen und Puffer

### 3.5 Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
Aceton 99,8%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
AlamarBlue Cell Viability Reagent	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Alcianblau 8 GS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Amphotericin B 50ml (250 µg/ml) Amphotericin B sol. 100ml A 2942	Biochrom GmbH, Berlin Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt Lagerung bei -20°C gelagert
Anti-LYVE-1-Rezeptor	Abcam; ab14917; Cambridge, MA, USA
Anti-VEGFR-3-Rezeptor	BIOZOL; A01276-3; Eching, Deutschland

Avidin / Biotin-Blockierungssystem	BioLegend, San Diego, CA, USA
BODIPY 493/503	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
BSA (Bovin Serumalbumin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Chloroform	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Chloroform >99,8%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Citronensäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Cryo-SFM 30ml C-29910	PromoCell; Heidelberg
DAB-Chromogen (HRP/DAB-Detection IHC-Kit)	Abcam, Cambridge, UK
DAB-Substrat (HRP/DAB-Detection IHC-Kit)	Abcam, Cambridge, UK
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Deoxycholic acid sodium	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Deoxyribonuclease-I from bovine pancreas	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
DEPC-behandeltes Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
dH <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DMEM 500ML FG 1445 VLE	Biochrom GmbH, Berlin
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium;	Lonza GmbH, Verviers, Belgien Biochrom GmbH, Berlin
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium; ohne Phenolrot	Lonza GmbH, Verviers, Belgien Biochrom GmbH, Berlin
DMEM High glucose 500ml	Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DMEM High glucose ohne phenolrot	Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DMSO 5x10ml D 2650	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
DMSO 99,8% p.A. 500ml 4720.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNA-Standard 80 ng/ml	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
DPBS Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline 500ml L1825 o.Ca <sup>2+</sup> + o.Mg <sup>2+</sup>	Biochrom GmbH, Berlin Lagerung bei RT
EDTA (0,5M), pH 8,0 100ml AM9260G	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Eindeckmedium Tissue-Tek Glass®- Eindeckmedium	Sakura Finetek, CA, USA
Endothelial Cell Basal Medium MV (ECBM MV) 500ml C-22220	PromoCell, Heidelberg Lagerung bei 4°C.
Endothelial Cell Growth Medium MV2 (ECGM MV2) 500ml C-22020	PromoCell GmbH, Heidelberg. Lagerung bei 4°C.
Essigsäure 100% (CH <sub>3</sub> COOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol abs. reinst 1l V 1.00986.1000	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Bovin Serum (FBS) South America / Brazil	Gibco, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Lagerung bei -20°C als 50 ml Aliquots
Fluorescein diacetate	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Formaldehyd 3,5%	Otto Fischar GmbH, Saabrücken

Formaldehyd 4% Lsg. 1L neutralgepuffert	Otto Fischar GmbH, Saabrücken
Geltrex ready to use INV A1569601 5ml	Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gentamicin 100ML P06-03100	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Giemsa Stain Solution	Sigma-Aldrich
Glycerol Molec.Biol	F-S
Guanidin Hydrochlorid 99,7%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
H&E Schnellfärbekit	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HEPES solution H0887	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Hyaluronidase 1000 U/mg	Serva, Heidelberg, Deutschland
Hyaluronsäure Natriumsalz	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
IMDM+HEPES+Glutamin	Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
innuMIX qPCR DSGreen Standard	Analytik Jena GmbH, Jena
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid)	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Kollagenase, Typ 2	Worthington
Methanol 99,9%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
MTT 100MG M 2128	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Natriumacetat 98,5	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumacetatpuffer 100 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Natronlauge 25%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nuclear fast red Solution	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
NuclearFastRed	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Oil Red O	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Papain	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin 100ml (10.000 IE/ml/10.000 $\mu$ g/ml)	Biochrom GmbH, Berlin steril filtriert und bei 4°C gelagert.
Perchlorsäure 70%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Phalloidin 300U	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Phalloidin-Alexa 488 Antikörper	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, MA, USA
PicoGreen Stammlösung	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Proteinase K 100mg A3830, C100	AppliChem GmbH, Darmstadt (PanReac-AppliChem)
Resazurin sodium salt 5G R7017	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
Rnase Away 475ml Spray	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Safranin O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCL) 25%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sodiumacetate 99%	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt

Streptavidinperoxidase (HRP/DAB - Detection IHC-Kit)	Abcam, Cambridge, UK
TBS Tris Bufferd Saline (10x) 1x500ml sc-362304	Santa-CRUZ Biotechnologies
TE buffer (1x) pH 8.0 10mM Tris, 0,1mM EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
TE Buffer, pH 8,0 10mM Tris	Alfa, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TNS (Trypsin-Neutralizing-Solution) 0,05% Trypsin Inhibitor in 0,1% BSA	PromoCell, Heidelberg Lagerung bei 4°C.
TRI Reagent RNA Isolation Reagent	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
TRIS	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Tris-HCl 1M pH 7,5	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Triton X-100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trizol Reagent 200ml INV 15596-018	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Trypan Blue Sol.0,4%	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Trypanblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TrypLE™	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Trypsin-/EDTA-Lösung 100ml (0,05%/0,02%)	Biochrom GmbH, Berlin Lagerung bei -20°C
Tween®-20	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
VEGF-C 5µg rh PEPRO 100-20C	PepRoTech Germany, Hamburg
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxidblock (HRP / DAB-Detektionskit IHC-Kit)	Abcam, Cambridge, UK
Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-Alexa 488-Fluor	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 5: Reagenzien

### 3.6 Kits und Assays

Bezeichnung	Hersteller
Anti-LYVE1 (HI)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-VEGFr3 (HI)	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Avidin/Biotin Blocking System	BioLegend, San Diego, CA, USA
Biotinylated Hyaluronan Binding protein (b-HABP) (versican G1 domain, VG1)	AMS Biotechnology, Abingdon, UK
Chondroitinase ABC protease free (lyophilized) 2U/vial	AMS Biotechnology, Abingdon, UK
First Strand cDNA Kit 100R. FER K1612	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Geltrex LDEV-Free Reduc. 1ml	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
HRP / DAB-Detektionskit IHC-Kit, ab 64261	Abcam, Cambridge, UK
Hyaluronan Quantikine ELISA Kit DHYAL0	R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA

Hyaluronidase from bovine testes min. 1000 U/mg lyophil.	AMS Biotechnology, Abingdon, UK
innuMIX qPCR Kit DSGreen Standard REF 845-AS-1320100	Analytik Jena GmbH, Jena
LDH-Assay-Lösung	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA 90% Lösung1 10% Lösung2
rhVEGF-C 5µg 100-20C	PepRoTech Germany, Hamburg
RNeasy Mini Kit (50) REF 74104	Qiagen, Hilden
Trans.First Strand Syn.Kit RDB (200Reak.) REF 048970300001	Roche; Rotkreuz, Schweiz
Transcriptor First Strand RDB 04379012	Roche; Rotkreuz, Schweiz
VEGF-C DuoSet ELISA Hum	R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA

Tabelle 6: Kits und Assays

### 3.7 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Spezies	Anti-Spezies	Eingesetzte Konzentration
Anti-LYVE-1-Rezeptor	Abcam; ab14917; Cambridge, MA, USA	Kaninchen	Maus, Human	1:500
Anti-VEGFR-3-Rezeptor	BIOZOL; A01276-3; Eching, Deutschland	Kaninchen	Maus, Ratte, Human,	1:500
Anti-IgG-Alexa 488-Fluor	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, MA, USA	Ziege	Kaninchen	1:1000

### 3.8 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Amicon® Ultra Filtereinheit 3K NMWL15ml	Amicon, Merck KGaA, Darmstadt
BD Falcon® CultureSlides 4well 1,0-1,5ml 1,7cm <sup>2</sup>	Corning, NY, USA
Cell Counting Chamber Slide	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Combitips advanced 1,0ml unsteril	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips advanced 10ml unsteril	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips advanced 2,5ml unsteril	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips advanced 5ml unsteril	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips-plus Biopur 10ml	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips-plus Biopur 5,0ml	Eppendorf AG, Hamburg
Corning 10ml Stripette	Corning, NY, USA
Corning 25ml Stripette	Corning, NY, USA
Corning 5ml Stripette	Corning, NY, USA

Corning® Easy Grip Storage Bottles 250ml	Corning, NY, USA
Corning® Easy Grip Storage Bottles 500ml	Corning, NY, USA
Cryo- und Lagerbox	Omnilab
Cryoröhrchen steril 2ml	Corning, NY, USA
CultureSlides	Falcon® Corning, NY, USA
Einmalpinzette Plastik steril 12,5cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipette 10ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipette 25ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipette 25ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipette 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipette 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipette 5ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Eppi 1,5 LoBinde	Eppendorf AG, Hamburg
Eppi 2,0 LoBinde	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon® Zellsieb Porengröße 100µm	Corning, NY, USA
Falcon® Multischalen 12well	Corning, NY, USA
Falcon® Multischalen 24well	Corning, NY, USA
Falcon® Multischalen 48well	Corning, NY, USA
Falcon® MultiWellPlatte 6well	Corning, NY, USA
Falcon™ Zellsieb 70µm	Fisher Scientific, Schwerte
Filterspitze Sapphire 300 µL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Hautbiopsiestanze D. 10,0mm	Xiomedics, Unterhaching
Hautbiopsiestanze D.12,0mm	Xiomedics, Unterhaching
Hydrophober PAP Pen Immunostaining 5mm	Sigma-Aldrich; Merk, Darmstadt
LoBind Tubes	Eppendorf, Hamburg
Menzel-Gläser, Superfrost Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Microtome Blades N35	Feather, Osaka, Japan
Millex®-GP Filter Unit 0,3 µm	Merck, Darmstadt
Objektträger Superfrost®Plus, Menzel-Gläser	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Oxodish OD24 OD-1842-01; 200000430	PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg
Petrischale mit Nocken steril 100x15	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pinzette transparent steril 140mm Einweg	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipette serologisch steril lila 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitze 0,5-10µl unsteril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitze 1250µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitze Tip-Box Nbiocert 0,5-10µl	Brand GmbH + Co KG; Wertheim
Pipettenspitze Tip-Box Nbiocert 2-20µl	Brand GmbH + Co KG; Wertheim
Pipettenspitze Tip-Box Nbiocert 5-200µl	Brand GmbH + Co KG; Wertheim

Pipettenspitze Tip-Box Nbiocert 50-1000µl	Brand GmbH + Co KG; Wertheim
Pipettenspitzen PP Tip-Box 50-1000µl	Brand GmbH + Co KG; Wertheim
Reagenzienreservoir einz.ster.verp. 25ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäß 0,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäß 2,0ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäß Safe-Lock 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Röhrchen 15ml	Corning, NY, USA
Röhrchen 50ml	Corning, NY, USA
Röhre Falcon koni, o.Gest.17x120 15ml	Corning, NY, USA
Röhre Reag, m.Deck.weiß ster.116/30 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
SafeSeal Tips Premium Biozym steril 20µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
SafeSeal-Tips 2,5µl Biozym für qPCR	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Schwarze 96 Well Nunc Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Skalpell steril Fig. 20	Feather, Osaka, Japan
Spritze steril Luer 20ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter steril 0,45µm 25mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thincert Zellkultureinsatz 24 Well 0,4µm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultureinsatz PS schwarz ster. 96Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturfl. Nunc Filt.Kap75cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellkulturfl.Nunc EasyFlask 255cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellkulturfl.Nunc EasyFlask 25cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflasche EasYFlask 175cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellkulturflasche Nunc Filt. Kap. 75cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

### 3.9 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Universalschrank UN450	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, DE
Brutschrank HERACell Vios 160i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Elektronische Pipette Easypet 3	Eppendorf, Hamburg
Elektronischer Stepper	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenz NanoPhotometer IMPLEN P300	IMPLEN, München
Fluoreszenzmikroskope Axio Observer	Zeiss Oberkochen, Deutschland

Flüssig Stickstofftank Apollo	Cryotherm, Kirchen/Sieg, Deutschland
HeraCell Megafuge 40R	Thermo-Fisher-Scientific, Waltham, MA, USA
Para-Cooler TW	RWW Medizintechnik, Gräfenberg
Kryostat Microm, HM 355S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tissue TEK, VIP 6	Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, USA
Tissue TEK Film	Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, USA
Tissue TEK Prisma	Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, USA
Tissue Floating Bath TFB 45	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, DE
Kühlschrank -80°C	Thermo-Fisher-Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlschrank -20°C	Thermo-Fisher-Scientific, Waltham, MA, USA
Laborgefrierschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LED-Lampe (32,25 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Sebson, Dortmund, Deutschland
Lichtmikroskop Primovert	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Light Meter Quantitherm	Hansatech Instruments Ltd., Pentney, UK
NanoDrop-Spektrometer P300	IMPLEN, München, Deutschland
Neubauer-Zählkammer improved	Neubauer-Zählkammer
PH-Meter WTW series ph720	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim
Pico Punch® P1225 Ø12 mm	Acuderm® Inc., Ft. Lauderdale, FL, USA
Pipettus Easypet 3	Eppendorf, Hamburg
Plate Reader Infinite M Plex	TECAN, Männedorf, Schweiz
Präzisionswaage Kern ADB	Ascuero Service GmbH, Lörrach, Deutschland
qPCR Tower-3 G	Analytic-Jena, Jena
Rotationsmikrotoms	Mikrom HM 355S, Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Sensors © Dish-Reader-Systems	PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg
Stainless steel Beads Ø 7 mm	Qiagen, Hilden, Deutschland
Stereomikroskop Stemi 508	Zeiss, Oberkochen
Sterile Werkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler TProfessional Basic	Biometra GmbH, Göttingen
Thermoshaker	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TISSEEL Fibrin-Kleber 2 ml	Baxter GmbH, Unterschleißheim Lagerung bei -20°C
TissueLyser LT	Qiagen, Venlo, Niederlande

Vakuum Pumpe / Absaugpumpe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortexgerät Reax Top	Heidolph Reax Top; Schwabach
Wasserbad Precision GP 05	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellzählgerät Countess 2 FL	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 8: Geräte

### 3.10 Software

Bezeichnung	Verwendung	Quelle
ImageJ Angiogenesis Analyzer-Software ImageJ V-1.52A	Bildanalyseprogramm zur Detektion von Lymphgefäßen, Zellzahlbestimmung, Messung prozentualer Signalfäche der Proteinexpression	Open-Source: <a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>
Endnote	Literaturverwaltungs-programm	Ludwig-Maximilians-Universität München
OligoArchitect™ Primer-Software	Primer-Design	Sigma-Aldrich <a href="http://www.oligoarchitect.com/">http://www.oligoarchitect.com/</a>

## 4 Methoden

### 4.1 Methoden der Aquakultur

#### 4.1.1 Kultivierung von *Synechococcus sp. PCC 7002*

Die photosynthetischen Cyanobakterien der Gattung *Synechococcus sp. PCC 7002* wurden vom biologischen Institut der molekularen Pflanzenwissenschaften der LMU unter der Leitung von Herrn Prof. Nickelsen bezogen. Dabei wurde auf einen Wildtyp (SynWT) und auf die transgenen Stämme SynHA12 und SynHA03 der Cyanobakterien zurückgegriffen. Die genetische Manipulation erfolgte von Zhang et al. [143] durch Transformation der Bakterien mit dem Plasmid *pAcsA-PcLac143-YF*, wie zuvor in 1.5.2 beschrieben, und ermöglichte durch die Expression von HA-Synthase-Genen die Produktion und Sekretion von Hyaluronsäure ins Medium. Die Genexpression wurde durch den IPTG-induzierbaren Promotor PcLac143 gesteuert. Die Stämme HA03 und HA12 unterschieden sich hinsichtlich ihrer zusätzlichen genetischen Optimierung mit Enzymen zur Hemmung der Glykogen-, Cellulose- oder Zellwandsynthese zur Steigerung der Biosynthese der HA-Vorläufermoleküle und sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. Der Stamm SynHA12 wurde für alle Kokultur-Experimente und der Herstellung von konditionierten Medien verwendet, da seine genetische Antibiotikaresistenz gegen Chloramphenicol eine sterile Kulturbedingung erleichterte. SynWT und SynHA03 wurden zur Besiedelung von Hautersatzmaterialien verwendet, um die Experimente in einem Kollagen-Scaffold zu replizieren und den Ansatz zu validieren. Die Cyanobakterien wurden auf A-D7-Medium-Agarplatten gezüchtet, die mit Glucose (1 g/l) und Chloramphenicol (10 µg/mL) ergänzt waren. Die Inkubation erfolgte bei 25-30 °C mit konstanter Illumination von 30-50 µE·m<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>. Die Agarplatten wurden alle 3 Wochen aufgefrischt. Vor jedem Experiment wurde eine flüssige Vorkultur vorbereitet, in der in Agar wachsende Cyanobakterien in 50 ml A-D7-Medium, supplementiert mit 1 g/l Glucose, inokuliert wurden. Die Flüssigkulturen wurden für weitere 3 Tage bei Standardkulturbedingungen (37 °C, 150 rpm, 30-50 µE·m<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>) in einem Brutschrank inkubiert. Um die HA-Produktion zu induzieren, wurde den Medien 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid, Merck) hinzugegeben und für mindestens 7 Tage, wie beschrieben, kultiviert (SynHA (+)). Um das Verhältnis von IPTG zur Bakterienzahl einheitlich zu gestalten, wurde zuvor die identische optische Dichte kalibriert und die frischen Cyanobakterienkulturen auf OD750 = 1 (IMPLEN P300 Nanophotometer) resuspendiert. Die Kontrollgruppe SynHA (-) wurde unter den gleichen Bedingungen in Abwesenheit von IPTG kultiviert. Während den experimentellen Versuchen wurden die Aquakulturbedingungen der Cyanobakterien den standardisierten humanen Zellkulturbedingungen im Inkubator (HERACell Vios 160i) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> angepasst.

Um das photosynthetische Wachstum durch konstante Beleuchtung anzuregen, wurde eine Lichtquelle mit dem vollständigen Spektrum des weißen Lichtes in einem Abstand von 25 cm über den Proben platziert ( $32,25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , Sebson-LED). Die Inkubationsdauer erfolgte entsprechend der jeweiligen Versuchsbedingung.

#### 4.1.2 Bakterienzählung

Für alle Zellkulturexperimente wurde die Zellzahl der Cyanobakterien durch ein Lichtmikroskop (Primover, Zeiss) unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 10  $\mu\text{l}$  der auszuzählenden Teilchensuspension bei aufgelegtem Deckglas, seitlich auf den Objektträger pipettiert. Zur Erfassung der Bakterienzahl wurden fünf Gruppenquadrate mit 0,05 mm x 0,05 mm Kantenlänge bestimmt. Die Kammertiefe betrug 0,1 mm. Die Bakterienzahl pro Milliliter wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Bakterienanzahl pro Quadrant}}{(0,05\text{mm} \times 0,05\text{mm} \times 0,1\text{mm})} \times 1000 = \text{Bakterienzahl pro ml}$$

Formel 1: Bakterienzahl pro ml

#### 4.1.3 Gewinnung der Bakterienüberstände

Zur Gewinnung von hyaluronsäurehaltigen Überständen aus der Bakteriensuspension wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG in den Kulturen, die Genexpression von HA-Synthetase induziert, und somit eine HA-Produktion ermöglicht (SynHA (+)). In der Kontrollgruppe SynHA (-) wurde auf die Stimulation mit IPTG verzichtet. Die Kultivierung erfolgte für mindestens 7 Tage unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die mit IPTG induziert SynHA (+) oder nicht induziert SynHA (-) Cyanobakterien durch eine 5-minütige Zentrifugation (HeraCell Megafuge, Thermo-Fisher) bei 5000 g gesammelt, die Bakterienüberstände abgesaugt und zweifach steril filtriert (0,3  $\mu\text{m}$ ; Millex®-GP Filter Unit, Merck). Die Hyaluronsäure-Konzentration wurde mit den in 4.1.7 dargestellten Methoden nachgewiesen und die gewonnenen Proben bei -20°C gelagert.

#### 4.1.4 Besiedelung von Hautersatzmaterialien

Die Scaffolds wurden aus einem Kollagengerüst mit einer Silikonschicht (IDRT, Integra © Matrix Life Science Cooperation) unter Verwendung einer sterilen Biopsiestanze mit  $\varnothing 12$  mm (Pico Punch® P1225, Acuderm® Inc.) herausgeschnitten, für 20 min auf steriler Gaze luftgetrocknet und mit der nach oben ausgerichteten Kollagenschicht einzeln in einer

Vertiefung einer 6-Well-Platte platziert. Zur Aussaat wurde eine Cyanobakterien-Zellsuspensionen mit Fibrinogen (TISSEEL, Baxter GmbH) im Verhältnis 1:1 gemischt. Sofern nicht anders angegeben, wurden Cyanobakterien mit in einer Dichte von  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro Scaffold ausgesät. Hierfür wurde die Bakteriensuspension mit der entsprechenden Konzentration erstellt und pro Scaffold 50  $\mu\text{l}$  in weiteren 50  $\mu\text{l}$  Fibrinogen resuspendiert. Anschließend wurden vorsichtig 50  $\mu\text{l}$  Thrombinlösung (TISSEEL, Baxter GmbH) in die Matrix pipettiert, gefolgt von 100  $\mu\text{l}$  der Cyanobakterien-Fibrinogen-Lösung. Nachdem die Scaffolds für 1 h luftgetrocknet waren, wurden diese mit 2 ml A-D7-Medium pro Well benetzt und in einem Standardbrutschrank (HERACell Vios 160i, Thermo-Fisher) bei 30 °C und 5% CO<sub>2</sub> unter konstanter Lichtexposition, wie bereits beschrieben, für die gewünschte Zeit kultiviert. Je nach Versuchsbedingungen erfolgte die Inkubationszeit für 1-7 Tage unter Hypoxie (1% pO<sub>2</sub>) oder Normoxie (21% pO<sub>2</sub>). Das Kontroll-Scaffold wurde unter Verwendung von A-D7-Medium anstelle der Zellsuspension in Abwesenheit der Bakterien hergestellt. An Tag 1 und 7 wurden jeweils Übersichtsaufnahmen sowie Querschnittsaufnahmen der Scaffolds mit einem Stereomikroskop (Stemi 508, Zeiss) durchgeführt. Weitere Auswertungen erfolgten mittels immunhistochemischer Färbungen für den Nachweis der Hyaluronsäuresekretion und mittels Chlorophyll-Messung zur Quantifizierung der Vitalität und Proliferation der Organismen.

#### 4.1.5 Sauerstoff-Messung

Die Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff wurden in vitro nicht-invasiv unter der Verwendung von Oxodish-Platten (OD24, OD-1842-01, PreSens GmbH) alle 10 Minuten unter Verwendung des Sensors © DishReader-Systems (PreSens GmbH) gemäß den Anweisungen des Herstellers erfasst. Dieses System überwacht den Prozentsatz des Gehalts an gelöstem Sauerstoff (% pO<sub>2</sub>) im Kulturmedium unter Verwendung eines fluorometrischen Sauerstoffsensors. Dabei wurden im Kulturmedium über integrierte Sensorspots am transparenten Plattenboden jedes Wells mittels Exzitations- und Emissionsveränderungen des Sauerstoffgehaltes im Medium gemessen. Die Kultivierung wurde für jeden Versuch als Triplikate unter Hypoxie (1 % pO<sub>2</sub>) in einem Brutschrank (HERACell Vios 160i, Thermo-Fisher) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt. Für die Messung der Co-Kulturen wurden  $2 \cdot 10^7$  Bakterien wie zuvor beschrieben hergestellt. Die Überwachung der Sauerstofffreisetzung erfolgte unter anderem in 4.1.4 besiedelten Scaffolds mit einer Aussaat von  $1 \cdot 10^8$  und  $1 \cdot 10^7$  Cyanobakterien in Integra© Dermal Regeneration Template (IDRT)-Kollagenmatrizen. Zur Stimulation der Photosynthese wurden die Kulturen konstant im Abstand von 25 cm beleuchtet ( $32,25 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , LED, Sebson). Die Kultivierungsdauer war dabei abhängig vom jeweiligen Versuch und erstreckte sich mindestens über 3 Tage. Als negative Kontrolle erfolgte die Messung in Abwesenheit der Bakterien.

#### 4.1.6 Chlorophyll-Messung

Für die Chlorophyllmessung wurden  $1 \cdot 10^8$  Bakterien wie zuvor in 4.1.4 beschrieben, in einer IDRT-Kollagenmatrix ausgesät und bei 30 °C unter konstanter Beleuchtung inkubiert. Nach 1 und 7 Tagen wurden die besiedelten Scaffolds mit einem Stereomikroskop abgebildet (Stemi 508, Zeiss) und bis zur weiteren Analyse in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß bei -80 °C eingefroren und gelagert. Zur Chlorophyllmessung wurden Zellysate aus den aufgetauten Scaffolds in 1 ml Methanol (Carl Roth GmbH) unter Verwendung von Edelstahlkugeln mit Ø 7 mm (Stainless steel Beads, Qiagen) in einem Tissue Lyser LT-System (Qiagen) bei 50 Hz für 10 min hergestellt. Der Überstand wurde abgesaugt und in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen. Die Lysatsuspension wurde bei 5000 g für 5 min zentrifugiert (HeraCell Megafuge, Thermo-Fisher), um verbliebene Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und 1 ml in eine Küvette pipettiert. Der Chlorophyllgehalt wurde anhand der Absorption durch die optische Dichte bei 666 nm unter Verwendung einer Referenzwellenlänge von 720 nm (IMPLEN P300 Nanophotometer) gemäß nachfolgender Formel bestimmt. Das Photometer wurde hierfür auf den Blindwert von reinem Methanol eingestellt. Die OD-Messwerte bei einer Wellenlänge von 720 nm wurden von den Werten bei 666 nm abgezogen und mit 12,61 multipliziert, um die Chlorophyll-Konzentration in µg pro ml zu erhalten.

$$\text{Chlorophyll } (\mu\text{g} / \text{ml}) = 12,61 \times (\text{OD}_{666} - \text{OD}_{720})$$

**Formel 2: Berechnung der Chlorophyll-Konzentration**

#### 4.1.7 Quantifizierung der Hyaluronsäure (Hyaluronan Quantikine ELISA-Kit)

Die Bestimmung des Hyaluronsäuregehaltes wurde in den in 4.1.3 vorbereiteten Überstandsproben von IPTG-induzierten und nicht induzierten Cyanobakterienkulturen 7 Tage nach Stimulation durchgeführt. Hierzu wurden Cyanobakterienkulturen wie in 4.1.1 hergestellt und in Gegenwart oder Abwesenheit von IPTG 7 Tage inkubiert. Zudem wurde die sekretierte Hyaluronsäure im Medium der besiedelten Scaffolds nach 3 und 7 Tagen gemessen. Überstandsproben wurden zweifach sterilfiltriert und im Verhältnis von 1:1000 in A-D7-Medium verdünnt, um Proben, mit Werten innerhalb des Dynamikbereichs des Assays herzustellen. Unter Verwendung des Hyaluronan Quantikine ELISA-Kits (DHYAL0, R&D-Systems) wurde die Konzentration von Hyaluronsäure gemäß den Anweisungen des Herstellers als Triplikate bestimmt. Die Hyaluronsäure-Konzentration einer Probe wird durch den Vergleich mit einer seriell verdünnten Standardlösung mit einer definierten Hyaluronsäure-Konzentration mittels optischer Dichte unter Verwendung eines Plate Readers (Infinite M Plex, TECAN) bestimmt. Die absteigende Standardreihe wird durch die wiederholte Verdünnung von 200 µl der im Kit

enthaltenen HA-Stammlösung mit einem HA-Gehalt von 40 ng/ml in 200 µl der Kalibrator-Lösung RD5-18 in einem jeweils neuen Well erstellt. Als Blindwert dient die reine Kalibrator-Lösung. 50 µl Assay-Lösung RD1-14 werden in einer 96-Well Platte vorgelegt und 50 µl der Standardprobe, Kontrollprobe und der zu untersuchenden Probe hinzugegeben und mit einer Folie überklebt sowie für 2h bei RT und 450 rpm auf einem Thermoshaker (Eppendorf) inkubiert. Es folgten 4 Waschschritte mit Aspiration der Flüssigkeit, Zugabe von 400 µl Waschpuffer und anschließendem Dekantieren. Nachdem die Wellplatte in umgekippter Position luftgetrocknet war, wurden 100 µl Hyaluronan-Konjugat-Lösung hinzupipettiert und mit Folie bedeckt für 2h unter den bereits genannten Bedingungen inkubiert. Nach weiteren 4 Waschschritten wurden 100 µl der im Kit enthaltenen Substrat-Lösung pro Well hinzugegeben und für 30 min lichtgeschützt bei RT zur Reaktion gebracht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stop-Lösung unterbrochen und die Absorption der Proben unter Verwendung des Plate Readers (Infinite M Plex, TECAN) mit einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt. Durch die Wellenlängen-Korrektur wurde von den Messwerten die optische Dichte (OD) bei 570 nm abgezogen. Anhand der Standardkurve konnte für die errechneten OD-Mittelwerte eine Hyaluronsäure-Konzentration ermittelt und grafisch dargestellt werden. Dieser kolorimetrische Immunoassay verwendete rekombinantes menschliches Aggrecan, um Hyaluronsäure in einem Bereich von 0 bis 100 ng/ml, mit einer Empfindlichkeit von <0,2 ng/ml und einer minimalen Nachweisgrenze von 0,068 ng/ml spezifisch zu analysieren.

## 4.2 Zellkultur

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Zelllinien gearbeitet, die in der Tabelle 8, inklusive ihrer Zellkulturmedien und Eigenschaften zusammengefasst sind. Die Inkubation der eukaryotischen Zellen erfolgte in dem jeweiligen Zellkulturmedium bei 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre und 37 °C mit einer Luftfeuchtigkeit von 90 %, in einem Standardbrutschrank (HERACell Vios 160i, Thermo Fisher Scientific). Alle Versuche wurden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Medien, Puffer und Reagenzien wurden vor der Verwendung stets in einem Wasserbad (Precision GP 05, Thermo Fisher Scientific) auf 37 °C vorgewärmt und unter Verwendung einer elektronischen Pipette Easypet® 3 (Eppendorf) den Kulturen zugegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage, indem das verbrauchte Zellmedium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt wurde. Hierfür wurden je nach Größe des Kulturgefäßes 5 ml in eine T-25, 10 ml in eine T-75, 10 ml in eine T-175 und 20 ml in eine T-225 Flasche pipettiert.

Zelllinie	(HD)LEC	HaCaT Keratinozyten	3T3 Fibroblasten
Beschreibung	Humane dermale lymphendotheliale Zellen aus juveniler Vorhaut	Human adult low calcium high temperature keratinocytes	Fibroblasten
Eigenschaften	Adhärente Zellen	Adhärente Zellen	Adhärente Zellen
Hersteller	PromoCell, Heidelberg	AddexBio Technologies, San Diego, CA, USA T0020001	Technische Universität München
Zellkulturmedium	ECGM MV2 + Supplement Mix MV o. ECBM MV	DMEM + 10% FBS	DMEM + 10% FBS
Kryomedium	Cryo SFM	90% FBS 10% DMSO	90% FBS 10% DMSO

Tabelle 9: Zelllinien

#### 4.2.1 Kultivierung lymphatischer Endothelzellen

Die humanen dermalen Lymphendothelzellen (LEC) wurden aus juveniler Vorhaut isoliert und in Passage 2 von PromoCell bezogen. Die Zellen wurden in Endothelial Cell Growth Medium MV2 (ECGM MV2, PromoCell) kultiviert, das mit einem Supplement Mix MV (PromoCell), 1 % Amphotericin B (Biochrom GmbH) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Biochrom GmbH) ergänzt wurde. Um die Zellen in einen Hungerstoffwechsel zu versetzen, wurden diese in ergänzungsfreiem Basalmedium (ECBM MV, PromoCell), mit 0,2 % fetalem bovines Serum (FBS), 1 % Amphotericin B (Biochrom GmbH) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Biochrom GmbH) gezüchtet. Für Experimente unter hypoxischen Bedingungen wurde die Inkubation der Zellen in 1 % pO<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C durchgeführt. Proliferationsassays wurden in ergänzungsfreiem ECBM MV mit 2 % FBS (Invitrogen), 1 % Amphotericin B und 1 % Penicillin-Streptomycin durchgeführt. Alle Experimente wurden mit LECs derselben Charge in den Passagen 3 bis 5 durchgeführt.

#### 4.2.2 Kultivierung von HaCaT Keratinozyten

Bei den Keratinozyten handelt es sich um eine epitheliale humane Zelllinie, deren Abkürzung HaCaT für „*Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes*“ steht. Die Keratinozyten wurden regulär von PromoCell bezogen und in einem Standardinkubator mit 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37 °C in DMEM (Biochrom GmbH) supplementiert mit 10 % Fetales Bovine Serum, 1 % Penicillin-Streptomycin und 1 % Amphotericin B kultiviert. Sie werden als nicht tumorigen eingestuft, dennoch erlaubt ihre Immortalität über 100 Passagen.

### 4.2.3 Kultivierung von 3T3 Fibroblasten

Die Fibroblasten sind freundlicherweise vom Biomedizinischen Zentrum in Martinsried durch die AG Nickelsen bereitgestellt worden. Die 3T3 Fibroblasten sind in DMEM (Biochrom GmbH) mit 10 % fetalem bovines Serum (FBS) bei 37 °C in einem Standardinkubator (HERACell Vios 160i) mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert worden. Das Medium wurde zur Vermeidung von Kontaminationen mit 1 % Penicillin-Streptomycin und 1 % Amphotericin B versetzt.

### 4.2.4 Splitten und Passagieren

Die Subkultivierung der LECs wurde bei Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % durchgeführt, um eine Kontaktinhibition zu vermeiden. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Zellvitalität wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen (25-225 cm<sup>2</sup>) mit einer Vakuumpumpe (Thermo Fisher Scientific) entnommen und die Zellen mit 5-10 ml PBS (Biochrom GmbH) zweifach gespült, um Rückstände des Mediums zu vermeiden. Das Ablösen adhärenter Zellen von der Oberfläche erfolgte durch Inkubation in 5-10 ml Trypsin/EDTA Solution (Biochrom GmbH) je nach Größe des Kulturgefäßes für 5 min bei 37 °C in einem Standardbrutschrank. Zur Ernte der HaCaT Keratinozyten wurde die besonders starke Haftung dieser Zellen am Gefäßboden durch die Anwendung von TrypLE™ (Invitrogen) anstatt Trypsin/EDTA aufgehoben. Durch vorsichtiges Klopfen seitlich des jeweiligen Kulturgefäßes konnten z.T. noch haftende Zellen vom Plattenboden gelöst werden. Der Ablöseprozess wurde lichtmikroskopisch kontrolliert (Zeiss). Im Falle der lymphendothelialen Zellen wurde das Trypsin durch die Zugabe einer gebrauchsfertigen Neutralisationslösung (TNS, Trypsin-Neutralizing-Solution mit 0,05 % Trypsin-Inhibitor in 0,1 % BSA, PromoCell) im Verhältnis 1:1 direkt in der Zellkulturflasche inaktiviert. Für Keratinozyten, sowie 3T3 Fibroblasten erfolgte die Neutralisation der Enzymwirkung durch eine 1:2-Verdünnung in serumhaltigen DMEM (10 % FBS). Das Gesamtvolumen der Suspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt. Vor Durchführung der Zellzählung wurden die Zellen bei 3000 g und RT für 5 min zentrifugiert und in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Abhängig von der Menge der zu rekultivierenden Zellen (n) wurde ein definiertes Suspensionsvolumen (V) mit der entsprechenden Zellzahl in frisches vorgewärmtes Zellkulturmedium übertragen und bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen waren nach circa 4 Stunden adhärent. Das homogenisierte Suspensionsvolumen errechnete sich aus der in 4.2.5 gemessenen Zellkonzentration (c) mit folgender Formel:

$$\frac{n \text{ (gewünschte Zellzahl)}}{c \text{ (Zellkonzentration pro ml)}} = V = \text{Suspensionsvolumen in ml}$$

**Formel 3: Volumen der Zellsuspension**

#### 4.2.5 Zellzahlbestimmung

Nach der Ablösung der Zellen vom Gefäßboden und anschließender Neutralisation wurde die Zellsuspension zur Bestimmung der Zellzahl in einem 50 ml Falcon gesammelt. Das verwendete Inkubationsgefäß wurde mehrfach mit zelleigenem Medium gespült und ebenfalls dem Falcon zugegeben, um mögliche Zellverluste zu vermeiden. Die gebildete Zellsuspension wurde bei 3000 g für 5 min bei RT zentrifugiert (Heraeus Megafuge 40R, Thermo Fisher Scientific) und der Überstand scharf abgesaugt. Die Bestimmung der Zellzahl und Bewertung der Zellvitalität erfolgte durch Resuspendieren des entstandenen Zellpellets in PBS oder in frischem zelleigenem Medium mit einem definierten Volumen von 1 ml. Hieraus wurden 10 µl entnommen und in 10 µl Trypanblau 0,4 % (Invitrogen) mehrfach resuspendiert, sodass avitale, apoptotische Zellen durch Eindringen des Farbstoffes über eine defekte Zellmembran dunkelblau gefärbt wurden und aus der Zellzählung ausgeschlossen werden konnten. Anschließend wurden 10 µl der gefärbten Zellsuspension unmittelbar, aufgrund der Zytotoxizität des Farbstoffes, in ein Cell Counting Chamber Slide (Invitrogen) pipettiert und die Konzentration der Zellen pro ml mit einem automatisierten Zellzahlgerät Countess 2 FL A (Invitrogen) ermittelt. Mit Hilfe eines Autofokus-Mechanismus, einer Bildanalysesoftware und einem Fluoreszenzkanal wurden die zu untersuchenden Zellen erfasst, gezählt und ihre Lebensfähigkeit mit Hilfe der Trypanblau-Färbung bewertet. Die Detektion der Zellen erfolgte bei einer eingestellten Zellgröße von 7–60 µm in einem Messbereich von 1 x 10<sup>4</sup> bis 1 x 10<sup>7</sup> Zellen pro ml. Die gesamte Zellzahl der Kulturen wurde mit der nachfolgenden Formel berechnet:

$$c \text{ (Zellkonzentration pro ml)} \times V \text{ (definiertes Volumen in ml)} = n \text{ (Zellzahl)}$$

**Formel 4: Berechnung der Zellzahl**

#### 4.2.6 Kryokonservierung und Auftauen

Die Zellen wurden wie in 4.2.2 durch Zugabe von Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) vom Zellkulturboden gelöst und nach dem Reaktionstopp durch Zugabe eines zellspezifischen neutralisierenden Reagenz in einem 50 ml Falcon gesammelt. Nach der Zentrifugation mit

5000 g für 5 min wurde der Überstand abgesaugt, und die Zellzahl in einem definierten Volumen von 1 ml PBS, wie bereits beschrieben, bestimmt. Die Zellsuspension wurde mehrfach resuspendiert, erneut zentrifugiert, und der Überstand bis auf ein verbleibendes Zellpellet verworfen. Das gewonnene Zellpellet wurde in dem jeweiligen Kryomedium resuspendiert und zu einer Konzentration von  $2-3 \cdot 10^6$  Zellen pro ml verdünnt. Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte durch Verteilung der Zellsuspension auf die entsprechende Anzahl an Kryoröhrchen (Corning) mit je 1 ml Kryomedium. Während LECs in 1 ml gebrauchsfertigem Cryo-SFM (PromoCell) eingefroren wurden, bestand das Kryomedium der 3T3 Fibroblasten und der HaCaT Keratinozyten aus 90 % fetalem bovines Serum (FBS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Kryoröhrchen wurden übergangsweise in Kryoboxen (Omnilab) bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 24 Stunden einem Laborgefrierschrank (Thermo Fisher Scientific) schockgefroren und anschließend in einen Flüssigstickstofftank bei  $-178^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese nach Entnahme aus dem Flüssigstickstofftank in einem Wasserbad (Precision GP 05; Thermo Fisher Scientific) bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 2 min geschwenkt. Anschließend ist die Zellsuspension unter der Sterilbank in 20 ml vorgewärmten zellspezifischem Medium in einer Zellkulturflasche ( $75\text{ cm}^2$ ) resuspendiert worden. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  Atmosphäre in einem Brutschrank, um die Zellen adhären zu lassen. Am folgenden Tag wurde, das im Medium verdünnte, zytotoxische DMSO durch einen kompletten Mediumwechsel entfernt und eine Kontrolle der Zellmorphologie unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) durchgeführt.

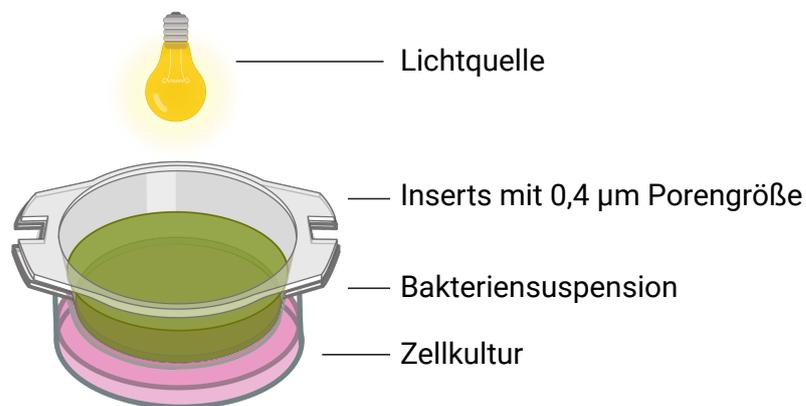
#### **4.2.7 Inkubation in Hypoxie**

Für Experimente unter hypoxischen Bedingungen wurde eine Atmosphäre mit 1 %  $\text{pO}_2$  und 5 %  $\text{CO}_2$  geschaffen. Hierfür wurde 99,99 %-iger Stickstoff ( $\text{N}_2$  Stickstoff 5.0, Linde AG) in den Brutschrank (HERACell Vios 160i, Thermo Fisher Scientific) geleitet und die Zellen und Bakterien, entsprechend dem jeweiligen Versuch, bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

#### **4.2.8 Kokultivierung der Zellen mit Aquakulturen**

Die Kokultivierung der verschiedenen Zelllinien mit Cyanobakterien erfolgte entweder mit direktem Zellkontakt oder indirekt durch räumliche Trennung beider Organismen. Unter Verwendung von Zellkultureinsätzen (Inserts, Greiner Bio-One GmbH) mit  $0,4\text{ }\mu\text{m}$  Poren wurde ein Medium- und Sauerstoffaustausch zwischen beiden Kulturen ermöglicht. Der Versuchsaufbau ist in der Abbildung 5 schematisch dargestellt. Zur konstanten Überwachung des photosynthetisch produzierten Sauerstoffs erfolgte, wie in 4.1.5 beschrieben, die

Zellaussaat in Oxodish OD-24-Wellplatten (PreSens) in der für den jeweiligen Zelltyp entsprechenden Dichte, gefolgt von einer Inkubation in antibiotikafreiem, zellspezifischem Medium für 8 Stunden zur Adhäsion der Zellen am Plattenboden. Alle Kokulturen wurden zum Schutz vor Kontamination mit 0,1 % Chloramphenicol (Sigma-Aldrich) und zur pH-Wert Stabilisierung mit 25 mM/ml HEPES (Sigma-Aldrich) ergänzt. Die gebildeten Kokulturen wurden je nach Versuchsbedingung unter normoxischen ( $pO_2$  21 %) oder hypoxischen Bedingungen ( $pO_2$  1 %) in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  und konstanter Beleuchtung (Sebson, LED) zur Stimulation der Photosynthese kultiviert. Die Kultivierungsdauer erstreckte sich je nach Versuch über 1, 2, 4 oder 7 Tage. Zur Kontrolle wurde der jeweilige Zelltyp in Abwesenheit der Cyanobakterien im gleichen Verdünnungsverhältnis des spezifischen Zellmediums in A-D7-Medium kultiviert. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt.



**Abbildung 5: Indirekte Kokultivierung mit Zellkultureinsätzen (Inserts) – erstellt mit BioRender.com**

Schematische Darstellung der Anwendung von Zellkultureinsätzen (Inserts), die über eine Membran im Kulturboden mit 0,4 µm große Poren einen regelmäßigen Medium- und Sauerstoffaustausch zwischen der Bakteriensuspension und der Zellkultur ermöglichen. Dabei sind die Inserts ca. 0,2 cm in das Kulturmedium eingetaucht. Die Lichtquelle ermöglicht eine kontinuierliche Sauerstoffproduktion durch Photosynthese der Mikroorganismen.

Für die Auswertung der Zellen und Bakterien wurde auf verschiedene Methoden dieser Arbeit zurückgegriffen. Die zytotoxische Wirkung der Cyanobakterien sowie deren A-D7-Kulturmedium auf humane dermale Zellen wurde mit Hilfe des Laktatdehydrogenase-Assays bestimmt. Um die Anzahl der Cyanobakterien in jeder Vertiefung zu bestimmen, wurden diese, nach mehrmaligem Resuspendieren unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer wie zuvor beschrieben, gezählt. Nach dem Absaugen der Bakteriensuspension oder der Entfernung der entsprechenden Zellkultureinsätze wurden die Zellen mit 1 ml DPBS (Biochrome GmbH) mehrmals gespült, um mögliche Bakterienrückstände zu entfernen. Unter Verwendung eines Hellfeldmikroskops (Axio Observer, Zeiss) wurden Bilder der Kulturen aufgenommen und die

Anzahl der Zellen durch eine verblindete digitale Bildanalyse unter Verwendung des ImageJ-Zellzählers (ImageJ V-1.52A [157]) bestimmt. Die metabolische Aktivität und die Proliferation der verschiedenen Zelllinien wurde mit den nachfolgend beschriebenen Assays untersucht. Im Falle der indirekten Kokulturen wurden die besiedelten Zellkultureinsätze zur Auswertung übergangsweise in 500 µl sterilem DPBS platziert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellkultureinsätze wieder in die Vertiefungen zurückgesetzt.

#### **4.2.8.1 Kokultur der LECs mit SynHA**

Zur Herstellung einer Kokultur wurden LECs (lymphendotheliale Zellen) in einer Dichte von  $6 \cdot 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in 1 ml Wachstumsmedium (ECGM MV2) in einer Oxodish OD 24-Wellplatte (PreSens) ausgesät und der Zellkultur *Syn 7002* Cyanobakterien in einem Verhältnis von 1:150 hinzugegeben. Für die Herstellung einer indirekten Kokultur wurden 500 µl der Bakteriensuspension in Zellkultureinsätze (Inserts) pipettiert, sodass die Medien im Verhältnis von 1:2 verdünnt wurden. Eine direkte Kokultur entstand durch Zugabe von 1 ml Bakteriensuspension mit der gleichen Bakterienzahl direkt in das Well, was eine 1:1 Verdünnung der Medien zur Folge hatte.

#### **4.2.8.2 Kokultur der 3T3-Fibroblasten mit SynHA**

Zur Kokultivierung der 3T3-Fibroblasten wurden diese in einer Dichte von  $2 \cdot 10^4$  pro  $\text{cm}^2$  in einer Oxodish OD-24 Wellplatte (PreSens) ausgesät und mit einer Cyanobakterienzahl im Verhältnis von 1:5, 1:25 oder 1:250 je nach Versuchsbedingung ergänzt. Hierfür wurden 500 µl Bakteriensuspension als direkte oder indirekte Kokultur in 500 µl DMEM mit 20 % FBS der Zellkultur verdünnt.

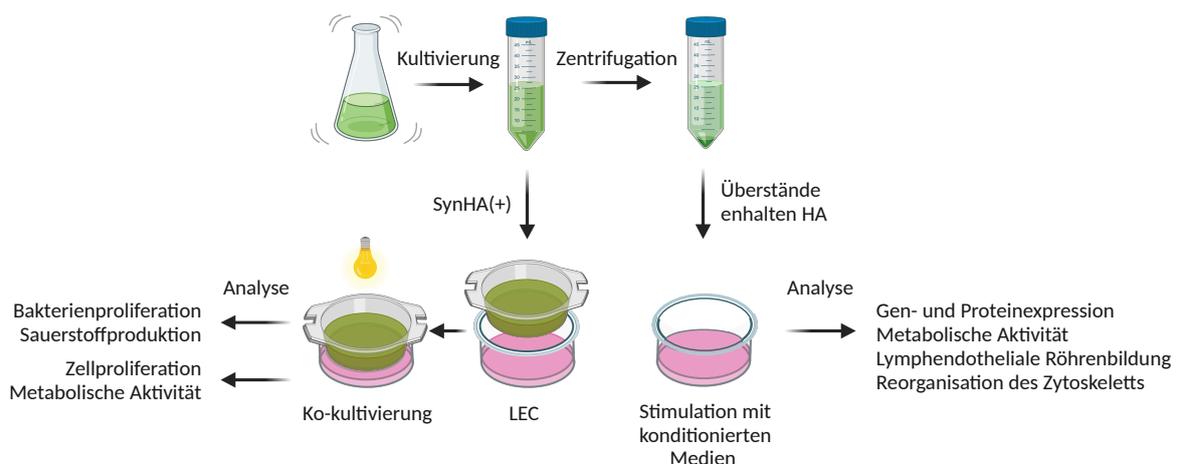
#### **4.2.8.3 Kokultur der HaCaT-Keratinocyten mit SynHA**

$1,5 \cdot 10^4$  Keratinocyten pro  $\text{cm}^2$  wurden mit Cyanobakterien im Verhältnis von 1:250 in einer Oxodish OD 24-Wellplatte (PreSens) kokultiviert. Dazu wurde in jedem Well 500 µl A-D7-Medium der Bakteriensuspension mit 500 µl DMEM, ergänzt mit 20 % FBS, verdünnt.

### **4.2.9 Stimulation der Zellen mit konditionierten Medien**

Stimulationsversuche wurden an humanen dermalen lymphendothelialen Zellen (LEC) zur Untersuchung der Auswirkungen auf die Lymphangiogenese durchgeführt. Konditionierte Zellkulturmedien wurden, wie in Abbildung 6 dargestellt, durch Verdünnung der gesammelten Überstände der Cyanobakterien im Verhältnis von 1:100 hergestellt. Für die Verdünnung

erfolgte entweder im LEC-Wachstumsmedium (ECGM MV2, PromoCell) oder in ergänzungsfreiem Basalmedium (ECBM MV, PromoCell). Alle Medien hatten einen Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Amphotericin B. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt der von Bakterien synthetisierter Hyaluronsäure ausschließlich an lymphendothelialen Zellen (LEC) untersucht. Hierfür wurden Lymphendothelzellen in der Dichte des entsprechenden Versuchsaufbaus wie bereits beschrieben kultiviert. Am Vortag des jeweiligen Versuches wurden die LECs für mindestens 8h unter Ausschluss von Wachstumsfaktoren in einen Hungerzustand versetzt, indem das reguläre Wachstumsmedium (ECGM MV2, PromoCell) durch wachstumsfaktorfreies Basal Medium (ECBM MV, PromoCell) supplementiert mit 0,2 % FBS (Biochrom GmbH), 1 % Amphotericin B und 1 % Penicillin/Streptomycin ersetzt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit den Bakterienüberständen des stimulierten und nicht stimulierten SynHA-Stamms HA12 entsprechend des jeweiligen Versuchs bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als negative Kontrolle diente die Inkubation der Zellen in Antibiotika ergänztem Basal Medium ohne Wachstumsfaktoren.



**Abbildung 6: Übersicht des Arbeitsablaufs zur Herstellung konditionierter Medien und Kokulturen – erstellt mit Biorender.com**

Schematische Skizzierung der Gewinnung von Bakterienüberständen, die abhängig von der IPTG-Stimulation Hyaluronsäure enthielten. Durch die Zugabe der Überstände in das Zellkulturmedium wurden konditionierte Medien erstellt, deren Einfluss auf die Lymphangiogenese in weiteren Versuchen untersucht wurde. Davon abzugrenzen ist die Herstellung von Kokulturen zur Analyse der Biokompatibilität beider Organismen und des Einflusses des produzierten Sauerstoffs der Bakterien auf das Zellverhalten unter Hypoxie.

## 4.3 Methoden zur Beurteilung der Zellmorphologie

### 4.3.1 AlamarBlue-Assay

Zur Quantifizierung der Stoffwechselaktivität der verschiedenen Zelllinien wurde der AlamarBlue-Assay (AlamarBlue Cell Viability Reagent, Invitrogen™) durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen in einer Dichte von  $7 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> als Triplikate in einer 24-Well Platte ausgesät und für 2 Stunden zur Adhärenz gebracht. Konditionierte Medien oder indirekte bzw. direkte Kokulturen wurden wie zuvor in 4.1.7 beschrieben hergestellt und die Kulturen entsprechend dem jeweiligen Versuch behandelt. Zu jedem experimentellen Zeitpunkt wurden die Zellen dreifach mit 500 µl PBS gewaschen, um mögliche Rückstände zu vermeiden. Anschließend wurde das reguläre Zellmedium abgesaugt und durch 1ml AlamarBlue-Arbeitslösung (0,1 mg/ml in zellspezifischem Medium) ersetzt. Die metabolische Aktivität der LECs wurde im Wachstumsmedium (ECGM MV2, PromoCell) gemessen. Für 3T3 Fibroblasten und HaCaT Keratinozyten wurde auf DMEM ohne Phenolrot (Gibco, Thermo Fisher Scientific) zurückgegriffen, um eine zusätzliche photometrische Absorption durch Phenolrot zu vermeiden. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden unter Lichtausschluss in einem Standardbrutschrank (HERACell Vios 160i) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, je nach Versuchsbedingung mit oder ohne Hypoxie (1 % pO<sub>2</sub>). Die Enzymaktivität war dabei von der Temperatur, der Zellzahl und der metabolischen Aktivität abhängig. Triplikate der AlamarBlue-Arbeitslösung wurden als Blindproben hergestellt und unter den gleichen Bedingungen behandelt. Nach der Inkubation wurden 100 µl der Suspension auf eine schwarze 96-Well Platte transferiert und die Lebensfähigkeit der Zellen unter Verwendung eines Fluoreszenzplattenlesegeräts (Infinite M Plex, TECAN) bei einer Wellenlänge von 560 nm / 590 nm (Extinktion / Emission) bestimmt. Von den Messwerten wurde der Blindwert abgezogen und der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Werte bestimmt. Nach erfolgter Messung wurde die AlamarBlue-Arbeitslösung durch ein für das jeweilige Experiment geeignetes Medium zur weiteren Inkubation ersetzt.

### 4.3.2 PicoGreen-Assay

Zur Durchführung eines PicoGreen-Assays wurden Zellen in einer Dichte von  $2 \cdot 10^4$  pro cm<sup>2</sup> in einer 24-Well Platte als Triplikate für 1 bis 7 Tage je nach Versuchsbedingung kultiviert. Nach der entsprechenden Versuchsdauer wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, vom Gefäßboden abgelöst und durch scharfes Absaugen in einem 2 ml Eppendorf Gefäß gesammelt. Die Proben wurden bei 5000 g für 5 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C) und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde bei -20 °C gelagert. Zur

Herstellung einer Standardreihe wurde eine Standardprobe mit 80 ng/ $\mu$ g DNA-Gehalt in 150  $\mu$ l sterilem destilliertem Wasser aufgelöst. Es wurden 25  $\mu$ l mit 2  $\mu$ g DNA entnommen und mit 975  $\mu$ l sterilem destilliertem Wasser zu einer Ausgangsprobe mit einer DNA-Konzentration von 2  $\mu$ g/ml verdünnt. Von der Ausgangsprobe wurden 500  $\mu$ l in ein zweites Eppendorf Gefäß mit bereits vorgelegten 500  $\mu$ l destilliertem Wasser übertragen und mehrfach resuspendiert. Dieser Schritt wurde zwölfmal wiederholt und eine Verdünnungsreihe bis zu einer Konzentration von 1,95 ng/ml fortgesetzt. Als Blindwert diente eine Probe mit reinem destilliertem Wasser.

Das gefrorene Zellpellet wurde bei RT aufgetaut und mit 100  $\mu$ l Proteinase K Arbeitslösung zusammen mit einer Kugel von 7 mm Durchmesser für 10 min bei 50 Hz in einem TissueLyser LT (Qiagen) aufgelöst. Es wurden weitere 900  $\mu$ l Proteinase K Arbeitslösung zugegeben und die Zellen über Nacht bei 56 °C und 1000 rpm in einem Thermocycler (Eppendorf) lysiert. Bei -20 °C wurde die Lyse gestoppt und die Proben für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C). 75  $\mu$ l des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß transferiert, in welchem bereits 225  $\mu$ l TE-Puffer vorgelegt waren. Nach mehrfachem Vortexen (Heidolph Reax Top) der Probenlösung wurden 100  $\mu$ l entnommen und in eine schwarze 96-Well Platte mit weiteren 100  $\mu$ l PicoGreen Farblösung pipettiert. Die Proben der Standardreihe wurden in gleicher Weise behandelt und ebenfalls mit der Farblösung gemischt. Die Inkubation der Proben erfolgte lichtgeschützt für 5 min bei RT. Anschließend wurde die Extinktion und Emission der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 504 nm / 550 nm (Ex./Em.) mit dem Fluoreszenz-Photometer (Infinite M Plex, TECAN) gemessen. Aus den Werten der Verdünnungsreihe konnte eine lineare Standardkurve erstellt werden, deren Funktion zur Bestimmung des DNA-Gehaltes der zu untersuchenden Proben diente. Dabei wurde zunächst der Blindwert von den quantifizierten Werten abgezogen sowie die zweifache Verdünnung berücksichtigt und mit dem Faktor 40 korrigiert. Abschließend wurden die ermittelten Fluoreszenzwerte als DNA-Menge in ng/ml der Proben dargestellt.

### 4.3.3 LDH-Assay

Zum Nachweis einer Zytotoxizität wurde die beim Zelltod freigesetzte Laktatdehydrogenase (LDH) im Kulturmedium gemessen. Die Zytotoxizität verhält sich dabei direkt proportional zur gemessenen LDH-Konzentration in den Zellkulturmedien. Für den LDH-Assay wurden  $2 \cdot 10^4$  3T3 Fibroblasten in einer 24-Well-Platte direkt und indirekt mit *Synechococcus* sp. 7002 wie bereits in 4.1.4 beschrieben kokultiviert. Zur Untersuchung des toxischen Potenzials des reinen A-D7-Mediums der Cyanobakterien auf humane Zellen wurden 3T3 Fibroblasten in DMEM 1:1 verdünnt in A-D7-Medium als Triplikate kultiviert. Nach der Inkubation bei 37 °C

und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre für 2, 4 oder 7 Tage, wurde das Medium entnommen und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei 4 °C übergangsweise aufbewahrt. Vor Durchführung des Assays wurden die Proben aufgetaut, resuspendiert und 50 µl in eine transparente 96-Well Platte in technischen Triplikaten pipettiert. Als Kontrolle wurde die gleiche 1:1 Verdünnung beider Medien herangezogen, allerdings ohne vorherige Verwendung in der Zellkultur. Jeder Probe wurden 50 µl LDH-Assay-Lösung (Invitrogen™) mit einer elektronischen Pipette (Easypet, Eppendorf) zugegeben und lichtgeschützt für 30 min bei RT inkubiert. Durch die Laktatdehydrogenaseaktivität erfolgte eine gekoppelte enzymatische Reaktion, bei der LDH Laktat zu Pyruvat oxidiert, das anschließend mit Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT) unter Bildung von Formazan reagiert. Anschließend wurde die Absorption von Formazan bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm photometrisch gemessen (Plate Reader Infinite M Plex, TECAN), Mittelwerte gebildet und grafisch dargestellt.

#### 4.3.4 Wachstumskinetik

Um die Proliferation der Zellen zu analysieren, wurde die Wachstumskinetik der verschiedenen Zelllinien bestimmt. Hierfür wurden  $2 \cdot 10^4$  pro cm<sup>2</sup> Zellen in eine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) als Triplikate ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter hypoxischen oder normoxischen Bedingungen je nach Versuchsbedingungen kultiviert. Die Auswertung erfolgte nach 1, 4 und 7 Tagen durch Bestimmung der jeweiligen Zellzahl. Die gesammelte Zellsuspension wurde, wie bereits beschrieben, in einem Cell Counting Chamber Slide (Invitrogen™) pipettiert und die Zellzahl sowie die Zellvitalität mit dem Countess 2 FL (Invitrogen™) bestimmt. Alternativ wurde die Anzahl der Zellen nach fotografischen Aufnahmen der Kulturen über das Mikroskop mit Kameraaufsatz (Axio Observer, Zeiss) mittels verblindeter digitaler Bildanalyse unter Verwendung des ImageJ-Zellzählers (ImageJ V-1.52A [157]) quantifiziert. Die Verdopplungszeit (Generationszeit)  $d(t)$  beschreibt die Dauer zwischen zwei aufeinanderfolgenden Teilungen einer Zelle und wurde mit nachfolgender Formel errechnet.

$$\frac{\log(2) \times t(h)}{\log(N) - \log(N_0)} = d(t) \text{ Verdopplungszeit}$$

##### Formel 5: Verdopplungszeit [158]

N = Zellzahl nach Kulturdauer;  
N<sub>0</sub> = Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt 0;  
t(h) = Kulturdauer in Stunden.

### 4.3.5 Tube-Formation-Assay

Um das lymphangiogene Potential der sezernierten Hyaluronsäure von SynHA-Cyanobakterien zu bestimmen, wurde der Tube-Formation-Assay mit lymphendothelialen Zellen (LEC) durchgeführt. Am Vortag des Versuchs wurden die LECs in dem jeweiligen Zellkulturgefäß für 8 Stunden in wachstumsfaktorfreiem Basalmedium mit 0,2 % FBS, 1 % Amphotericin B und 1 % Penicillin / Streptomycin einer Nährstoffverarmung unterzogen. Anschließend wurden 60 µl Geltrex™ (LDVE-freie Basismembranmatrix mit reduziertem Wachstumsfaktor; Gibco™, Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben in eine vorgekühlte 96-Wellplatte für 1 Stunde bei 37 °C polymerisiert. Die ausgehungerten Zellen wurden abtrypsinisiert, in 100 µl Basalmedium (ECBM, PromoCell) resuspendiert und als Triplikate mit einer Dichte von  $1,6 \cdot 10^4$  Zellen über die mit Geltrex™ beschichteten Wells ausgesät. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben zusätzlich mit 100 µl konditioniertem Medium stimuliert, wobei ein Verhältnis von 1:100 mit den jeweiligen Bakterienüberständen in jedem Well erreicht wurde. Die Inkubation erfolgte in einem Standardbrutschrank unter Normoxie bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden.

Um die Kombination der lymphangiogenen und photosynthetischen Wirkung von Cyanobakterien zu bewerten, wurde der Tube-Formation-Assay unter Hypoxie (1 % pO<sub>2</sub>) mit *Syn 7002* besiedelten Scaffolds analysiert. Dazu wurden  $1 \cdot 10^8$  SynHA-Cyanobakterien des Stammes HA03 in eine Kollagen-Matrix (IDRT, Integra © Matrix Life Science Cooperation) mit 5 mm Durchmesser mit wie zuvor beschrieben, jedoch unter Verwendung proportionaler Volumina von 25 µl Thrombin, 25 µl Fibrinogen und 25 µl A-D7-Medium, ausgesät. Die photosynthetischen Scaffolds wurden auf dem Kulturmedium schwimmend über die ausgesäten LECs gelegt und für 8 Stunden wie zuvor beschrieben, aber unter Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>) und kontinuierlicher Belichtung in einem Brutschrank inkubiert, wie in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

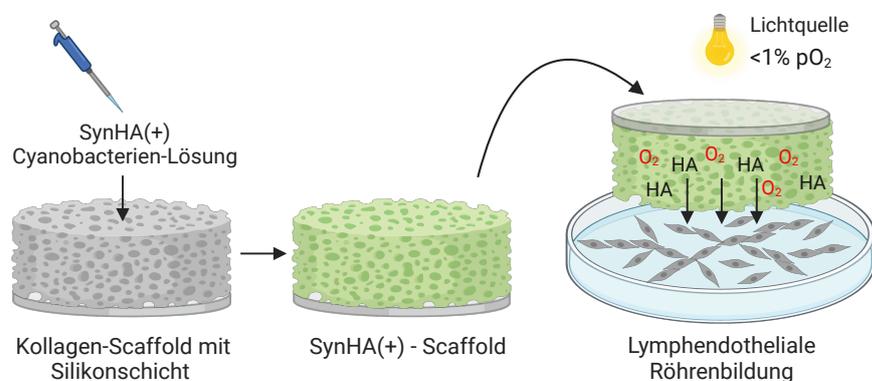
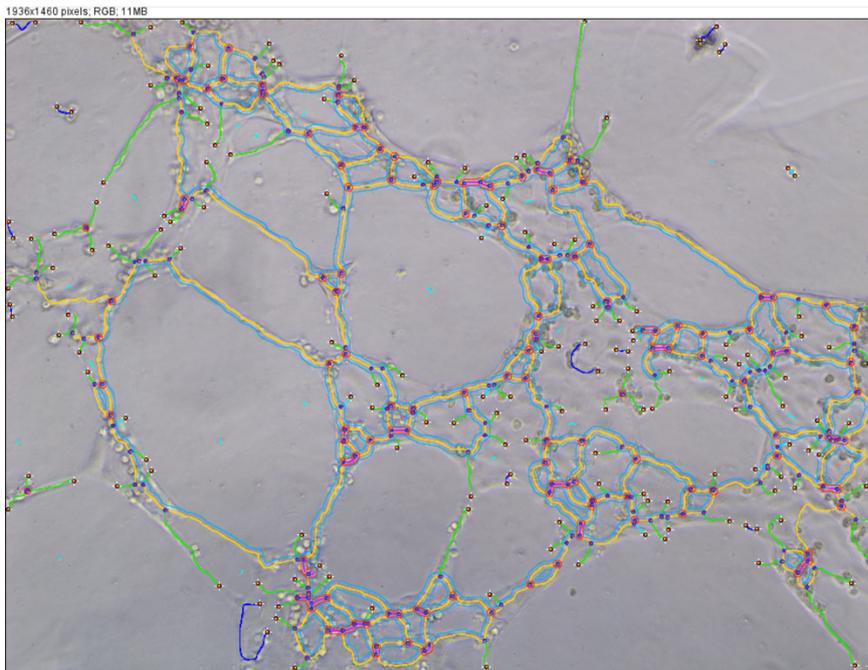


Abbildung 7: Tube-Formation-Assay mit bioaktivierten Scaffolds – erstellt mit BioRender.com

Schematische Darstellung der Herstellung bioaktiver Scaffolds zur Induktion der lymphendothelialen Röhrenbildung. Das besiedelte Scaffold wird schwimmend dem Kulturmedium beifügt. Die Inkubation erfolgt unter Hypoxie bei konstanter Illumination.

Als Negativkontrollen wurden LECs einbezogen, die in reinem Basalmedium (ECBM MV, PromoCell) ohne Scaffold oder konditioniertes Medium kultiviert wurden. Die Röhrenbildung wurde unter Verwendung eines Hellfeldmikroskops (Axio Observer, Zeiss) abgebildet. Die gesamte Röhrenlänge, Anzahl der Knoten, Übergänge und Segmente des lymphatischen Gefäßnetzwerkes wurden durch Analyse einer verblindeten Auswahl an Bildern unter Verwendung der ImageJ Angiogenesis Analyzer-Software (ImageJ V-1.52A, [159]) anhand festgelegter Parameter quantifiziert und relativ zur Negativkontrolle dargestellt (Fold Change). Abbildung 8 zeigt ein repräsentatives Beispiel der Analyseparameter der ImageJ Angiogenesis Analyzer-Software.



**Abbildung 8: Analyseparameter ImageJ Angiogenesis Analyzer-Software**

Anhand des Beispielbildes lassen sich die verschiedenen verwendeten Parameter zur Analyse des lymphatischen Gefäßsystems darstellen. Die Gesamtröhrlänge wurde als Summe der Länge aller Segmente (gelb), isolierten Elemente (blau) und Gefäßäste (grün) im analysierten Bereich definiert. Knoten (roter Punkt) wurden als Pixel mit 3 benachbarten kreisförmigen Punkten erkannt, während Verzweigungspunkte (roter Kreis) durch Zusammentreffen und Verschmelzen von mindestens 3 Knoten im gebildeten lymphatischen Gefäßnetzwerk entstanden. Segmente (gelb) stellen eine Verbindung zwischen einzelnen Lymphzellen dar. Die Einheit der Bildfläche und der Bildlänge hat sich auf Pixel (Pixel = 264,58  $\mu\text{m}$ ) bezogen [159].

## 4.4 Molekularbiologische Methoden

### 4.4.1 Vorbereitung und Gewinnung der Proben

Der Effekt der Hyaluronsäure auf lymphendotheliale Zellen wurde anhand der Genexpression lymphangiogenesespezifischer Marker untersucht. Für jede experimentelle Kondition wurden  $1 \cdot 10^6$  LECs als Triplikate in einer Zellkulturflasche ( $75 \text{ cm}^2$ ) bis zu einer Konfluenz von 80% bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in Wachstumsmedium ECGM MV2 (PromoCell) wie bereits beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden über Nacht für 8 Stunden in einen Hungerzustand versetzt und anschließend 4 Tage durch Zugabe konditionierter Medien mit dem 1:100-fach verdünnten Überstand der durch IPTG induzierten SynHA (+) und nicht induzierten SynHA (-) Bakterien stimuliert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin/EDTA (Biochrom GmbH) vom Flaschenboden gelöst und in einem 15 ml Falcon gesammelt. Die Suspension wurde bei  $300 \text{ g}$  zentrifugiert (Heraeus Megafuge 40R, Thermo Fisher Scientific), der Überstand verworfen, sowie das gewonnene Zellpellet in  $100 \text{ } \mu\text{l}$  RNA Later (Quiagen) mehrfach resuspendiert, gevortext und bei  $\text{minus } 80 \text{ }^\circ\text{C}$  (Thermo Fisher Scientific) übergangsweise gelagert. Die in Abwesenheit der Bakterienüberstände, in regulärem Wachstumsmedium ECGM MV2 (PromoCell) inkubierten Zellen dienten als Kontrollbedingung verwendet.

### 4.4.2 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen REF 74104) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Zuvor wurde der Arbeitsplatz und die verwendeten Instrumente mit Diethylpyrocarbonat-Lösung (DEPC, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und RNase Reiniger (Carl Roth GmbH) gesäubert. Die zu untersuchenden Proben wurden im Wasserbad bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für 2 min aufgetaut und mit  $350 \text{ } \mu\text{l}$  des im Kit enthaltenen RLT-Lysepuffers, supplementiert mit 1 % Beta-Mercaptoethanol ( $10 \text{ } \mu\text{l}/\text{ml}$ ) versetzt. Die Zellen wurden für 5 min bei  $750 \text{ rpm}$  und  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  in einem Thermocycler (Eppendorf) lysiert. Anschließend wurden die Proben für 3 min bei  $14.000 \text{ rpm}$  abzentrifugiert und der Überstand in ein im Kit bereitgestellten Sammelgefäß (Collection Tube) transferiert. Das zurückgebliebene Zellpellet wurde mehrfach mit  $200 \text{ } \mu\text{l}$  RLT-Lysepuffer, wie oben beschrieben, behandelt, bis das gesamte Pellet aufgelöst war. Das Lysat wurde im Verhältnis von 1:1 in 70 % Ethanol (Merck KGaA) verdünnt und gevortext. Die RNA-Gewinnung erfolgte durch Filtration in mehreren Schritten, indem mehrmals  $700 \text{ } \mu\text{l}$  des Lysates in das im Kit enthaltene Spinsäulensystem (Spin Column) pipettiert und bei  $10.000 \text{ rpm}$  für 1 min zentrifugiert wurden. Das Anhaften an die Gefäßwand wurde durch das Auffangen der gewonnenen RNA in einem speziell beschichteten und im Kit

bereitgestellten LoBind Gefäß vermieden. Um mögliche Rückstände zu verhindern, wurde das Spinsäulensystem mit 700 µl RNase freiem Wasser (RW1) und anschließend zweifach mit 500 µl Ethanol Puffer (RPE) gespült und jeweils für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die RNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert. Die Reinheit, sowie die RNA-Konzentration in ng/µl wurde mit einem NanoDrop-Spektrometer (IMPLEN P300 Nanophotometer) nachgewiesen. Hierfür wurden 4 µl der Proben auf die Linse pipettiert und die Proben photometrisch mit den Einstellungen Lidfaktor: 10 und Dilution-Faktor: 1000, gemessen. Als Blindwert dienten 4 µl RNase freies Wasser. Bei einem DNA-Hintergrund <2 wurde die Probe als verunreinigt bewertet und verworfen.

#### 4.4.3 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde aus 1 µg RNA unter Verwendung des Transcriptor First Strand cDNA-Synthese-Kit (Roche REF 048970300001) gemäß dem Protokoll des Herstellers erzeugt. Vor Beginn der cDNA-Synthese wurde der Arbeitsplatz mit sterilem destilliertem Wasser (DEPC, Carl Roth GmbH) und DNase-Reiniger (Carl Roth GmbH) gesäubert. Anschließend wurden die RNA-Proben aufgetaut, gevortext und kurz abzentrifugiert, sowie für die gesamte Versuchsdauer auf Eis gekühlt. Alle Versuche wurden in speziell beschichteten LoBind-Tubes (Eppendorf) durchgeführt. Im ersten Schritt wurden pro Probe 5 µl der 500 µg/µl synthetisierten RNA mit 1 µl Oligo dt-Nukleotide und 2 µl Random-Hexamere, sowie 5 µl H<sub>2</sub>O ergänzt. Die enthaltenen Zellproteine wurden bei 65 °C für 10 min in einem Thermocycler (TProfessional Basic, Biometra GmbH) denaturiert. Die Proben wurden übergangsweise auf Eis gelagert und mit dem in Tabelle 9 zusammengefassten Master-Mix zu einem Gesamtvolumen von 20 µl durch Zugabe der noch fehlenden Komponenten in jeder Probe erstellt. Die cDNA-Synthese wurde in einem Thermocycler mit nachfolgendem Schema durchgeführt: 10 min bei 25 °C, 60 min bei 50 °C, gefolgt von 5 min bei 85 °C. Die gesammelte cDNA wurde bis zur weiteren Analyse in Aliquots bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle wurde aus der im Kit enthaltenen RNA-Probe mit 50 µg/µl parallel auf gleiche Weise cDNA synthetisiert.

Reagenz	Volumen
RNA	5 µl
Oligo-dt-Nukleotide	1 µl
Random-Hexamere	2 µl
H <sub>2</sub> O	5 µl
Buffer 5x	4 µl
Protector RNase	0,5 µl
Deoxynucleotid Mix	2 µl
Transcriptor Reverse	0,5 µl

Tabelle 10: Master-Mix cDNA-Synthese

#### 4.4.4 Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR)

Für die Durchführung der RT-qPCR wurde auf das SYBR-GREEN basierende InnuMIX DS Green Standard Kit (Analytik-Jena REF 845-AS-1320100) zurückgegriffen. Die für dieses Experiment verwendeten Primersequenzen (5'-3') stammen von Hirakawa et al., 2003 [160] und sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die qPCR-Primer wurden unter Verwendung der OligoArchitect™ Primer-Software von Sigma-Aldrich entworfen und synthetisiert. Zur Herstellung einer 100-µM-Primerlösung wurden die Proben der Primer in einem vom Hersteller angegebenen Volumen von sterilem destilliertem Wasser (DEPC, Carl Roth GmbH) gelöst. Die Lösungen wurde bei 750 rpm und 23 °C für 10 min in einem Thermocycler (Eppendorf) inkubiert. 10 µl der Primerlösung wurde in 40 µl DEPC-Wasser (Carl Roth GmbH) verdünnt und bis zur Verwendung als Aliquots bei -20 °C gelagert. 15 µl des in Tabelle 11 zusammengefassten SYBR-GREEN Standard Mastermix wurden in eine vorgekühlte im Kit bereitgestellte 96-Wellplatte pipettiert und reagierten mit 5 µl cDNA-Template. Die Proben wurden mit einer Folie überklebt und bei 1000 g für 1 min bei RT abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 40R, Thermo Fisher Scientific). Die Amplifikation erfolgte in einem qPCR Tower-3 G (Analytik-Jena) nach dem Schema: 95 °C für 2 min, gefolgt von 50 Zyklen mit 95 °C für 30 s, 60 °C für 1 min und 68 °C für 30 s. Die Expressionsdaten wurden basierend auf dem Expressionsniveau des Haushaltsgens Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (HRPT1) normalisiert. Der gesamte Versuch wurde als Triplikate durchgeführt und die Mittelwerte zur statistischen Auswertung herangezogen. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Kits wurde der Versuch parallel bei einer negativen Kontrolle mit sterilem destilliertem Wasser und einer positiven Kontrolle mit 50 µg/µl cDNA durchgeführt.

Gene	Fwd Primer	Rev Primer
HRPT1	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
LYVE-1	AGCTATGGCTGGGTTGGAGA	CCCCATTTTTCCCACACTTG
Podoplanin	AGGCGGCGTTGCCAT	GTCTTCGCTGGTTCCTGGAG
Prox-1	ACAAAATGGTGGCACGGA	CCTGATGTACTTCGGAGCCTG
VEGF-C	CACCACCAAACATGCAGCTG	TGAAAATCCTGGCTCACAAAGC
VEGFR-3	TCTGCTACAGCTTCCAGGTGG	GCAGCCAGGTCTCTGTGGAT

Tabelle 11: Primer Sequenzen (5'-3')

Reagenz	Volumen
DSG-Standard	10 µl
Fw Primer 0,4 µM	1 µl
Rev Primer 0,4 µM	1 µl
H <sub>2</sub> O	3 µl
cDNA 100 ng/µl	5 µl

Tabelle 12: SYBR-GREEN Standard Mastermix RT-qPCR

## 4.5 Immunhistologische Methoden

### 4.5.1 Immunfluoreszenz

Um den Einfluss von bakteriensezernierter Hyaluronsäure auf die Rezeptoren VEGFR-3 und LYVE-1, sowie auf das Aktinzytoskelett in lymphendothelialen Zellen zu analysieren, wurde die Expression der Rezeptoren und die intrazellulären Veränderungen der F-Aktin-Filamente der LECs mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung detektiert. Dazu wurden  $8 \cdot 10^4$  Zellen in Zellkammern (CultureSlides, Falcon® Corning) ausgesät und über Nacht unter Standardkulturbedingungen in 1 ml ECGM MV2 (PromoCell) mit 1 % Amphotericin B und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Kulturmedium der adhärennten Zellen wurde für 8h durch wachstumsfaktorfreies Basalmedium (PromoCell) wie bereits beschrieben ersetzt, um einen Hungerzustand in den Zellen zu erreichen. Die nährstoffverarmten Zellen wurden über 4 Tage in den unter 4.1.6 hergestellten konditionierten Medien mit in einem Verhältnis von 1:100 verdünnten Bakterienüberständen Syn (HA+) und Syn (HA-), inkubiert. LECs wurden in 500 µl PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific) für 3-5 min gewaschen und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur in 3,5 % Formaldehyd (Otto Fischer GmbH) fixiert. Es folgten 3 weitere Waschschrirte mit 500 µl PBS für 3-5 min. Um das intrazelluläre Eindringen der Antikörper durch die Aldehyd Fixierung zu ermöglichen, wurden die Zellen für 15 Minuten mit 500 µl 0,1 % Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific) in PBS (Biochrom GmbH) pro Kammer permeabilisiert. Zur Vermeidung unspezifischer Kreuzreaktionen wurden die Zellen für 1 Stunde in serumhaltigen PBS (Biochrom GmbH) mit 0,1 % Tween®-20 (Thermo Fisher Scientific), 10 % BSA (Bovine Serumalbumin, Carl Roth GmbH + Co. KG) und 1% FBS (Gibco; Thermo Fisher Scientific) blockiert. Nach Abgießen der Blockreagenzien wurden den Zellen die entsprechenden Primär- und/oder Sekundärantikörper oder ein Fluoreszenzfarbstoff zugegeben. Zur Kontrolle wurden Zellkammern (CultureSlides) in Abwesenheit des Primärantikörpers behandelt.

#### 4.5.1.1 Immunhistochemische Färbung von LYVE-1 und VEGFR-3

Zum Nachweis der Rezeptorexpression von LYVE-1 und VEGFR-3 wurden die Zellen in 2 µg/ml des Primärantikörpers Anti-LYVE-1-Rezeptor (Abcam; ab14917) oder Anti-VEGFR-3-Rezeptor (BIOZOL; A01276-3), verdünnt in PBS-T (0,1 % Tween-20, 5 % BSA, 0,5 % FBS) im Verhältnis von 1:500, bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach drei Waschschrirten mit PBS-T für 3-5 min erfolgte die lichtgeschützte Inkubation der Objektträger mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper Anti-IgG-Alexa 488-Fluor (Invitrogen™) bei 4 °C über Nacht. Der Antikörper wurde hierfür 1:1000 in PBS-T zu einer Konzentration von 1 µg/ml

verdünnt. Zudem wurde die DNA der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; Invitrogen™) markiert. Für jede Kondition wurden in 20- und 40-facher Vergrößerung mikroskopische Bilder von 10 zufällig ausgewählten Feldern gemacht (Axio Observer, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die vom Proteinsignal bedeckte Fläche wurde durch die Bildanalyse (ImageJ, V-1.52A) prozentual quantifiziert und im Verhältnis zur gesamten Zelloberfläche normalisiert.

#### **4.5.1.2 Immunhistochemische Färbung der F-Aktin-Filamente in LECs**

Um den Einfluss der Hyaluronsäure auf den Umbau der F-Aktin-Fasern in LECs zu analysieren, wurden die Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Phalloidin-Alexa 488 (Invitrogen™) gefärbt. Das gekoppelte bityclische Peptid wurde in PBS-T im Verhältnis von 1:1000 verdünnt und die Schnitte anschließend vollständig benetzt. Zur selektiven Bindung des Phalloidin an F-Aktin erfolgte die Inkubation lichtgeschützt bei 4 °C über Nacht. Es folgten drei Waschschrte mit 500 µl PBS-T (0,1 % Tween-20, 5 % BSA, 0,5 % FBS) für 3-5 min. Zur Auswertung wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Axio Observer, Zeiss) bei 20- und 40-facher Vergrößerung Aufnahmen der Zellen gemacht und das Aktin-Zytoskelett von zufällig ausgewählten Bildern analysiert. Untersucht wurden die von Wu et al. 2014 [60] beschriebenen morphologischen Veränderungen, wie die Verteilung und Intensivierung der F-Aktin-Fasern, Ausbildung von rosettenartigen Punkten, sowie Verformung der Zellmembran durch stachelartige Ausläufer.

#### **4.5.2 Immunhistologischer Nachweis von Hyaluronsäure (b-HABP-Assay)**

Der immunhistochemische Nachweis von sezernierter Hyaluronsäure der Bakterien in besiedelten Kollagen-Matrizes erfolgte unter kombinierter Anwendung des biotinylierten Hyaluronan Bindungsproteins (b-HABP, Versican G1 domain, AMS Biotechnology) und des HRP/DAB-Detektionskits (IHC-Kit, ab 64261 Abcam) zur Freisetzung eines chromogenen Reaktionsproduktes. In der Versuchsvorbereitung wurden Scaffolds mit  $1 \cdot 10^8$  IPTG-induzierten Cyanobakterien (SynHA+), wie bereits in 4.1.3 beschrieben, unter sterilen Bedingungen hergestellt und für 3 Tage in A-D7-Medium, supplementiert mit IPTG im Verhältnis von 1:1000, kultiviert.

##### **4.5.2.1 Fixierung und Herstellung von Paraffinschnitte**

Die Bakterien besiedelten Scaffolds wurden in Sammelkassetten (Histosette® 2 with Lid; Simport) platziert und übergangsweise in 100 % Isopropanol (Otto Fischar GmbH & Co. KG) gelagert. Die Scaffolds wurden zunächst in einem Vacuum Infiltration-Tissue-Processor

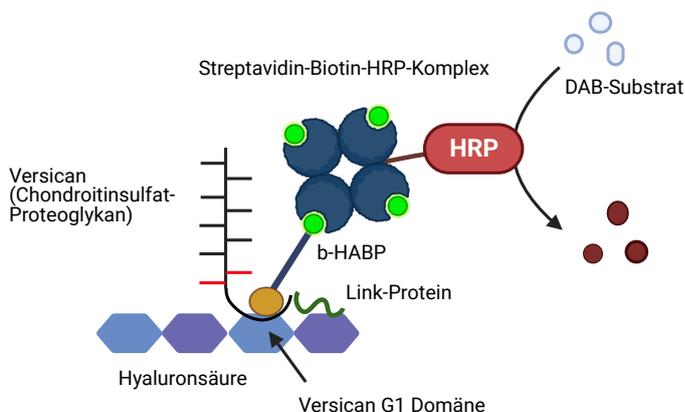
(Tissue-Tek®VIP®6; Sakura Seiki Co. Ltd) in einer wässrigen neutral-gepufferten 10 %-igen Formaldehydlösung (Otto Fischar GmbH & Co. KG) über Nacht bei 40 °C fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus Ethanol (Apotheke Großhadern) gemäß dem folgenden Schema dehydratisiert: 1 Stunde 10 % Formaldehyd bei 40 °C, 30 min 70 % ETOH bei 40 °C, 1 Stunde 70 % ETOH bei 40 °C, 2 × 1 Stunde 96 % ETOH bei 40 °C, 3 × 1 Stunde 100 % ETOH bei 40 °C. Es folgte eine zweifache Behandlung mit Tissue Clear® (Xylol Ersatz; Sakura Seiki Co. Ltd, REF: 1426) für 1h bei 40 °C und mit Paraffin bei 63 °C für jeweils 1 Stunde und erneut zweimal 30 min. Anschließend wurden die Kollagengerüste unter Verwendung einer Gussmaschine (AGS-W; RWW Medizintechnik) in heißes Paraffin (Tissue Tek® Paraffin Wax (TEK 3 Polymer; Sakura Seiki Co. Ltd, REF 451) in vorgefertigte Formen eingebettet und bei -15 °C auf einer Kühlplatte (Para-Cooler-T.W.; RWW Medizintechnik) verfestigt. 5 µm-Schnitte wurden unter Verwendung eines Rotationsmikrotoms (Mikrom HM 355S, Thermo Fisher Scientific) und den entsprechenden Klingen (Feather, Microtome Blades N35 Type) aus den Paraffinblöcken erstellt und in einem Gewebeflotationsbad (Tissue Flotation Bath TFB 45; Medite Medizintechnik) auf einen beschichteten Objektträger (Superfrost®Plus, Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific) aufgezogen. Die benetzten Objektträger wurden bei 68 °C für 1 Stunde auf einer Streckplatte (Meda X) platziert, um mögliche Faltenbildungen zu verlieren. Die Schnitte wurden in einem Wärmeschrank bei 70 °C (Memmert GmbH & Co. KG) über Nacht inkubiert und bei RT gelagert. Zur weiteren Behandlung folgte die Entparaffinierung und Rehydratisierung in einer absteigenden Xylol-Alkohol-Reihe (2 × 10 min Xylol, 2 min 100 % ETOH, 2 min 96 % ETOH, 2 min 80 % ETOH, 2 min 60 % ETOH, 5 min Aqua dest.).

#### **4.5.2.2 Enzymatische Vorbehandlung**

Jedem Blockierungs- und Antikörperinkubationsschritt folgten 2-3 Waschschrte mit PBS-Tween (0,1 % Tween-20) für 3-5 Minuten auf einem Schüttler. Die zu untersuchenden Schnitte wurden auf dem Objektträger für weitere Anwendungen mit einem hydrophoben Stift (PAP Pen Immunostaining 5 mm) zirkulär markiert, um einen Flüssigkeitsverlust zu vermeiden. Die Menge der zugeführten Reagenzien orientierte sich an der zu benetzenden markierten Oberfläche der Objektträger und wurde tröpfchenweise zugeführt. Die Blockierung endogener Peroxidasen in den jeweiligen Schnitten erfolgte durch Zugabe eines Wasserstoffperoxidblockes (HRP/DAB-Detektionskit IHC-Kit, ab 64261) und der Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte die Behandlung mit dem Avidin / Biotin-Blockierungssystem in separaten Lösungen (Avidin / Biotin-Blockierungssystem, BioLegend, 927301) für jeweils 20 min zur Unterdrückung unspezifischer Avidin/Biotin-Bindungsstellen. Weitere unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden mit Hilfe von 0,2 % Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific) und 2 % BSA, verdünnt in PBS, für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert.

#### 4.5.2.3 Hyaluronsäurenachweis mit der ABC-Technik

Die sensitive Detektion der Hyaluronsäure wurde durch Bildung des Streptavidin-Biotin-Komplex (ABC-Technik) ermöglicht. Streptavidin ist ein Protein aus *Streptomyces avidinii* und hat mit vier Bindungsstellen eine besonders hohe Affinität für Biotin [161]. Die vorbehandelten Schnitte wurden mit 2 µg/ml biotinyliertem Hyaluronan-Bindungsprotein (AMS Biotechnology, AMS.HKD-BC41), das im Verhältnis von 1:200 in PBS-Tween verdünnt wurde, bedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Kontrolle der sekundären Antikörperspezifität wurden Schnitte mit nur PBS-Tween in Abwesenheit des primären Antikörpers auf gleiche Weise inkubiert. Nach der Bindung des mit Biotin konjugierten Proteins an Hyaluronsäure wurde an das freie Biotin über einen in Abbildung 9 schematisch dargestellten, Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex mit einer Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase; HRP) gekoppelt. Die Streptavidinperoxidase (HRP/DAB-Detection IHC-Kit, ab 64261, Abcam) wurde auf die Objektträger pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Färbung der Schnitte wurde die 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Färbelösung (HRP/DAB-Detection IHC-Kit, ab 64261, Abcam) zusammengesetzt aus 30 µl DAB-Chromogen und 1,5 ml DAB-Substrat, für 5 min auf die Schnitte aufgetragen. Die Detektion der Hyaluronsäure basierte auf der Umsetzung des 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) durch die Peroxidasen (HRP) in ein chromogenes braunes, in Wasser unlösliches, Reaktionsprodukt. Die Objektträger wurden in der bereits genannten aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und mit Eindeckmedium (Tissue-Tek Glass®-Eindeckmedium, Sakura Finetek, CA, USA) bedeckt. Für die Auswertung wurden Bilder von mindestens 6 zufällig ausgewählten mikroskopischen Feldern pro Versuchsgruppe aufgenommen (Axio Observer, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Als Negativkontrolle wurden bakteriell-besiedelte Kollagen-Scaffolds vor den Blockierungsschritten für 2 Stunden bei 60 °C mit 20 mg/ml aus Rinderhoden gewonnene Hyaluronidase (1000 U/mg, Serva) behandelt, die in 100 mM Natriumacetatpuffer (Sigma-Aldrich) mit einem pH-Wert von 6,0 verdünnt war.



**Abbildung 9: Streptavidin-Biotin-HRP-Komplex** – Quelle: [161], [162] teilweise modifiziert mit BioRender.com

Das biotinylierte Hyaluronsäure Bindungsprotein (b-HAbP) bindet an die Verknüpfungsstelle von Hyaluronsäure mit Chondroitinsulfat-Proteoglykane, bekannt als Versican G1 Domäne. Das Biotin ist durch die Verbindung mit einer Streptavidinperoxidase Teil des Streptavidin-Biotin-HRP-Komplexes. Die Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase; HRP) setzt dabei 3,3'-Diaminobenzidin (DAB-Substrat) in ein chromogenes Reaktionsprodukt um.

## 4.6 Statistische und bioinformatische Methoden

Alle Experimente dieser Arbeit wurden in mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit mindestens 2 technischen Replikaten in jeder Versuchsgruppe durchgeführt. Die Auswertungen und grafischen Darstellungen der Messdaten erfolgten unter Verwendung von Microsoft Excel. Aus allen Messergebnissen wurden der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (STABWA) errechnet. Alle Daten wurden mit einem Box-Whisker-Plot grafisch dargestellt, auf die Normalverteilung getestet und das Lagemaß und Streuungsmaß bestimmt. Der Student-t-Test wurde zum Vergleich zwischen zwei unabhängigen Gruppen durchgeführt. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant angesehen, wenn  $p \leq 0,05$  (ns: nicht signifikant; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Die Ergebnisse wurden teilweise als Vielfaches der Mittelwerte, der negativen Kontrolle (Fold Change) dargestellt.

Einige in dieser Arbeit verwendeten schematischen Darstellungen wurden auf der gebührenpflichtigen Plattform [www.BioRender.com](http://www.BioRender.com) erstellt sowie die Lizenz zur Veröffentlichung erworben. Ergebnisse wurden in repräsentativen beispielhaften Abbildungen dargestellt.

Die qPCR-Primer wurden unter Verwendung der OligoArchitect™ Primer-Software von Sigma-Aldrich entworfen und synthetisiert. Die Auswertung von Bilddaten erfolgte über das öffentlich zugängliche Bildanalyse-Programm Image J V-1.52A von zufällig ausgewähltem Bildmaterial. ImageJ wurde zur Bestimmung der prozentualen Signalfäche der Proteinexpression von VEGFR3 und LYVE-1 im Verhältnis zur gesamten Zellfläche, sowie zur Quantifizierung der in einem Bild vorhandenen Zellzahl verwendet. Mit Hilfe des zusätzlichen Analysewerkzeuges Angiogenesis Analyzer konnte das gebildete lymphatische Netzwerk untersucht und gemessen werden.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Adaptation von Cyanobakterien an humane Zellkulturbedingungen

Zu Beginn wurde das Wachstum und die Sauerstoffproduktion der Cyanobakterien *Syn 7002* unter regulären humanen Zellkulturbedingungen getestet, um sicherzustellen, dass die Bakterien unter den vorgegebenen physiologischen Bedingungen überlebensfähig sind. Zur Simulation des hypoxischen Zustandes im Wundgebiet wurde eine Kultivierung bei  $<1\%$   $O_2$  durchgeführt. Dabei wurden die Bakterien sowohl in dem herkömmlichen A-D7 Medium als auch zur Kokultivierung mit verschiedenen Zelltypen in einem 1:1 verdünnten Bakterienmedium mit dem jeweiligen Zellkulturmedium kultiviert und miteinander verglichen.

Zu Beginn wurde der Einfluss von Temperatur und Zusammensetzung des Mediums auf die Bakterienvitalität untersucht. Mittels einer Bakterienzählung in der Neubauer Zählkammer zeigte sich nach 2 und 4 Tagen in Abb. 10A bei  $37^\circ C$  ein exponentielles Bakterienwachstum. Nur am Tag 2 wurden signifikante Unterschiede in der Bakterienzahl zwischen den in A-D7-Medium 1:1 supplementiert mit DMEM kultivierten Bakterien und der Kontrolle festgestellt. Dabei wurde zur Kultivierung der Kontrollgruppe ein mit PBS verdünntes A-D7 Medium verwendet, um die 1:1 Verdünnung zu berücksichtigen. Durch das deutliche Wachstum über 4 Tage und die fehlende Signifikanz im weiteren Untersuchungsverlauf ließ sich ein toxischer Effekt des DMEM-Zellmediums auf die Bakterienkulturen ausschließen. Zudem konnte eine deutliche Einschränkung der Wachstumskurve durch eine Abweichung vom Temperatur-Optimum ( $37^\circ C$ ) festgestellt werden. Das Wachstum der Cyanobakterien war sowohl bei  $20^\circ C$  als auch bei  $30^\circ C$  in den ersten 4 Tagen deutlich reduziert. Der Versuch wurde daher auf 7 Tage ausgedehnt und in dieser Zeit konnte ein Anstieg der Bakterienzahl nachgewiesen werden. Dies belegt die Vitalität der Bakterien trotz des reduzierten exponentiellen Wachstums.

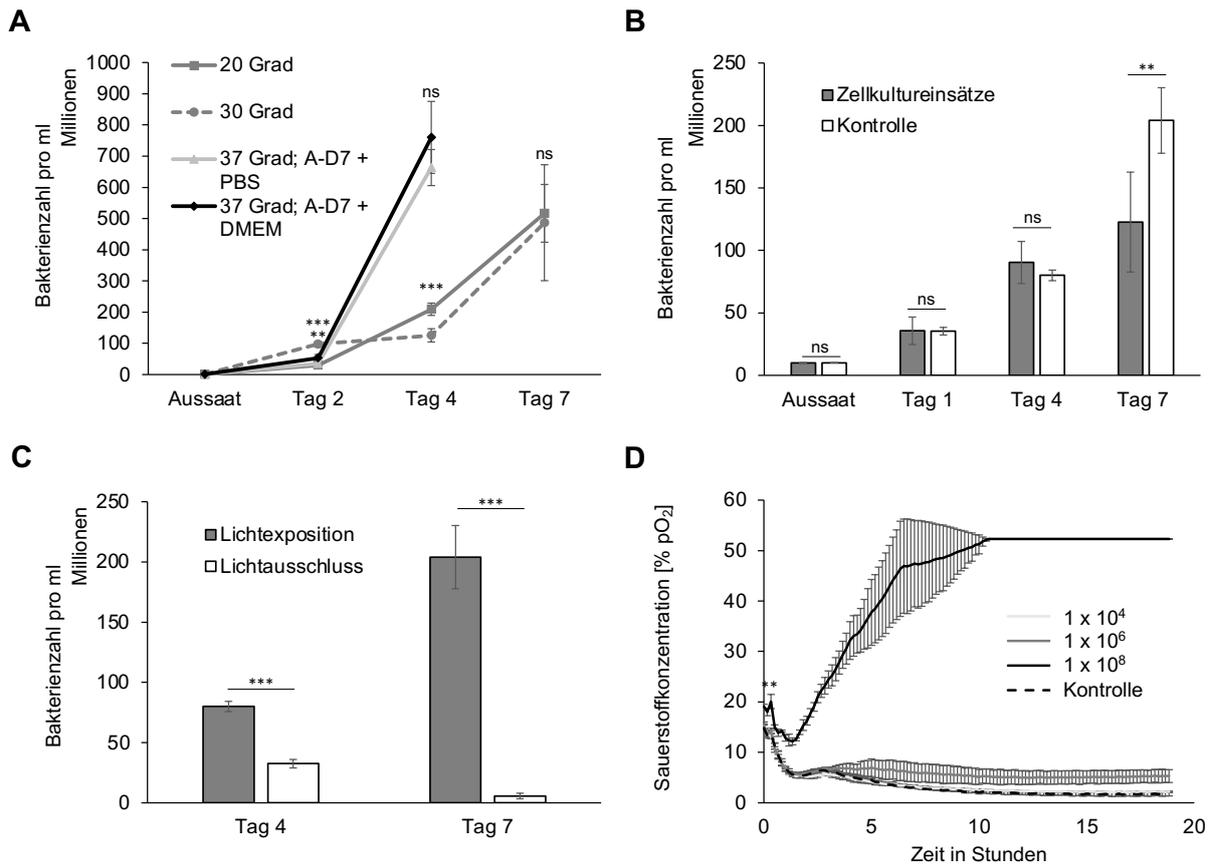
Es wurde außerdem im Rahmen der Vorbereitungen für die Herstellung von Kokulturen mit humanen Zellen die Auswirkungen der Kultivierung in Zellkultureinsätzen (Inserts) auf das Bakterienwachstum untersucht (Abb. 10B). In den ersten 4 Tagen zeigte sich wiederholt mittels Bakterienzählung ein exponentielles Wachstum ohne signifikante Unterschiede bei der Anwendung von Inserts gegenüber der positiven Kontrolle (Bakterienkultivierung in regulären Wells). Nach 7 Tagen konnte jedoch mit  $204 \pm 26,23$  Mio. eine zweifach höhere Zellzahl bei einer regulären Kultivierung in einer 12-Well Platte gegenüber den Kulturen in Zellkultureinsätzen ( $122 \pm 40$  Mio.) nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise auf die

verringerte Kultivierungsfläche in den Inserts zurückzuführen, die mit einer Einschränkung der Proliferation einhergehen könnte.

Des Weiteren wurde die Abhängigkeit des Bakterienwachstums von der Lichtexposition untersucht (Abbildung 10C). Hierfür wurden die Kulturen mittels einer Lichtquelle, gemäß den bereits beschriebenen Methoden, in einem Abstand von 25 cm konstant beleuchtet und die Bakterienzahl nach 4 und 7 Tagen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Unter Lichtexposition zeigte sich innerhalb von 7 Tagen ein exponentieller Anstieg der Bakterienzahl auf  $204 \pm 26,23$  Mio.. Bei fehlender Lichtexposition hingegen sank die Bakterienzahl auf  $5,66 \pm 2,3$  Mio., was eine Abhängigkeit der Lebensfähigkeit der Bakterien von einer Illumination verdeutlichte und die Notwendigkeit einer Lichtquelle für weitere Versuche unterstrich.

Die photosynthetischen Eigenschaften der Cyanobakterien ermöglichten zudem eine Messung der Sauerstoffproduktion bei konstanter Lichtstimulation (Abb. 10D). Der synthetisierte Sauerstoff zeigte unter hypoxischen Milieu eine Abhängigkeit von der ausgesäten Bakterienzahl und erreichte bei einer Bakterienkonzentration von  $1 \cdot 10^8$  / ml bereits nach 10 Stunden einen Gehalt von über 50% Sauerstoff. Bei Konzentrationen geringer als  $1 \cdot 10^6$  Bakterien pro ml konnten nur geringe Sauerstoffkonzentrationen von durchschnittlich  $5,97 \pm 1,25\%$  ( $1 \cdot 10^6$ ) und  $3,62 \pm 0,21\%$  ( $1 \cdot 10^4$ ) nachgewiesen werden. Für eine suffiziente Oxygenierung wurde daher für alle weiteren Experimente eine Bakterienzahl von mindestens  $1 \cdot 10^7$  verwendet.

Zusammengefasst ließen sich die Kulturbedingungen der *Synechococcus sp. 7002* unter Voraussetzung einer konstanten Illumination an humane Zellbedingungen adaptieren. Die Bedingungen umfassten dabei eine Temperatur von 37 °C, eine Supplementierung durch Medienzusätze humaner Zellen sowie die Verwendung von Zellkultur-Inserts [163].



**Abbildung 10: Adaptation von Cyanobakterien Syn 7002 an humane Zellkulturbedingungen [163]**

- (A) Bestimmung der Proliferationskapazität der Bakterien *Synechococcus sp. 7002* mittels Zellzählung in der Neubauerkammer **bei 20°C** nach 2 Tagen 29,91±2,18 Mio.; nach 4 Tagen 209±19,73 Mio.; nach 7 Tagen 516,67±92,51 Mio.; **bei 30°C** nach 2 Tagen 97,33±8,96 Mio.; nach 4 Tagen 125,67±21,22 Mio.; nach 7 Tagen 48±18,5 Mio.; **bei 37°C mit A-D7 Medium + PBS** nach 2 Tagen 34,96±5,9 Mio.; nach 4 Tagen 663,33±57,73 Mio.; **bei 37°C mit A-D7 Medium + DMEM** nach 2 Tagen 52,88±11,21 Mio.; nach 4 Tagen 760±115,32 Mio.; n=3; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt; Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*p < 0,001.
- (B) Vergleich der Anwendung von Zellkultureinsätzen (Inserts 0,4 µm Porengröße) mit einer positiven Kontrolle. Die gemessene Bakterienzahl betrug in der **Kontrolle** nach einer Aussaat von 10 Mio. Bakterien in den Vertiefungen einer regulären 12-Well-Platte nach einem Tag 35,6±11,01 Mio., nach 4 Tagen 90±16,8 Mio. und nach 7 Tagen 204±26,23 Mio.. Bei der Bakterienkultivierung in **Zellkultureinsätzen** wurden nach einem Tag 35,33±3,05 Mio., nach 4 Tagen 80±9,24 Mio., und nach 7 Tagen 122±40 Mio. Bakterien gemessen. n=3. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*P < 0,01.
- (C) Bestimmung der Bakterienproliferation durch Zellzählung unter konstanter Illumination und Lichtausschluss. Zellzahl nach **Lichtexposition**: Tag 4: 80±4,24 Mio., Tag 7: 204±26,23 Mio.; Anzahl der Bakterien bei **fehlender Lichtexposition**: Tag 4: 32,5±3,53 Mio., Tag 7: 5,66±2,31 Mio.. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt; Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*p < 0,001.
- (D) Messung der Sauerstoffkonzentrationen im Kulturmedium mittels SensorDishReader (SDR; Presens GmbH) in einem 10-minütigen Intervall über einen Zeitraum von 20 Stunden. Untersucht wurde der photosynthetisch produzierte Sauerstoff bei einer Bakterienkonzentration von 1x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>6</sup> und 1x10<sup>8</sup>; n=3. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant; \*\*P < 0,01.

## 5.2 Biokompatibilität von Cyanobakterien und humanen dermalen Zellen *in vitro*

Um Cyanobakterien für dermale therapeutische Zwecke beim Menschen nutzen zu können stellte sich die Frage nach ihrer humanen Kompatibilität. Diese wurde im Folgenden durch *In-Vitro*-Untersuchung anhand von drei verschiedenen Zelltypen überprüft.

### 5.2.1 Biokompatibilität von 3T3 Fibroblasten mit Syn7002

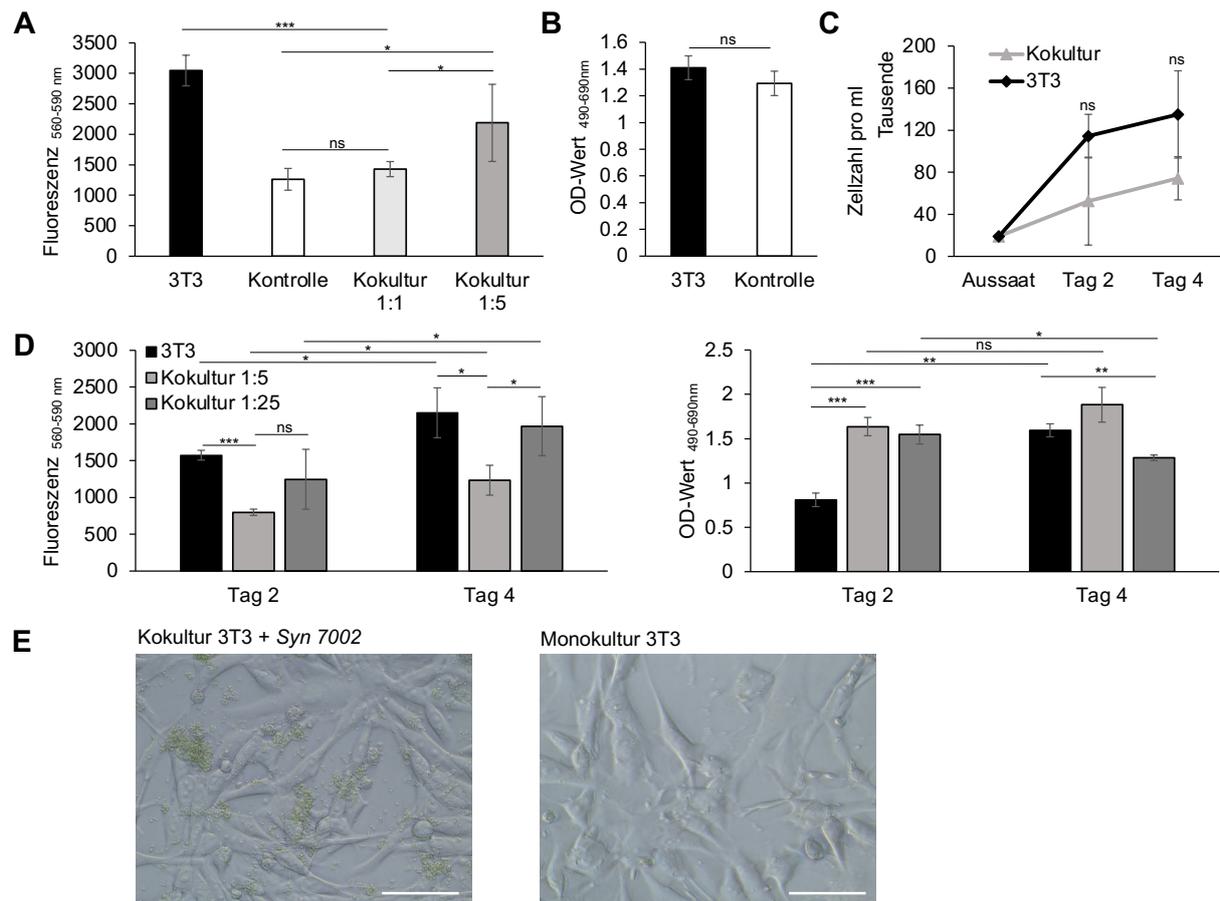
Für den Nachweis einer Biokompatibilität wurde analysiert, inwiefern photosynthetische Bakterien mit menschlichen Zellen unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert werden können. Fibroblasten sind ein wesentlicher Bestandteil der Dermis und verleihen dieser mit einem Geflecht aus Elastin und Kollagen eine stützende Funktion [164]. Im ersten Schritt wurde daher ein toxischer Effekt der Cyanobakterien auf 3T3 Fibroblasten ausgeschlossen. Hierfür wurde zunächst unter Verwendung von Zellkultureinsätzen mit einer permeablen Membran (0,4 µm Porengröße) eine indirekte Kokultur von SynHA-Bakterien und Fibroblasten erstellt, die eine physikalische Trennung beider Zellpopulationen, bei gleichzeitigem Austausch der gelösten Kulturmedien, ermöglichte. Die Organismen wurden jeweils im gleichen Well unter konstanter Beleuchtung für 2 und 4 Tage kultiviert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nach 4 Tagen konnte in Abbildung 11A eine deutliche Veränderung der Stoffwechselaktivität mittels AlamarBlue-Assays gefunden werden. Die Kokultivierung der 3T3 Fibroblasten mit einer 5-fach höheren Bakterienzahl zeigte nach 4 Tagen eine 1,5-fach höhere Zellaktivität mit OD-Werten von  $2187,6 \pm 633,09$  im Vergleich zu Kokulturen, die nur in einem einfachen Verhältnis von 1:1 mit Bakterien inkubiert wurden (Abb. 11A). Eine Signifikanz zeichnete sich auch gegenüber der Kontrolle ab, die unter Ausschluss von Aquakulturen eine gleiche Zusammensetzung des Bakterien- und Zellmediums enthielt. Die 3T3-Kultur mit reinem zellspezifischen DMEM zeigte hingegen eine 2,5-fach höhere metabolische Aktivität gegenüber der Kontrolle mit einem 1:1 verdünnten DMEM in bakterienspezifischen A-D7-Medium.

Um einen toxischen Effekt des A-D7-Mediums der Bakterien auf 3T3 Fibroblasten auszuschließen, wurde zusätzlich ein LDH-Assay durchgeführt (Abb. 11B). Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede der Konzentration der Laktatdehydrogenase in beiden Medien gefunden, was einer Zytotoxizität entgegensteht. Eine 1:1 Verdünnung bewirkte eine Nährstoffreduktion um 50%, was mit einer Halbierung der Zellaktivität korrelierte. Diese Beobachtung wurde auch in einer Zellzählung der 3T3 Fibroblasten bestätigt. Trotz fehlender Signifikanz wurde deutlich, dass Kokulturen durch die Ergänzung des Zellmediums mit

bakterienspezifischen A-D7-Medium bei gleichbleibendem Volumen, einen Wachstumsnachteil erlitten und die Proliferation um circa die Hälfte reduziert wurde (Abb. 11C). Dabei erreichten 3T3 in Kokultivierung nach 2 Tagen eine Zellzahl von  $52.550 \pm 41.790,01$  und nach 4 Tagen von  $74.266,67 \pm 20.568,26$  im Vergleich zu Fibroblasten ohne Bakterienzusatz.

Aufgrund des beobachteten Vorteils einer höheren Bakterienzahl auf die Stoffwechselaktivität der Fibroblasten in den ersten indirekten Kokulturen wurde die Bakterienzahl auf das 25-Fache der 3T3-Zellzahl erhöht und eine direkte Kultivierung ohne Zellkultureinsätze mit Zell-Zell-Kontakt beider Organismen untersucht. Unter Verwendung eines AlamarBlue-Assays wurde in Abbildung 11D (links) die reduzierte Stoffwechselaktivität in Kokulturen nach 2 und 4 Tagen erneut belegt. Auffallend war allerdings die signifikant gesteigerte metabolische Aktivität in Kokulturen mit einer 25-fach erhöhten Bakterienzahl gegenüber den 3T3 Fibroblasten, die im Verhältnis von 1:5 mit den Bakterien kultiviert wurden. Die Zellen reagierten mit einer deutlich gesteigerten Aktivität auf die Bakterienzahlerhöhung. Um einen möglichen Zellverlust durch die Kokultivierung über den Zeitraum von 4 Tagen einschätzen zu können wurde die Laktatdehydrogenaseaktivität im Zellmedium gemessen (Abb. 11D rechts). Hierbei wurde in der 3T3 Monokultur eine signifikante Verdopplung des LDH-Gehaltes quantifiziert, wohingegen bei Kokulturen 1:25 eine signifikante Reduktion der Laktatdehydrogenase festgestellt werden konnte. Kokulturen im Verhältnis von 1:5 zeigten nur einen geringen Anstieg der LDH-Konzentration von  $1,64 \pm 0,1$  auf  $1,88 \pm 0,19$  nach 4 Tagen, ohne Hinweis auf eine Zytotoxizität der Bakterienkulturen bei fehlender Signifikanz. Zum Nachweis einer Biokompatibilität wurden mikroskopische Bilder angefertigt und das Zusammenleben beider Organismen in einem repräsentativen Beispiel in Abbildung 11E gezeigt.

Insgesamt hatten die Cyanobakterien nach 4 Tagen keine zytotoxischen Auswirkungen auf 3T3-Fibroblasten, während die Kokultur mit Mikroorganismen einerseits zu einer stimulierenden Wirkung auf die Stoffwechselaktivität von 3T3 und andererseits zu einem erhöhten LDH-Spiegel nach 2 Tagen führte [163].



**Abbildung 11: Nachweis der Biokompatibilität von 3T3 Fibroblasten mit Syn 7002 [163]**

- (A) Nachweis einer Verbesserung der Zellvitalität von 3T3 Fibroblasten in Kokulturen durch eine erhöhte Bakterienzahl mittels Bestimmung der metabolischen Aktivität nach 4 Tagen unter Verwendung eines AlamarBlue-Assays. Messung des Fluoreszenzsignals bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm: 3T3:  $3.046,67 \pm 251,38$ ; Kontrolle:  $1.261,67 \pm 178,6$ ; Kokultur 1:1:  $1.429,34 \pm 123,54$ ; Kokultur 1:5:  $2.187,67 \pm 633,1$ ;  $n=1$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .
- (B) Ausschluss einer Zytotoxizität des bakterienspezifischen A-D7 Mediums auf 3T3 Fibroblasten nach 4 Tagen mittels Laktat-Dehydrogenase-Assays (LDH). Vergleich einer 3T3 Reinkultur mit einer Kontrolle, die 1:1 verdünntes DMEM mit A-D7 Medium enthielt. Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm. OD-Werte: 3T3:  $1,4 \pm 0,09$ ; Kontrolle:  $1,29 \pm 0,89$ ;  $n=2$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant.
- (C) Zellzahlbestimmung mittels Countes FL2 zum Nachweis einer reduzierten Wachstumsrate durch die 1:1 Verdünnung des Zellmediums DMEM mit A-D7 Medium der Bakterien in Kokulturen verglichen mit einer 3T3 Reinkultur über den Zeitraum von 4 Tagen. Zellzahl pro ml nach 2 Tagen: 3T3:  $114.350 \pm 20.718,23$ ; Kokultur:  $52.550 \pm 41.790,01$ ; nach 4 Tagen: 3T3:  $134.960 \pm 41.493,96$ ; Kokultur:  $74.266,67 \pm 20.568,26$ ;  $n=1$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant.
- (D) (**links**) Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels AlamarBlue-Assay zum Nachweis des Zellüberlebens von 3T3 Fibroblasten in Kokulturen mit *Syn 7002*. Messung des Fluoreszenzsignals bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm: nach 2 Tagen: 3T3:  $1574,67 \pm 66,71$  Kokultur 1:5:  $798,67 \pm 43,01$ ; Kokultur 1:25:  $1253,67 \pm 407,29$ ; nach 4 Tagen: 3T3:  $2151,33 \pm 339,13$ ; Kokultur 1:5:  $1241 \pm 203,13$ ; Kokultur 1:25:  $1969,33 \pm 401,52$  (**rechts**) Laktat-Dehydrogenase-Assay (LDH) zur Bestimmung der Zytotoxizität von Cyanobakterien auf 3T3 Fibroblasten. Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge

von 690 nm. OD-Werte: nach 2 Tagen: 3T3:  $0,81 \pm 0,076$  Kokultur 1:5:  $1,64 \pm 0,1$ ; Kokultur 1:25:  $1,55 \pm 0,1$ ; nach 4 Tagen: 3T3:  $1,59 \pm 0,07$ ; Kokultur 1:5:  $1,88 \pm 0,03$ ; Kokultur 1:25:  $1,28 \pm 0,19$ ; n=3; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

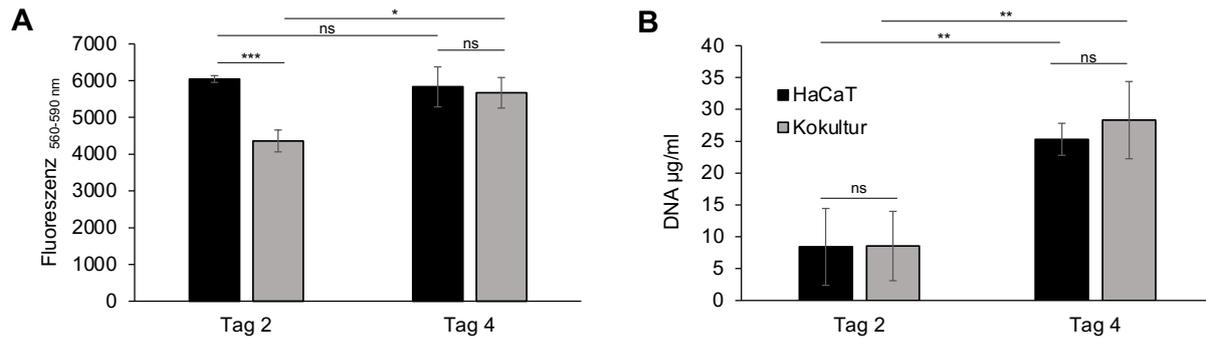
- (E) **(links)** Repräsentative mikroskopische Aufnahme (20x Vergrößerung) einer Kokultur von 3T3 Fibroblasten mit *Synechococcus sp. 7002* im Verhältnis 1:5; n=10; **(rechts)** 3T3 Monokultur einer Kontrollgruppe; n=12, Maßstabsleiste: 200 µm.

## 5.2.2 Biokompatibilität von HaCaT Keratinozyten mit SynHA

Keratinozyten verschiedener Verhornungsstadien spielen eine essenzielle Rolle im Aufbau der mehrschichtigen Epidermis und bilden somit die direkte Grenze des Körpers zur Umwelt [165, 166]. Es ist daher von besonderem Interesse eine Verträglichkeit der Bakteriensuspensionen auch gegenüber HaCaT Keratinozyten zu überprüfen. Die bereits bei den 3T3 beobachtete verringerte Wachstumsrate ist auf die durch die Verdünnung bedingte Nährstoffreduktion zurückzuführen. Dies wurde in allen weiteren Kontrollgruppen für Keratinozyten-Monokulturen entsprechend berücksichtigt, und die Medien wurden mit gleichen Verdünnungsverhältnissen (1:1) wie die der Kokulturen erstellt. Für den Nachweis einer Biokompatibilität wurde eine direkte Kokultur ohne Trennung beider Zellpopulationen erstellt und die Stoffwechselaktivität mit Hilfe eines AlamarBlue-Assays gemessen (Abb. 12A). Es zeigte sich in der Kokultur eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität, sodass nach 4 Tagen keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Kokultur ( $5.670,33 \pm 415,70$ ) und der Monokultur der Keratinozyten ( $5.831,66 \pm 545,08$ ) gefunden werden konnten. Die Aktivität der Kontrolle verlief über einen Zeitraum von 4 Tagen konstant.

Nachdem eine signifikant höhere Stoffwechselaktivität in der Kontrollgruppe nach 2 Tagen festgestellt wurde, was auf eine mögliche Inkompatibilität beider Zellgruppen hindeutete, wurde die Proliferation der Zellen durch Messung des DNA-Gehaltes unter Verwendung eines PicoGreen-Assays analysiert (Abb. 12B). Dabei konnten signifikante Unterschiede sowohl nach 2 Tagen als auch nach 4 Tagen ausgeschlossen werden. Es zeigte sich über einen Zeitraum von 4 Tagen eine kontinuierliche Zunahme der DNA-Konzentration, korrelierend zur Zellzahl, in beiden Gruppen, was einer Unverträglichkeit der Cyanobakterien gegenüber den HaCaT Keratinozyten entgegensprach.

Zusammengefasst wurde in den oben genannten Ergebnissen kein toxischer Effekt der Cyanobakterien auf humane Keratinozyten festgestellt, was eine Biokompatibilität beider Organismen in vitro annehmen ließ [163].

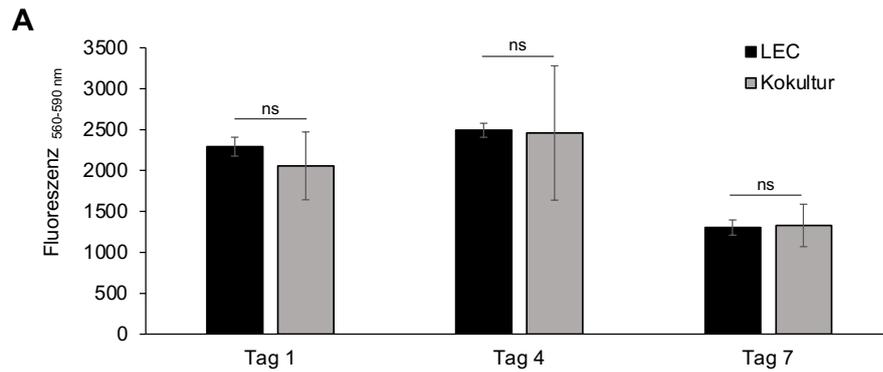


**Abbildung 12: Nachweis der Biokompatibilität von HaCaT Keratinozyten mit Syn 7002 [163]**

- (A) Bestimmung der metabolischen Aktivität von HaCaT Keratinozyten mittels AlamarBlue-Assay zum Nachweis des Zellüberlebens in Kokultur mit Cyanobakterien. Messung des Fluoreszenzsignales bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm: nach 2 Tagen: HaCaT:  $6045 \pm 92,24$ ; Kokultur:  $4360,33 \pm 297,82$ ; nach 4 Tagen: HaCaT:  $5831,66 \pm 545,08$ ; Kokultur:  $5670,33 \pm 415,70$ ;  $n=3$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant; ns = nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .
- (B) Nachweis der Proliferation von HaCaT Keratinozyten in Kokultur mit Syn 7002 über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Verwendung des PicoGreen-Assays. Messung der DNA-Konzentration in µg/ml: nach 2 Tagen: HaCaT:  $8,55 \pm 2,52$ ; Kokultur:  $8,41 \pm 6,03$ ; Kokultur; nach 4 Tagen: HaCaT:  $28,31 \pm 6,06$  Kokultur:  $25,29 \pm 5,44$ ;  $n=3$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant. ns = nicht signifikant; \*\* $p < 0,01$ .

### 5.2.3 Biokompatibilität von LECs mit SynHA

Da der Fokus dieser Arbeit vor allem auf dem Einfluss der Cyanobakterien auf die Lymphangiogenese lag, wurde auch die Kompatibilität der Bakterien mit humanen lymphendothelialen Zellen (LEC) überprüft. Hierzu wurde eine indirekte Kokultur mit Zellkultureinsätzen unter normoxischen Bedingungen ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\text{ }\%$   $\text{CO}_2$ ), wie oben beschrieben, hergestellt und auf den bereits verwendeten AlamarBlue-Assay zum Nachweis der metabolischen Aktivität der Zellen zurückgegriffen. Der untersuchte Zeitraum wurde auf 7 Tage erweitert, um eine langfristige Reaktion der Lymphzellen zu beobachten. Über den gesamten Untersuchungszeitraum konnte zu den jeweiligen Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kokulturen und den Monokulturen der LECs festgestellt werden. Dies deutet daraufhin, dass Cyanobakterien keinen negativen Einfluss auf die Vitalität und das Wachstum von LECs haben (Abb. 13A). Zusätzlich zeigte sich eine Zunahme der metabolischen Aktivität in beiden Gruppen von Tag 1 zu Tag 4. Jedoch war die Stoffwechselaktivität nach 7 Tagen in beiden Gruppen deutlich reduziert, was auf einen möglichen Nährstoffmangel zurückzuführen sein könnte. Zusammengefasst zeigte die Biokompatibilitätsprüfung von SynHA-Cyanobakterien durch Kokultivierung keinen negativen Einfluss auf LECs. Dies ist der erste Schritt für eine möglich therapeutische dermale Anwendung der Bakterien zur Behandlung chronischer Wunden.



**Abbildung 13: Nachweis der Biokompatibilität von LECs mit Syn HA**

- (A) Bestimmung der metabolischen Aktivität von lymphendothelialen Zellen (LEC) mittels AlamarBlue-Assays zum Nachweis des Zellüberlebens in Kokultur mit Cyanobakterien. Messung des Fluoreszenzsignales bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm: nach 1 Tag: LEC: 2.291,28±115,53; Kokultur: 2.056,58±414,5; nach 4 Tagen: LEC: 2491,69±85,6; Kokultur: 2458,62±820,87; nach 7 Tagen: LEC: 1302,36±93,12; Kokultur: 1328,13±259,19; n=3; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant.

### 5.3 Photosynthetisch produzierter Sauerstoff der SynHA verbessert die Viabilität dermalen Zellen unter Hypoxie

Nach dem Ausschluss toxischer Effekte der Cyanobakterien auf dermale Zellen wurden die vorteilhaften Eigenschaften der Bakterien für die Lebensfähigkeit der Zellen in einem chronischen Wundgebiet untersucht. Um den Effekt des photosynthetisch produzierten Sauerstoffs auf das Zellüberleben zu bewerten, wurden verschiedene dermale Zelltypen mit Cyanobakterien über einen Zeitraum von 7 Tagen kokultiviert. Die Bakterien wurden dabei indirekt, wie bereits beschrieben, zusammen mit LEC, HaCaT und 3T3 kultiviert, da die Bakterien auch im therapeutischen Ansatz ohne direkten Zellkontakt in einem Kollagengerüst eingebettet sind. Die Inkubation erfolgte dabei *in vitro* unter Hypoxie ( $pO_2$  1 %), zur Simulation einer sauerstoffarmen Mikroumgebung nicht perfundierter chronischer Wunden und unter konstanter Beleuchtung mit derselben Lichtquelle für alle Versuche zur Induktion der Photosynthese.

#### 5.3.1 Verbesserung der Zellvitalität von LECs durch Kokultivierung mit SynHA unter Hypoxie

Der positive Effekt des Sauerstoffs der Bakterien auf das Zellüberleben unter Hypoxie wurde zuerst an humanen lymphendothelialen Zellen untersucht. Mit Hilfe eines SensorDishReaders (SDR, PreSens GmbH) konnte über Sensoren am Plattenboden in den einzelnen Kulturen der

prozentuale Sauerstoffgehalt alle 10 min ermittelt werden. In den Kokulturen wurde bereits nach 5 Stunden eine starke Sauerstoffproduktion von über  $33,6 \pm 8,22$  % durch Syn7002 beobachtet (Abb. 14B). Nach circa 10 Stunden stellte sich eine konstante Oxygenierung von 50 % über den gesamten weiteren Messzeitraum ein. Aufgrund des Erreichens der maximalen Messkapazitäten wurde die Messung nach weiteren 20 Stunden gestoppt. In den LEC-Monokulturen mit Abwesenheit der Bakterien wurde währenddessen nach wenigen Stunden ein hypoxisches Milieu von 1-2 %  $pO_2$  gemessen. Die hohe Photosynthesekapazität der Cyanobakterien verspricht eine suffiziente Sauerstoffversorgung der Zellen und deutet auf eine positive Bakterienvitalität hin.

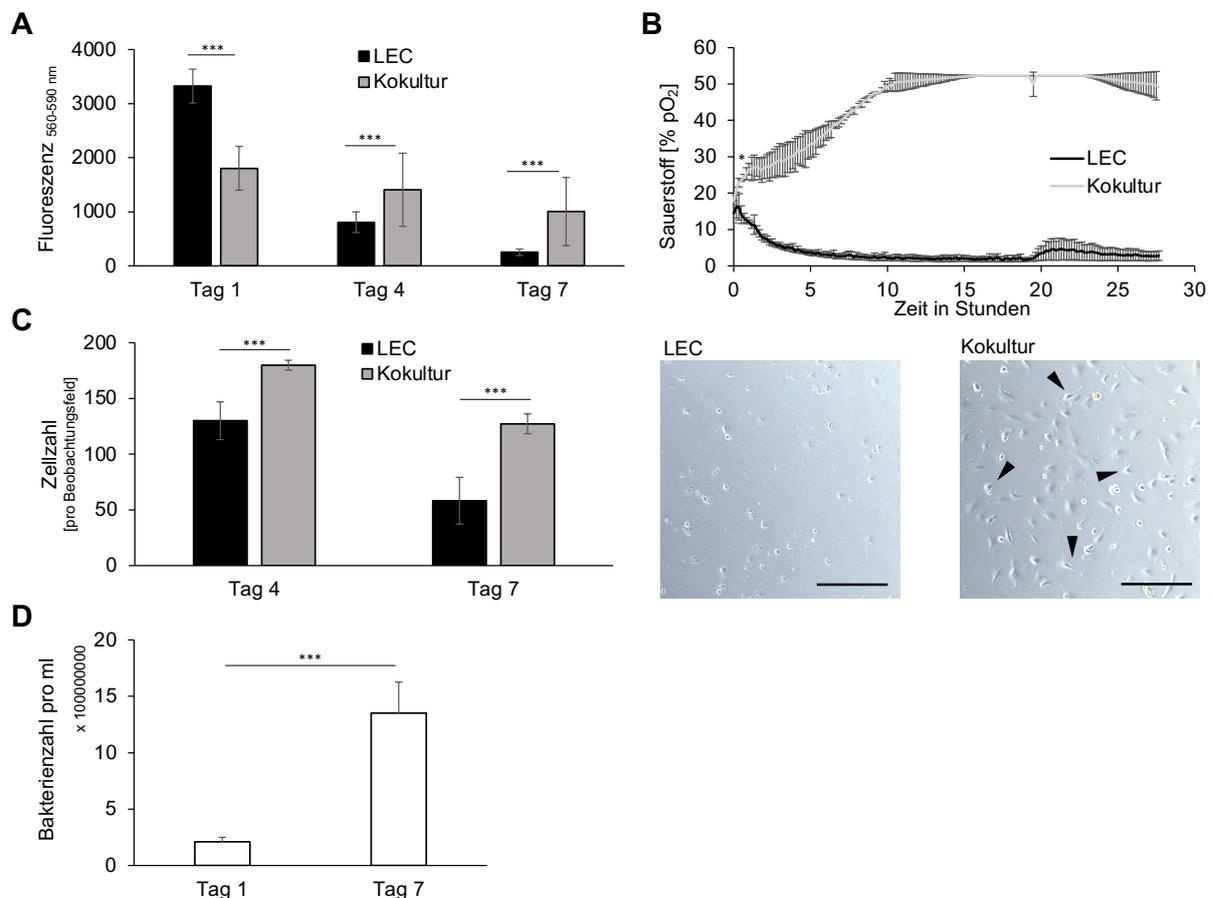
Die Lebensfähigkeit der Zellen konnte auch mittels einer Bakterienzählung in einer Neubauer-Zählkammer über einen Zeitraum von 7 Tagen bestätigt werden. Es wurde eine signifikante Zunahme der Bakterienzahl von  $209,33 \pm 40,54 \cdot 10^6$  nach einem Tag auf  $1350 \pm 276,14 \cdot 10^6$  nach 7 Tagen gefunden (Abb. 14D). Diese siebenfache Steigerung der Zellzahl ist Hinweis für eine hohe Proliferationskapazität der Bakterien und Resistenz gegenüber hypoxischen humanen Zellkulturbedingungen.

Um die Auswirkungen des freigesetzten photosynthetischen Sauerstoffs auf die Lebensfähigkeit der LECs nachverfolgen zu können, wurde in Abbildung 14A ein AlamarBlue-Assay in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Die Inkubation in Hypoxie führte in den LEC-Monokulturen zu einer signifikant schnelleren Reduktion der metabolischen Aktivität in LECs gegenüber den Kokulturen mit Syn7002. Der von den Bakterien freigesetzte photosynthetische Sauerstoff verbesserte das zelluläre hypoxische Milieu in den Kokulturen, sodass diese nach 4 Tagen 77 % und nach 7 Tagen 55 % ihrer Stoffwechselaktivität erhalten konnten. Die Stoffwechselaktivität der Lymphzellen erreichte somit nach 4 Tagen  $1406,30 \pm 675,59$  und nach 7 Tagen  $1003,37 \pm 613,42$  und war zu beiden Zeitpunkten signifikant höher als die jeweilige Kontrolle ohne Bakterien ( $806,86 \pm 191,84$  und  $250,76 \pm 60,14$ ).

Ähnliche Veränderungen wurden auch in der Zellzählung der LECs gefunden (Abb. 14C). Dabei wurden nach Entfernung der Bakterienzusätze mikroskopische Bilder der indirekten Kokulturen angefertigt und unter Verwendung des ImageJ-Cell-Counters jedes Beobachtungsfeld ausgewertet. Die repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 14C zeigten nach 7 Tagen Inkubation neben einer Konfluenz von circa 60% auch zahlreiche Mitosefiguren in der Kokultur. Im Gegensatz dazu konnten in der Kontrollgruppe zirkuläre apoptotische Zellen beobachtet werden. Der mikroskopische Nachweis bestätigte somit die oben genannten Befunde einer verbesserten Lebensfähigkeit der LECs unter hypoxischen Bedingungen. In der Gegenwart von Bakterien wurde nach 4 Tagen eine durchschnittliche Zellzahl von  $179,83 \pm 16,9$  pro Beobachtungsfeld quantifiziert, die aufgrund

eines Nährstoffmangels nach 7 Tagen auf  $127,25 \pm 4,42$  abfiel. Jedoch wurde zu allen Messzeitpunkten eine signifikant höhere Zellzahl als in Abwesenheit der Mikroorganismen nachgewiesen. An Tag 7 konnte mit  $130 \pm 20,95$  Zellen pro Beobachtungsfeld sogar die doppelte Zellzahl in den Kokulturen gegenüber der Kontrolle mit nur  $58,25 \pm 8,92$  LECs festgestellt werden.

Der vergleichsweise geringe Abfall der metabolischen Aktivität und der Zellzahl der LECs in den Kokulturen machen deutlich, dass menschliche Zellen unter hypoxischen Bedingungen von photosynthetisch erzeugtem Sauerstoff aus den Bakterien deutlich profitieren.



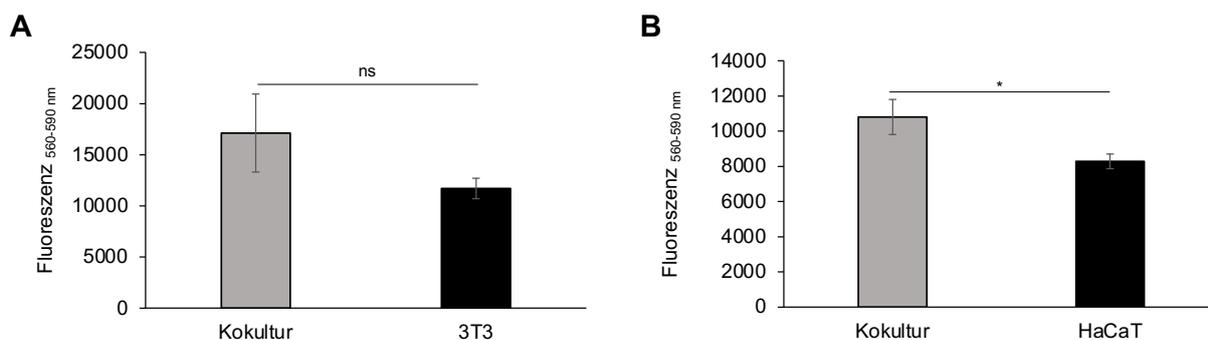
**Abbildung 14: Nachweis einer Verbesserung der Zellvitalität von LECs durch Kokultivierung mit *Syn 7002* unter Hypoxie**

- (A) AlamarBlue-Assay zur Bestimmung der Zellvitalität der lymphendothelialen Zellen als Monokultur und Kokultur mit *Syn 7002* unter Hypoxie. Messung des Fluoreszenzsignals bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm: **nach 1 Tag:** LEC:  $3.3325,11 \pm 312,86$ ; Kokultur:  $1.804,03 \pm 405,03$ ; **nach 4 Tagen:** LEC:  $806,86 \pm 191,84$ ; Kokultur:  $1.406,3 \pm 675,59$ ; **nach 7 Tagen:** LEC:  $250,76 \pm 60,14$ ; Kokultur:  $1003,37 \pm 631,42$ ;  $n=3$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt:  $***p < 0,001$ .
- (B) Messung der prozentualen Sauerstoffkonzentration [% pO<sub>2</sub>] im Medium von LEC Monokulturen und Kokulturen mit *Syn 7002* alle 10 min mittels SDR SensorDishReader und OD-24-Wellplatten über einen Zeitraum von 28 Stunden;  $n=4$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt:  $*p < 0,05$ .

- (C) (**links**) Bestimmung der Zellzahl von LEC Monokulturen und Kokulturen pro Beobachtungsfeld mittels ImageJ Cell Counter: nach 4 Tagen: LEC:  $130 \pm 20,95$ ; Kokultur:  $179,83 \pm 16,93$ ; nach 7 Tagen: LEC:  $58,25 \pm 8,92$ ; Kokultur:  $127,25 \pm 4,43$ ; (**rechts**) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (10x Vergrößerung) der LEC Monokulturen und der Kokulturen nach 4 Tagen mit Markierung mitotischer Teilungsstellen (**schwarzer Pfeil**); Maßstabsleiste: 500  $\mu\text{m}$ ; n=3; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt:  $***p < 0,001$ .
- (D) Nachweis des Bakterienwachstums bei indirekten Kokulturen mit Inserts durch Bestimmung der Bakterienzahl pro ml in der Neubauer-Zählkammer nach Tag 1:  $209,33 \pm 40,54$  Mio. und nach Tag 7:  $1350 \pm 276,14$  Mio.; n=3; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt:  $***p < 0,001$ .

### 5.3.2 Verbesserung der Zellvitalität von HaCaT Keratinozyten und 3T3 Fibroblasten durch Kokultivierung mit SynHA unter Hypoxie

Die Wirkung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion der Cyanobakterien wurde neben LECs auch an weiteren dermalen Zelltypen, wie HaCaT Keratinozyten und 3T3 Fibroblasten, untersucht. Beide Zelltypen wurden mit Cyanobakterien kokultiviert und unter hypoxischen Bedingungen, wie oben beschrieben, für 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien entfernt und die Zellviabilität mittels des AlamarBlue-Assays ermittelt. Die Quantifizierung ergab eine 1,5-fach höhere metabolische Aktivität in der Kokultur im Vergleich zur Reinkultur der 3T3 Fibroblasten (Abb. 15A). Der im Medium gelöste Sauerstoff zeigte jedoch auch eine deutlich positive, stimulierende Wirkung auf die Zellvitalität der HaCaT Keratinozyten. Nach 3 Tagen hypoxischer Inkubation konnte in der Kokultur eine signifikant höhere Stoffwechselaktivität gegenüber der Reinkultur nachgewiesen werden (Abb. 15B).



**Abbildung 15: Verbesserung der Zellvitalität von HaCaT und 3T3 durch Kokultivierung mit Syn 7002 unter Hypoxie**

- (A) Messung der metabolischen Aktivität von 3T3 Fibroblasten mittels AlamarBlue-Assay durch Quantifizierung des Fluoreszenzsignals bei einer Exzitationswellenlänge von 560nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm nach Kokultivierung mit Cyanobakterien über einen Zeitraum von 3 Tagen: Kokultur:  $17.116,67 \pm 3816,41$ ; 3T3:  $11.695,33 \pm 918,6$ . n=1; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant.
- (B) Messung der metabolischen Aktivität von HaCaT Keratinozyten mittels AlamarBlue-Assay durch Quantifizierung des Fluoreszenzsignals bei einer Exzitationswellenlänge von 560nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm nach Kokultivierung mit Cyanobakterien über einen Zeitraum von 3 Tagen: Kokultur:  $10.803,67 \pm 997,35$ ; HaCaT:  $8282 \pm 416,95$ ; n=3; Alle

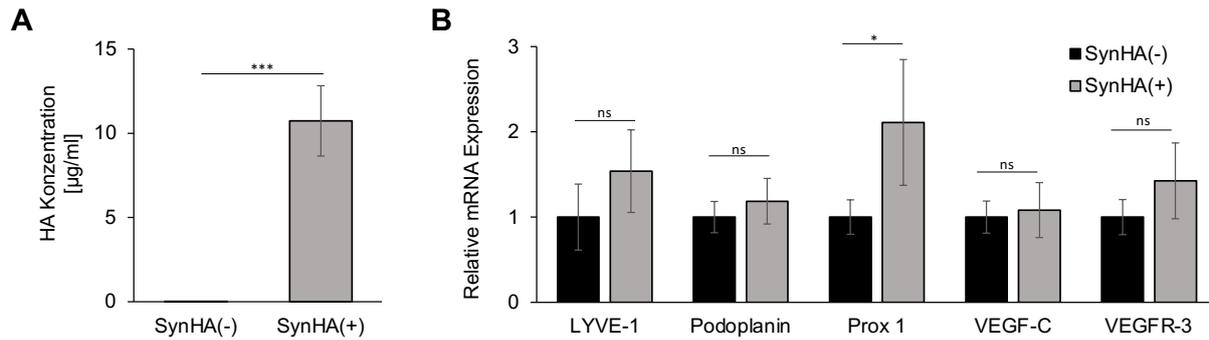
Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: \*p < 0,05.

Zusammengefasst zeigte sich *in vitro* ein deutlicher Vorteil der Kokultivierung für das Zellüberleben verschiedener Zelltypen der Haut, die eine Anwendung von Cyanobakterien im Tissue Engineering sinnvoll machen und zu einer Verbesserung des Zustandes chronischer Wunden beitragen könnten.

#### **5.4 Produzierte Hyaluronsäure der SynHA induzieren die Expression lymphangiogener Gene in LECs**

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist es, das proliferative und lymphangiogene Potenzial der von den Bakterien produzierten und ins Medium sezernierten Hyaluronsäure zu untersuchen. Aus den entsprechenden Kulturmedien wurde nach Zentrifugation die Bakterienüberstände gewonnen. Diese wurden mehrfach gereinigt und die Wirkung der darin enthaltenen Hyaluronsäure an LECs getestet. Dabei wurde die Hyaluronsäureproduktion der transgenen Cyanobakterien durch Aktivierung des Promotors nach Zugabe von IPTG+ gesteuert. Abhängig von der Induktion konnten somit zwei Gruppen SynHA(+) und SynHA(-) erstellt werden. 7 Tage nach Stimulation mit IPTG+ wurde mittels ELISA-Assays eine Hyaluronsäure-Konzentration von durchschnittlich  $10,7 \pm 2,1 \mu\text{g/ml}$  in den SynHA(+)-Überständen gemessen (Abb. 16A). In den nicht stimulierten Bakterienmedien SynHA(-) konnte vergleichsweise kein Gehalt sekretierter Hyaluronsäure nachgewiesen werden, was die Induzierbarkeit des Systems mit IPTG bestätigte.

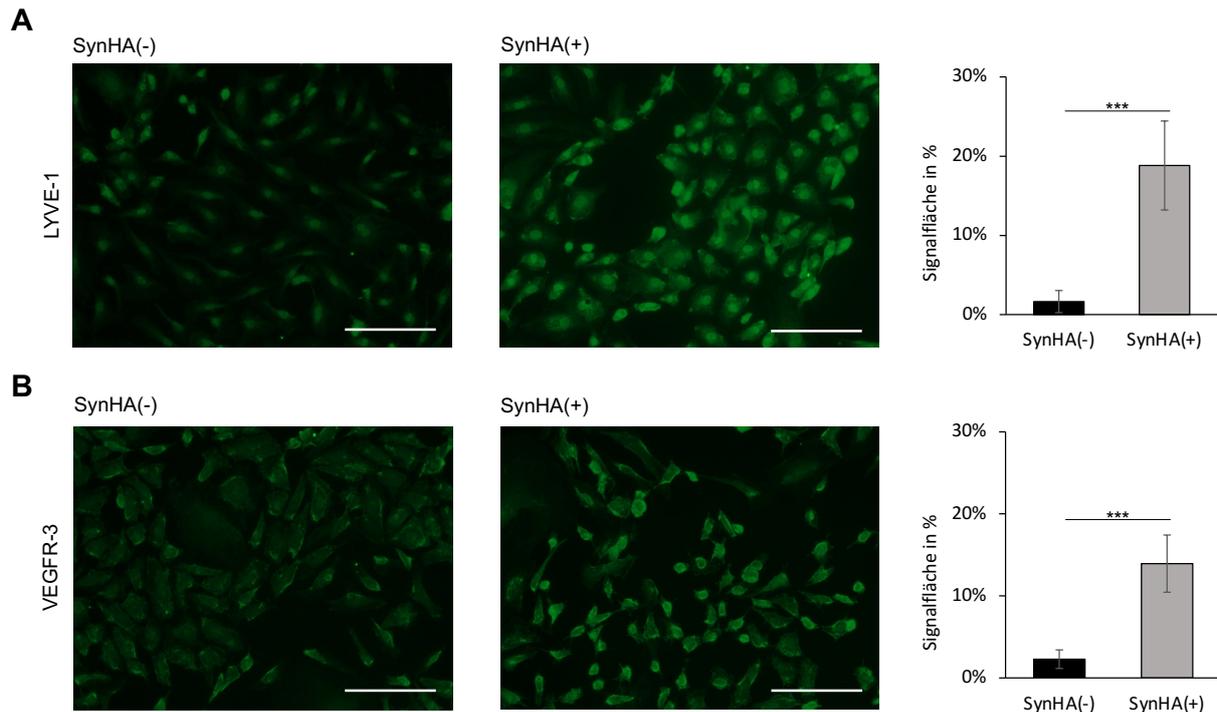
Um die Wirkung der Hyaluronsäure auf die spezifischen Gene der eingangs beschriebenen Signalkaskade der Lymphangiogenese zu untersuchen, wurden die Bakterienüberstände SynHA(+) und SynHA(-) den lymphendothelialen Zellen im Verhältnis von 1:100 zugegeben, der Ansatz für 4 Tage inkubiert und eine qPCR durchgeführt (Abb. 16B). Die sekretierte Hyaluronsäure von Syn7002 induzierte die Expression der von Hirakawa et al., 2003 [160] beschriebenen Gene VEGF-Rezeptor 3 (VEGFR-3), Podoplanin (PDPL), Prospero-Homöobox 1 (PROX-1), vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor C (VEGF-C) und endothelialen Lymphgefäß-Hyaluronanrezeptor 1 (LYVE-1). Dabei konnte eine Steigerung der relativen mRNA-Expression um das 1,5-Fache in den Genen LYVE-1 und VEGFR-3 und um das 2-Fache in PROX1 beobachtet werden (Abb. 13B), wobei nur Prox 1 signifikante Unterschiede zeigte. Der Einfluss der Hyaluronsäure auf die Genexpression von Podoplanin und VEGF-C war vergleichsweise geringer ausgefallen.



**Abbildung 16: Nachweis der Hyaluronsäureproduktion von SynHA und Bestimmung der relativen mRNA-Expression der LECs nach Stimulation**

- (A) Quantifizierung der Hyaluronsäure (HA)-konzentration [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ] in Bakterienüberständen von SynHA(+) nach 7 Tagen Stimulation mit 1 mM IPTG und der Kontrolle SynHA(-) unter Verwendung eines ELISAs: SynHA(+): 10,7 $\pm$ 2,1; SynHA(-): 0,014 $\pm$ 0,014; n=4; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: \*\*\*p < 0,001.
- (B) Nachweis der relativen mRNA Expression in LECs mittels qPCR nach Stimulation mit Bakterienüberständen von SynHA(+) und SynHA(-) für 4 Tage. Darstellung der Fold Change von SynHA(+) gegenüber SynHA(-); SynHA(-) = 1; SynHA(+) = VEGF-Rezeptor 3 (VEGFR-3): 1,36 $\pm$ 0,51, Podoplanin (PDPL): 1,21 $\pm$ 0,32, Prospero-Homöobox 1 (PROX-1): 1,91 $\pm$ 0,82; vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor C (VEGF-C): 1,08 $\pm$ 0,26, endothelialen Lymphgefäß-Hyaluronanrezeptor 1 (LYVE-1): 1,65 $\pm$ 1,31; n=3; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant; \*p < 0,05.

Da VEGFR-3 und LYVE-1 absolute Schlüsselrezeptoren der Lymphangiogenese darstellen, wurde deren Expression zusätzlich auch auf der Oberfläche der LECs immunhistologisch mit der Immunfluoreszenz-Färbung Alexa 488 detektiert. In Abbildung 17 konnte eine deutliche Färbung, korrelierend mit einer verstärkten LYVE-1 und VEGFR-3 Rezeptorexpression, in Hyaluronsäure enthaltenden LEC-Kulturen nachgewiesen werden. Da beide Rezeptoren zu den zelllinienspezifischen Differenzierungsmarkern des Lymphendothels zählen, zeigte sich auch in den unbehandelten Kulturen SynHA(-) eine Färbung der Rezeptoren, wenn auch deutlich reduziert. Unter Verwendung der ImageJ-Software wurde der gefärbte Anteil zur gesamten Zelloberfläche prozentual quantifiziert. Die Intensität der Immunfluoreszenzfärbung mit Alexa 488 des lymphspezifischen Rezeptors LYVE-1 stieg dabei in Abbildung 17A um das Zehnfache auf einen Wert von 18,81  $\pm$  0,05 % in der behandelten Gruppe SynHA(+) gegenüber der Kontrolle SynHA(-) mit Abwesenheit der Hyaluronsäure (1,63  $\pm$  0,01 %) an. Die markierte Signalfäche des VEGFR-3-Rezeptors umfasste 13,93  $\pm$  0,03 % der Zelloberfläche der LECs in den SynHA(+)-Kulturen im Vergleich zur Kontrolle (2,28  $\pm$  0,01 %) und zeigte somit eine sechsfache Zunahme der Proteinexpression (Abb. 17B). Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass LECs für eine Stimulation mit Hyaluronsäure sensibel sind und mit einer gesteigerten Proteinexpression von LYVE-1 und VEGFR3 sowie einer Veränderung auf der Oberfläche der Lymphzellen reagieren.



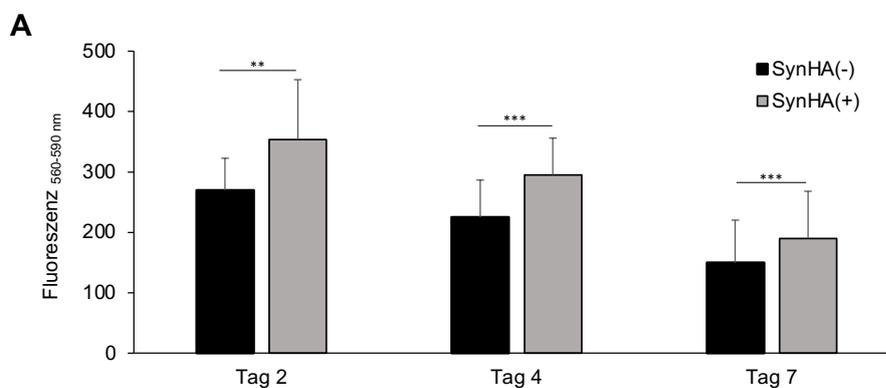
**Abbildung 17: Immunhistologischer Nachweis der Genexpression von LYVE-1 und VEGFR-3 auf LEC-Oberfläche**

- (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (20x Vergrößerung) von lymphendothelialen Zellen zum Nachweis der Expression von LYVE-1 mittels Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 nach Stimulation der Zellen mit Bakterienüberständen SynHA(+) und SynHA(-) über 4 Tage. Quantifizierung der mit Fluoreszenz markierten Fläche in % unter Verwendung von ImageJ: SynHA(-):  $1,63 \pm 0,01\%$ ; SynHA(+):  $18,81 \pm 0,05\%$ ;  $n=3$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt:  $***p < 0,001$ .
- (B) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (20x Vergrößerung) von lymphendothelialen Zellen zum Nachweis der Expression von VEGFR-3 mittels Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 nach Stimulation der Zellen mit Bakterienüberständen SynHA(+) und SynHA(-) über 4 Tage. Quantifizierung der mit Fluoreszenz markierten Fläche in % unter Verwendung von ImageJ: SynHA(-):  $2,28 \pm 0,01\%$ ; SynHA(+):  $13,93 \pm 0,03\%$ ;  $n=3$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt:  $***p < 0,001$ .

## 5.5 Produzierte Hyaluronsäure der SynHA stimulieren Zellviabilität von LECs und Lymphgefäßbildung

Die Expression der für die Lymphangiogenese entscheidenden Gene legte nahe, dass die von den Bakterien sezernierte Hyaluronsäure nicht nur auf der Ebene der Gene, sondern auch metabolische und morphologische Veränderungen der Zellen herbeiführte. Dies wurde zunächst in der Messung der metabolischen Aktivität über einen Zeitraum von 7 Tagen unter Verwendung eines AlamarBlue-Assays bestätigt. Durch Zugabe der Hyaluronsäure enthaltenden Überstände zeigte sich, verglichen zur unbehandelten Kontrolle zu allen Messzeitpunkten eine signifikant erhöhte Zellviabilität der LECs. Nach zwei Tagen erreichten die SynHA(+) Kulturen eine durchschnittliche metabolische Aktivität von  $353,95 \pm 98,90$

gegenüber den Kontrollen mit  $270 \pm 52,69$  (Abb. 18A). Es konnte eine kontinuierliche Reduktion der Vitalität von  $295,35 \pm 60,74$  nach 4 Tagen auf  $189,98 \pm 78,03$  nach 7 Tagen beobachtet werden, die auf einen Nährstoffmangel im wachstumsfaktorfreien Basalmedium zurückzuführen war. Dieser durch das Basalmedium induzierte Mangel an Nährstoffen simulierte den minder perfundierten Zustand in chronischen Wunden und ermöglichte eine isolierte Untersuchung des Effektes der Hyaluronsäure auf LECs. In der unbehandelten Kontrolle SynHA(-) wurde zu allen Zeitpunkten eine deutlich verminderte metabolische Aktivität festgestellt. Die Abnahme der Zellviabilität nach 4 und 7 Tagen zeichnete sich als paralleler Verlauf zur behandelten Gruppe SynHA(+) aus den bereits genannten Gründen ab. Die signifikant gesteigerte Zellviabilität gibt Hinweis auf einen Überlebensvorteil humaner lymphendothelialer Zellen bei Nährstoffmangel durch Zugabe der von Cyanobakterien sezernierten Hyaluronsäure.

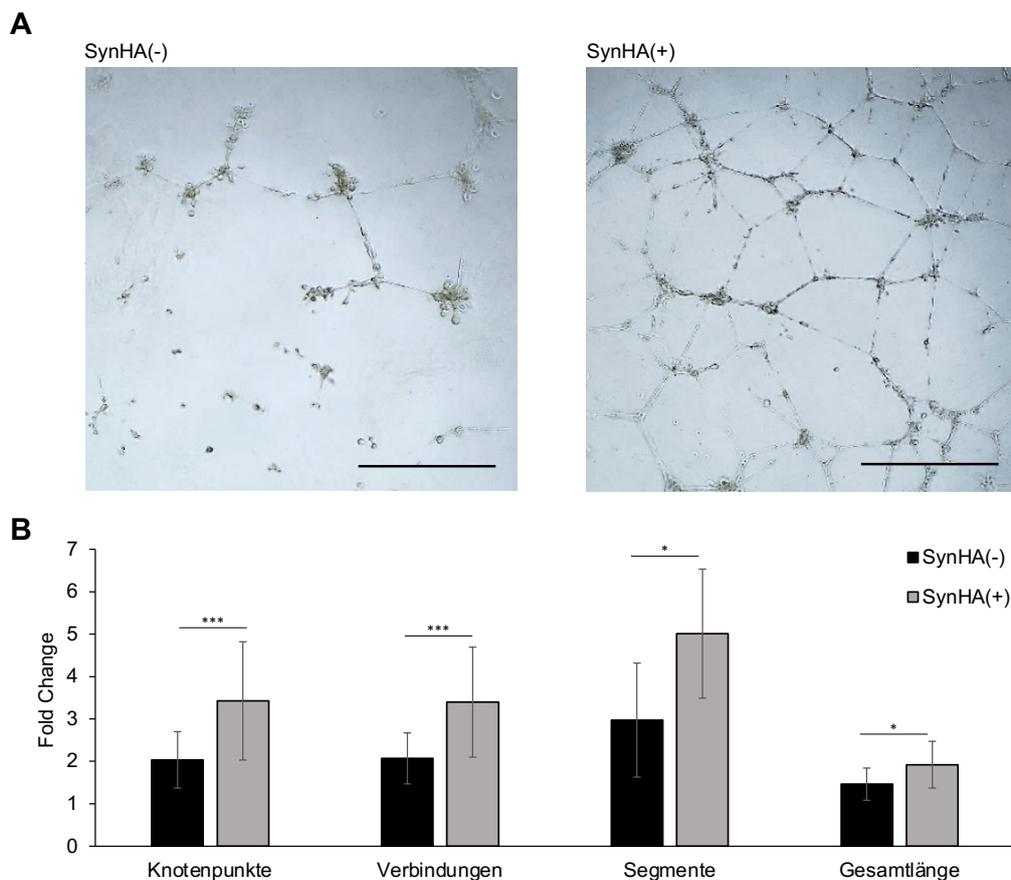


**Abbildung 18: Verbesserung der Zellviabilität von LECs durch Stimulation mit SynHA**

- (A) Bestimmung der metabolischen Aktivität von lymphendothelialen Zellen mittels AlamarBlue-Assays nach Stimulation der Zellen mit den Bakterienüberständen SynHA(+) und der Kontrolle SynHA(-) über einen Zeitraum von 7 Tagen. Quantifizierung des Fluoreszenzsignales bei einer Exzitationswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm nach 2 Tagen: SynHA(+):  $353,95 \pm 98,90$ ; SynHA(-):  $270 \pm 52,69$ ; nach 4 Tagen: SynHA(+):  $295,35 \pm 60,74$ ; SynHA(-):  $189,98 \pm 78,03$ ; nach 7 Tagen: SynHA(+):  $224,90 \pm 61,68$ ; SynHA(-):  $149,68 \pm 70,53$ ; n=4; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

Morphologische Veränderungen konnten in einer gesteigerten Bildung von Lymphgefäßen beobachtet werden. Hierfür wurden LECs in einem Tube-Formation-Assay durch Zugabe der Überstände der Hyaluronsäure enthaltenden Bakteriensuspension für 24h stimuliert, um die Verbesserung der Lymphangiogenese zu demonstrieren. In den repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 19A zeigte sich eine verstärkte Bildung eines lymphatischen Netzwerks mit einer deutlichen Zunahme an Knotenpunkten, Verbindungen, Segmenten und der Gesamtlänge in den mit Hyaluronsäure stimulierten LEC-Kulturen SynHA(+). Die Quantifizierung der Anzahl, sowie der Länge der Gefäße erfolgte mittels ImageJ Angiogenesis Analyzer. Die Messwerte wurden als Vielfaches (Fold Change) einer

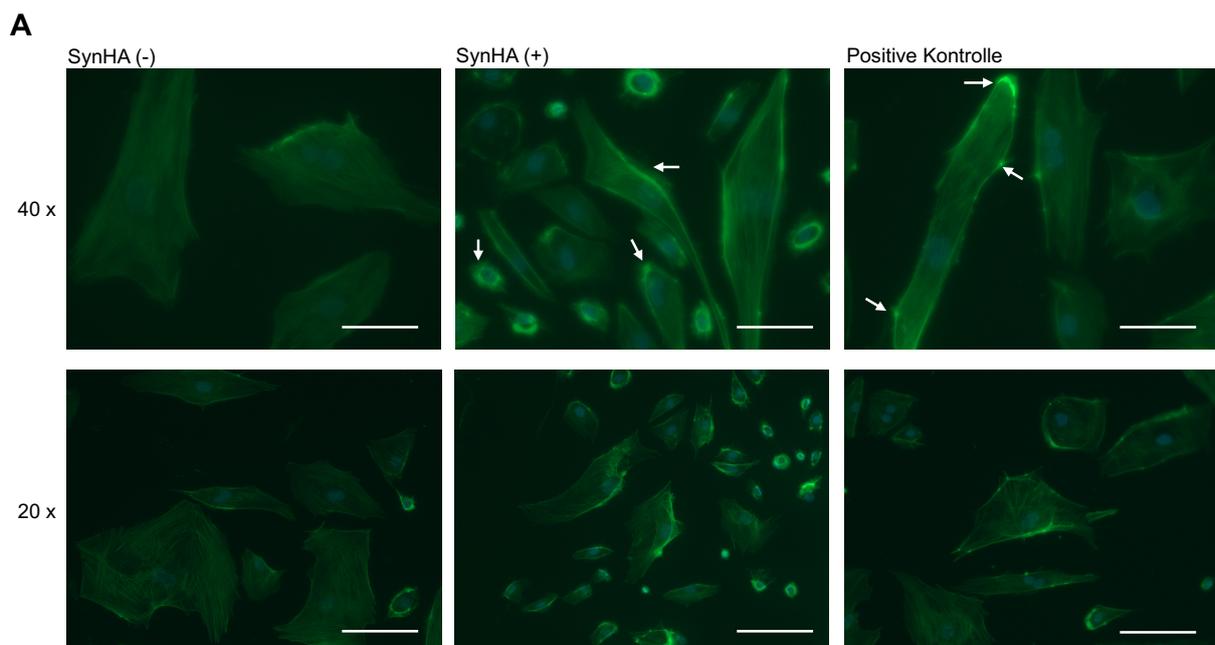
unbehandelten negativen Kontrolle durch Kultivierung der LECs in wachstumsfaktorfreien Basalmedium ohne Supplementation mit Überständen der Bakterienmedien dargestellt. Die Ergebnisse zeigten eine Zunahme der Anzahl der Knotenpunkte um das  $3,42 \pm 1,39$ -Fache, der Verbindungen um das  $3,39 \pm 1,29$ -Fache und der Segmente um das  $5,01 \pm 1,52$ -Fache durch die Bildung eines ausgeprägten Gefäßnetzwerks (Abb. 19B). Dabei wurde mindestens ein 1,5-facher Anstieg der Knotenpunkte und Verbindungen des Gefäßnetzwerks gegenüber der mit SynHA(-) behandelten LECs nachgewiesen. Zusätzlich konnten signifikante Unterschiede der Gesamtlänge des lymphatischen Netzwerks bei den mit HA stimulierten LECs im Vergleich zur Kontrollgruppe quantifiziert werden (Abb. 19B).



**Abbildung 19: Stimulierender Effekt der Hyaluronsäure von SynHA auf die Lymphangiogenese in vitro**

- (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (5x Vergrößerung) des Tube-Formation-Assays zum Nachweis der stimulierenden Wirkung der von SynHA produzierten Hyaluronsäure SynHA(+) auf die Lymphangiogenese. Maßstabsleiste: 500 µm.
- (B) Quantifizierung der Gefäßbildungskapazität der LECs nach 24h Stimulation mit synthetisierter Hyaluronsäure SynHA(+) bzw. der Kontrolle SynHA(-) mittels ImageJ Angiogenesis Analyzer Software mit Darstellung als Fold Change zur negativen Kontrolle. Messung der Anzahl der Knotenpunkte: SynHA(+):  $3,42 \pm 1,39$ ; SynHA(-):  $2,02 \pm 0,66$ ; Anzahl der Verbindungen: SynHA(+):  $3,39 \pm 1,29$ ; SynHA(-):  $2,06 \pm 0,6$ ; Anzahl der Segmente: SynHA(+):  $5,01 \pm 1,52$ ; SynHA(-):  $2,97 \pm 1,34$ ; Gesamtlänge des Gefäßnetzwerks: SynHA(+):  $1,92 \pm 0,55$ ; SynHA(-):  $1,46 \pm 0,38$ ; n=3; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001.

Für die Induktion der Lymphangiogenese ist unter anderem eine erhöhte Zellbeweglichkeit notwendig, die das Auflösen des starren Zellgerüsts aus F-Aktinfilamenten voraussetzt. Dieser Lösevorgang wurde mit Hilfe einer Phalloidin-Alexa-488 und DAPI-Färbung der lymphendothelialen Zellen nach Stimulation für 24h analysiert. Die Zellen wurden hierfür in wachstumsfaktorenfreiem Basalmedium kultiviert. Untersucht wurden die morphologischen Veränderungen, die von Wu et al., 2014 [60] beschrieben wurden. Es zeigte sich in den nicht stimulierten Zellen (SynHA(-)) eine geordnete Struktur der Aktin-Stressfasern mit gleichmäßiger Verteilung der Filamente (Abbildung 20A). Nach Stimulation konnte eine deutliche Intensivierung der F-Aktinfilamente sowie rosettenartige Punkte und teilweise stachelige Ausläufer um den Zellkörper nachgewiesen werden, die auf eine Reorganisation des Zellgerüsts hinwiesen. Zellen, die in regulärem Wachstumsmedium kultiviert wurden, dienten als positive Kontrolle. Der lymphangiogene Effekt der Hyaluronsäure der Cyanobakterien lässt sich somit auch zellmorphologisch anhand der Reorganisation des Zytoskeletts erkennen.



**Abbildung 20: Reorganisation der F-Aktin-Filamente im Zytoskelett von LECs**

- (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (40x und 20x Vergrößerung) der LECs mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phalloidin-Alexa 488 und DAPI zum Nachweis der Reorganisation der F-Aktinfilamente nach Stimulation für 24h mit Überständen des Mediums von nicht stimulierten Bakterien SynHA(-) und IPTG+ stimulierten Mikroorganismen SynHA(+) sowie regulärem Wachstumsmedium (positive Kontrolle). Maßstabsleiste: 10  $\mu\text{m}$  (40x); Maßstabsleiste: 50  $\mu\text{m}$  (20x).

Diese Ergebnisse signalisieren, dass die sezernierte Hyaluronsäure durch Steigerung des Zellmetabolismus, der Ausbildung lymphendothelialer Röhren und der erhöhten Zellbeweglichkeit entscheidende Veränderungen auf zellulärer Ebene zur Stimulation der Lymphangiogenese bewirkt.

## **5.6 Photosynthetische bioaktivierte Scaffolds stimulieren Lymphangiogenese *in vitro***

### **5.6.1 Biokompatibilität der SynHA und dermalen Hautersatzmaterialien**

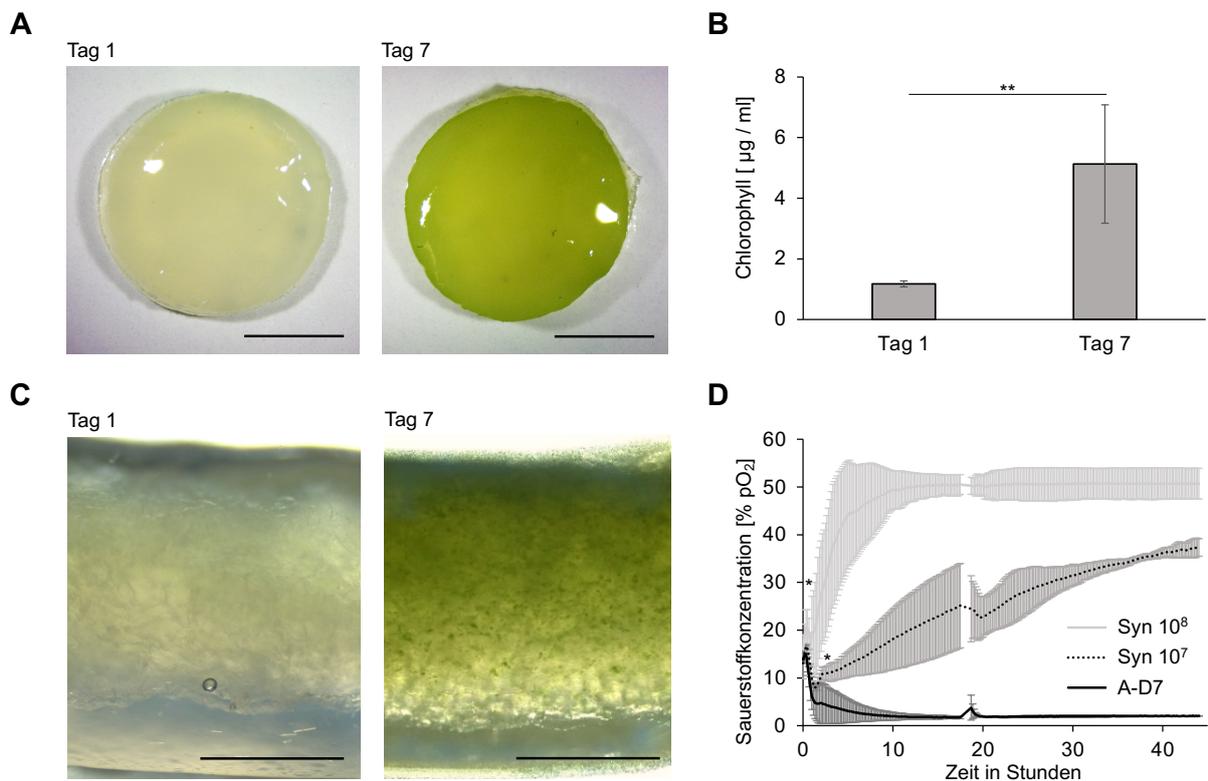
Nach dem Nachweis des lymphangiogenen Potentials von freigesetztem Sauerstoff und Hyaluronsäure der Bakterien wurde die Biokompatibilität von Cyanobakterien mit dermalen Hautersatzmaterialien überprüft, um im weiteren Verlauf eine *in vivo* Applikation zu ermöglichen. Dabei wurde zunächst untersucht, inwiefern Cyanobakterien in einem human kompatiblen kollagenbasierten Scaffold, das regulär in der klinischen Praxis zur Anwendung kommt, integriert werden können. Mit der von Schenck et al. [167] publizierte Methode, Mikroalgen mittels Fibrinhydrogel effizient in Hautersatzmaterialien einzukapseln, konnten auch Cyanobakterien erfolgreich in dermalen Hautersatzmaterialien ausgesät und fixiert werden, ohne ihre Vitalität und Proliferation einzuschränken. Ein deutliches Wachstum und eine erhaltene Lebensfähigkeit der Mikroorganismen konnte, wie in Abbildung 21A und 21C gezeigt, anhand der Zunahme der grünen Farbtintensität über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet werden. In den Querschnittsbildern von Abbildung 21C zeigte sich zudem eine homogene Verteilung der Bakteriensuspension mit einem überwiegenden Bakterienwachstum in den oberflächlichen Schichten der Kollagengerüste.

Der proliferative Effekt der Cyanobakterien in den Scaffolds wurde auch durch den fünffachen Anstieg des photometrisch nachgewiesenen Chlorophyllgehalts bestätigt. Von Tag 1 bis 7 steigerte sich die Chlorophyllkonzentration in den Scaffolds signifikant von  $1,17 \pm 0,09 \mu\text{g} / \text{ml}$  auf  $5,13 \pm 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$  (Abb. 21B).

Um eine suffiziente Sauerstoffproduktion trotz der bakteriellen Einkapselung mit Fibrinogen sicherzustellen, wurde die Sauerstofffreisetzung der besiedelten dermalen Hautersatzmaterialien mit verschiedenen Bakterienkonzentrationen mittels SensorDishReader unter hypoxischen Bedingungen (1 %  $\text{pO}_2$ ) und konstanter Lichtexposition für 45 Stunden gemessen. In den Scaffolds zeigte sich (Abb. 21D) bereits nach 5h eine Konzentration an gelöstem Sauerstoff von >50 %, was auf eine ausreichende Sauerstoffproduktion schon zu Versuchsbeginn hinwies. Der Sauerstoffgehalt blieb über einen Zeitraum von mindestens 2 Tagen konstant, als Zeichen für eine durchgehende Proliferationskapazität und Lebensfähigkeit der Mikroorganismen. Dabei wurde eine Korrelation des freigesetzten Sauerstoffs mit der ausgesäten Zelldichte festgestellt. Bei einer Anzahl von  $1 \cdot 10^8$  Bakterien (43,74 %  $\text{pO}_2$ ) pro Kollagengerüst zeigte sich bereits nach 10-stündiger Inkubation eine vierfache Zunahme des Sauerstoffgehaltes im Vergleich zu  $1 \cdot 10^7$  Bakterien ( $10^7$  Zellen = 14,50 %  $\text{pO}_2$ ; A-D7 Medium = 2,43 %  $\text{pO}_2$ ).

Neben den deutlichen Unterschieden in Abhängigkeit der Konzentration der ausgesäten Bakterien, wurde jedoch eine langsamere Zunahme der Sauerstoffproduktion in Scaffolds gegenüber Bakteriensuspension ohne Scaffold-Anwendung beobachtet (vergleiche Abbildung 14B und 21D). Dies ist am ehesten auf Einkapselung mit herkömmlichen Fibrinkleber (TISSEEL, Baxter, Unterschleißheim, PEI.H.11728.02.1) zurückzuführen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Cyanobakterien Syn7002 mit einem Kollagen basierten Hautersatzmaterial kompatibel sind und eine ausreichende und konstante Sauerstoffversorgung für Zellen und Gewebe unter Hypoxie bereitstellen.



**Abbildung 21: Nachweis der Biokompatibilität von SynHA und dermalen Hautersatzmaterialien**

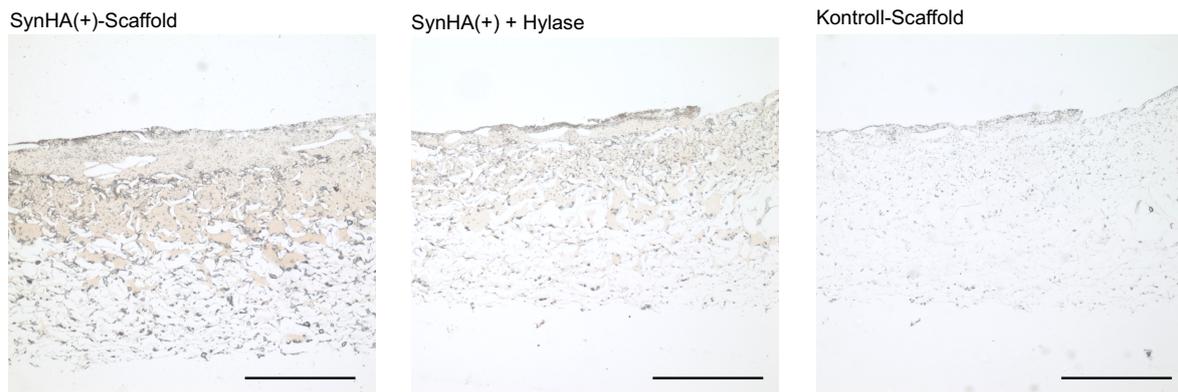
- (A) Repräsentative Bilder der besiedelten Hautersatzmaterialien unter Verwendung eines Stereoskops zeigen eine Zunahme der grünen Farbintensität nach 1 und 7 Tagen als Zeichen der Bakterienvitalität. Maßstabsleiste: 5 mm.
- (B) Photometrische Quantifizierung der Chlorophyll-Konzentration in  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . Nachweis einer Zunahme des Chlorophyll-Gehaltes in Scaffolds von  $1,17 \pm 0,09 \mu\text{g} / \text{ml}$  nach 1 Tag auf  $5,13 \pm 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$  nach 7 Tagen;  $n=5$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt:  $**p < 0,01$ .
- (C) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (5x Vergrößerung) des Querschnitts der Scaffolds zeigen eine vollständige homogene Verteilung und Fixierung der Bakterien im Scaffold und eine Zunahme der Farbintensität innerhalb von 7 Tagen;  $n=7$ ; Maßstabsleiste: 1 mm.
- (D) Messung der Sauerstoffkonzentration mittels SensorDishReader (SDR, PreSens GmbH) zum Nachweis einer suffizienten Sauerstoffproduktion unter Hypoxie und konstanter Lichtexposition über einen Zeitraum von 45 Stunden. Vergleich der Sauerstoff-Freisetzung in Hautersatzmaterialien in Abhängigkeit der besiedelten Bakterienzahl mit  $1 \cdot 10^7$ ,  $1 \cdot 10^8$  SynHA und reinem bakterienfreiem A-D7 Medium;  $n=3$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt:  $*p < 0,05$ .

### 5.6.2 Nachweis der Hyaluronsäureproduktion in Scaffolds

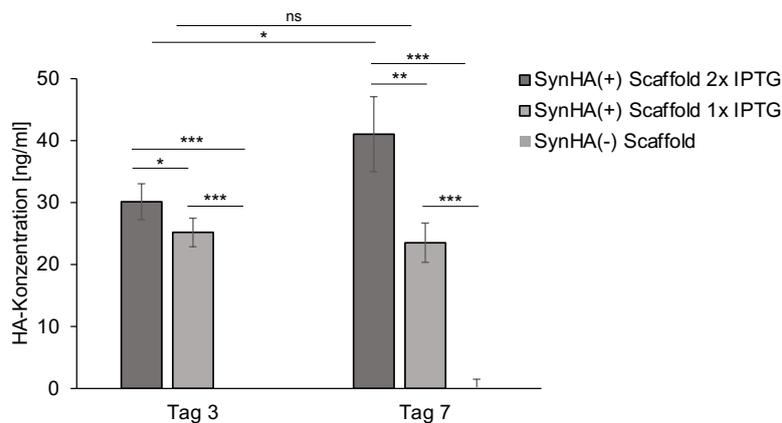
Die Hyaluronsäureproduktion der transgenen Cyanobakterien in den Scaffolds wurde kolorimetrisch und immunhistochemisch detektiert. Ein visueller Nachweis der Hyaluronsäure in den Scaffolds ist durch immunhistologische Methoden gelungen. Die Hyaluronsäure wurde mittels eines Hyaluronsäure-Bindungsproteins markiert und über einen Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex durch Zugabe des peroxidasespezifischen Substrates detektiert. Das SynHA(+)-Scaffold färbte sich in Abbildung 22A (links) deutlich und zeigte vor allem im Bereich der oberen Hälfte eine Kumulation der Hyaluronsäure, korrelierend mit der Bakterienverteilung der Querschnittsbilder in Abbildung 21C. Einige Schnitte wurden zum Beweis der Spezifität der gefärbten Strukturen mit Hyaluronidase (Hylase) behandelt und zeigten folglich eine reduzierte Farbintensität (Abb. 22A mittig). Die Kontroll-Scaffolds ohne Zugabe des HA-spezifischen Primärantikörpers waren hingegen farblos (Abb. 22A rechts) und bestätigten die Funktionsfähigkeit des Assays.

Zudem folgte ein Nachweis der von den besiedelten Scaffolds in das Kulturmedium abgegebenen Hyaluronsäure, um eine Sekretionsfähigkeit trotz der Fibrinfixierung sicherzustellen. Der kolorimetrische Nachweis der Produktion und Sekretion von Hyaluronsäure in den Scaffolds erfolgte mittels ELISA in den jeweiligen Kulturmedien. Die Induktion der HA-Synthese der Cyanobakterien wurde durch Zugabe des Promotors IPTG zu den Flüssigkulturen vor Besiedelung der Scaffolds erreicht (IPTG). In Abbildung 22B konnte ein signifikanter Unterschied der HA-Konzentration der IPTG-stimulierten Bakterienmedien gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe SynHA(-) festgestellt werden. Bei zweifacher Stimulation (2x IPTG) der Cyanobakterien wurde IPTG dem A-D7 Medium zur Inkubation in Flüssigkulturen und anschließend zusätzlich zur weiteren Inkubation der hergestellten Scaffolds zugegeben. Dabei zeigte sich eine signifikant zunehmende HA-Konzentration über den Zeitraum von 7 Tagen. Bereits nach 3 Tagen wurde eine Konzentration von  $30,15 \pm 2,89$  ng / ml gemessen, die nach 7 Tagen von  $41,05 \pm 6,04$  ng / ml anstieg. Dieser Anstieg der HA-Produktion blieb in den einfach mit IPTG behandelten Gruppen (1x IPTG) aus, da der weitere Stimulus in den Kultivierungsmedien der besiedelten Scaffolds fehlte. Hier konnte eine konstante HA-Sekretion von durchschnittlich 24 ng / ml beobachtet werden. Zu allen Messzeitpunkten war der quantifizierte HA-Gehalt in den Medien der zweifach stimulierten Bakterien signifikant höher als nach einfacher Stimulation, was eine doppelte Anwendung des IPTG für eine größere Ausbeute an Hyaluronsäure empfiehlt.

A



B



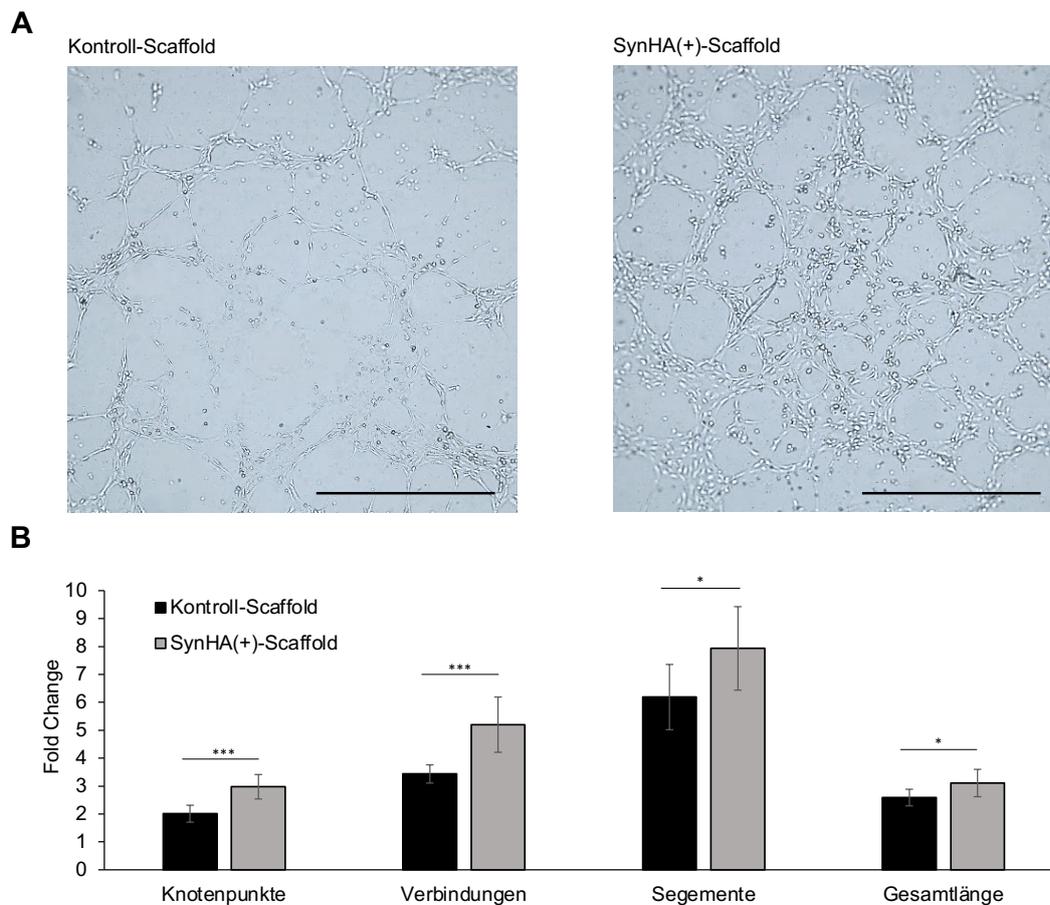
**Abbildung 22: Nachweis der Hyaluronsäureproduktion von Syn7002 in dermale Hautersatzmaterialien mit anschließender Sekretion in die Umgebung**

- (A) Mikroskopische Aufnahmen (5x Vergrößerung) einer immunhistologischen Färbung mittels HAP-Assay der synthetisierten Hyaluronsäure in Scaffolds (2x IPTG). Nachweis einer deutlich erhöhten Farbintensität (braun) in den mit SynHA(+) besiedelten Scaffolds im Vergleich zu der mit Hylase behandelten Kontrolle (SynHA(+) + Hylase) und der negativen Kontrolle in Abwesenheit des Primärantikörpers (Kontroll-Scaffold); n=5; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt; Maßstabsleiste: 1 mm
- (B) Konzentrationsbestimmung der aus den Scaffolds sezernierten Hyaluronsäure in den entsprechenden Kulturmedien nach zweifacher (2x) und einfacher (1x) Stimulation mit IPTG. Messung **nach 3 Tagen**: SynHA(+) Scaffold 2x IPTG: 30,15±2,89 ng/ml; SynHA(+) Scaffold 1x IPTG: 25,18±2,31 ng/ml; SynHA(-) Scaffold: 0±0,04 ng/ml; und **nach 7 Tagen**: SynHA(+) Scaffold 2x IPTG: 41,05±6,04 ng/ml; SynHA(+) Scaffold 1x IPTG: 23,52±3,17 ng/ml; SynHA(-) Scaffold: 0±1,5 ng/ml; n=3; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

### 5.6.3 Stimulierende Effekte der SynHA(+)-Scaffolds auf die Lymphangiogenese

Die Analyse der lymphangiogenen Wirkung der Scaffolds erfolgte mit Durchführung eines Tube-Formation-Assays in vitro. Dabei wurden die Scaffolds schwimmend auf dem Kulturmedium über den lymphendothelialen Zellen platziert und unter hypoxischen Bedingungen bei konstanter Beleuchtung inkubiert. Die aus den Scaffolds freigesetzte Hyaluronsäure induzierte nach 8 Stunden eine in Abbildung 23A sichtbare Lymphgefäßbildung

der LECs. Gleichzeitig führte der bakteriell photosynthetisch produzierte Sauerstoff zu einem sichtbar erhöhten Zellüberleben der LECs. Im Vergleich zu einem nicht besiedelten Kontroll-Scaffold war die Anzahl der Knoten, Verbindungen, Segmente und der Gesamtlänge des Lymphendothelnetzwerks signifikant gestiegen (Abb. 23B). Dabei konnten in der Gruppe der SynHA(+)-Scaffolds ein bis zu 1,5-fach höherer Anstieg an Verbindungen und Segmenten durch die Endothelzell-Formation gegenüber den Kontroll-Scaffolds quantifiziert werden. Die Fold Change beschreibt hierbei ein Vielfaches zu einer in wachstumsfaktorfreien Basalmedium unbehandelten Kontrolle der LECs.



**Abbildung 23: Bioaktivierte Scaffolds stimulieren Lymphangiogenese unter Hypoxie in vitro**

- (A) Mikroskopische Aufnahmen des Tube-Formation-Assays zum Nachweis der Bildung eines lymphatischen Gefäßnetzwerkes unter Hypoxie nach 8h Stimulation durch direkt sezernierte Hyaluronsäure aus den besiedelten Scaffolds. Maßstabsleiste: 500  $\mu$ m.
- (B) Quantifizierung der Anzahl der Knotenpunkte, Verbindungen, sowie Segmente und Messung der Gesamtlänge des gebildeten Gefäßnetzwerkes mittels ImageJ Angiogenesis Analyzer Software. Darstellung der Messwerte als Vielfaches (Fold Change) zur unbehandelten Kontrolle: **SynHA(+)-Scaffold**: Knotenpunkte:  $2,96 \pm 0,43$ -Fache; Verbindungen:  $5,2 \pm 0,98$ -Fache; Segmente:  $7,93 \pm 1,5$ -Fache; Gesamtlänge:  $3,1 \pm 0,49$ -Fache; **Kontroll-Scaffold**: Knotenpunkte:  $2,01 \pm 0,3$ -Fache; Verbindungen:  $3,4 \pm 0,32$ -Fache; Segmente:  $6,19 \pm 1,16$ -Fache; Gesamtlänge:  $2,58 \pm 0,29$ -Fache;  $n=3$ ; Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter Student's T-Test durchgeführt: ns = nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Zusammengefasst ließen sich Cyanobakterien Syn7002 in herkömmliche Hautersatzmaterialien integrieren und wiesen bei entsprechender Proliferations- und Sauerstoffproduktionskapazität eine hohe Biokompatibilität vor. Die generierten bioaktivierten Scaffolds zeigten eine suffiziente Hyaluronsäuresekretion mit ausreichender stimulierender Wirkung zur Induktion einer Lymphgefäßbildung unter Hypoxie.

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wird der Einfluss transgener photosynthetischer Cyanobakterien auf die Lymphangiogenese *in vitro* untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Bakterienstamm *Synechococcus sp. 7002* erstmalig in Verbindung mit humanen dermalen Zellen angewandt. In den ersten Untersuchungen wurden die Bakterien an humane Zellkulturbedingungen angepasst. Zudem konnte eine Biokompatibilität mit den wesentlichen Zellen der menschlichen Haut nachgewiesen werden, was vielversprechende Lösungsansätze für die chronische Wundbehandlung ermöglicht. Chronische Wunden sind mit einem reduziert perfundierten Wundgrund vergesellschaftet und stellen durch den resultierenden Wachstumsfaktormangel und der Hypoxie ein zellfeindliches Milieu dar. Der zweite Schritt galt daher der Herstellung einer lokalen perfusions-unabhängigen adäquaten Sauerstoffquelle. Die photosynthetischen Eigenschaften der transgenen Cyanobakterien ermöglichten bei ausreichender Illumination in Abhängigkeit von der Bakterienzahl eine suffiziente Sauerstoffproduktion. Dies führte zu einer signifikanten Verbesserung des Zellüberlebens humaner lymphendothelialer Zellen (LECs) unter hypoxischen Bedingungen. Im dritten Schritt wurde die Sekretion des regenerativen Faktors Hyaluronsäure als Schlüsselmolekül zur Induktion der Lymphangiogenese untersucht. Nach Zugabe des Promotors IPTG erzeugte die bakteriell synthetisierte Hyaluronsäure eine deutliche Steigerung der Gen- und Proteinexpression lymphangiogener Marker der LECs. Zudem zeigte die sekretierte HA stimulierende Effekte auf die LECs durch eine signifikante Verbesserung der metabolischen Aktivität, Induktion einer Röhrenbildung sowie Veränderungen im Zytoskelett. Die durch Hyaluronsäure induzierte Lymphangiogenese zeigt somit großes Potential zur Verbesserung der chronischen Wundheilung. Um schließlich eine dermale Anwendung der Mikroorganismen zu ermöglichen, erfolgte eine erfolgreiche Kultivierung transgener Cyanobakterien in herkömmliche, kollagenbasierten Hautersatzmaterialien zur Entwicklung bioaktivierter Scaffolds. Hierbei zeigte sich eine homogene Verteilung der Bakteriensuspension in den Kollagengerüsten ohne wesentliche Einschränkung der Bakterienproliferation, Sauerstoff- und Hyaluronsäureproduktion. Die bioaktivierten Scaffolds führten zu einer signifikanten Steigerung der Lymphangiogenese unter hypoxischen Bedingungen und stellen somit die Basis für weitere *in vivo* Versuche.

## 6.1 Hintergrund für die Verwendung von *Synechococcus sp. PCC 7002*

In dieser Arbeit wurden zu Beginn die Voraussetzungen für die Verwendung von Cyanobakterien in der Medizin und am Menschen untersucht. Hierbei konnten die Bakterien erfolgreich an humanen Bedingungen adaptiert und die Verwendung von Zellkultureinsätzen für weitere Versuche getestet werden. Der Hintergrund für die Verwendung von *Synechococcus sp. Stamm PCC 7002* in dieser Arbeit, sowie für den biomedizinischen Einsatz in Hautersatzmaterialien wird im Folgenden erläutert.

Im Vergleich zu den bisher von Schenck et al. [167] verwendeten Mikroalgen *Chlamydomonas reinhardtii* bieten einzellige euryhaline, mixotrophe Cyanobakterien zahlreiche Vorteile für die dermale Anwendung im inflammatorischen Gewebe als auch in der Handhabung. Die Proliferationskapazität der *Synechococcus sp. Stamm PCC 7002* ist mit einer Verdopplungszeit von durchschnittlich 4 Stunden zweifach höher als das Wachstum der *C. reinhardtii* mit circa 8-10 Stunden [168]. Das Temperaturoptimum liegt zudem bei 38°C [169], was annähernd äquivalent zu den humanen Bedingungen ist und auch die Kultivierung mit humanen dermalen Zellen vereinfacht. Vergleichsweise stellt die optimale Wachstumstemperatur der Mikroalgen *Chlamydomonas reinhardtii* mit unter 30 °C (18 °C bis 28 °C) dagegen eine Herausforderung zur Herstellung einer Kokultur dar und führt zur Proliferationseinschränkung bei humaner dermaler Applikation [170]. Allerdings gilt zu berücksichtigen, dass sich die Körpertemperatur auf der Haut der Extremitäten und Akren abhängig von der Umgebungstemperatur meist unterhalb der Körperkerntemperatur von 37 °C befindet und somit von den regulären Untersuchungsbedingungen abweicht [171]. Die reguläre Temperatur im Wundgrund variiert laut Gethin et al. [172] zwischen 30,2 und 33,0 °C. Bei einer dermalen Applikation der Bakterien ist daher eine reduzierte Proliferationskapazität zu erwarten. Aufgrund der notwendigen Illumination zur Induktion der Photosynthese ist die Resistenz der Bakterien gegenüber hohen Lichtintensitäten von besonderer Bedeutung [173]. Den mixotrophen Kulturen konnte unter anderem eine hohe Toleranz gegenüber extrazellulären Variationen wie Abweichungen des pH-Wertes, des Salzgehaltes und des Kulturmediums mit nur geringen Veränderungen des Transkriptionsmusters nachgewiesen werden [169]. Auch bei Temperaturschwankungen zeigen sich nur geringe Auswirkungen auf das Transkriptom. Sie erwiesen sich auch gegenüber oxidativem Stress als widerstandsfähig, was auf eine Anpassungsfähigkeit an die Mikroumgebung im Entzündungsgebiet chronischer Wunden hindeutet [169].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Kokultivierung auf Zellkultureinsätze zurückgegriffen, die eine saubere Trennung beider Organismen ohne Bakterienrückstände und Verunreinigungen

ermöglichten. Ein Nachteil der Anwendung war die Reduktion der Kultivierungsfläche um circa das 6-Fache (24-Well: 1,9 cm<sup>2</sup>; Insert: 0,336 cm<sup>2</sup>), die nachweislich eine Einschränkung der Bakterienproliferation bewirkte.

Zusammengefasst kann die Anwendung von Mikroorganismen ein hohes Potential im Bereich des Tissue Engineering entfalten. Dabei hat vor allem die Verwendung von Cyanobakterien in der Medizin diverse Vorteile gegenüber anderen Mikroorganismen. Diese lassen sich ideal unter Berücksichtigung der oben genannten Aspekte an humane Zellbedingungen adaptieren und erfüllen somit die Voraussetzungen für weitere *in vitro* Versuche.

## **6.2 Biokompatibilität von *Synechococcus sp. Stamm PCC 7002* mit humanen dermalen Zellen**

Die Grundlage dieser Arbeit bildet die Biokompatibilität des verwendeten Bakterienstammes *Synechococcus sp. Stamm PCC 7002* mit humanen dermalen Zellen. Es wurde nachgewiesen, dass sich Cyanobakterien sowohl mit 3T3-Fibroblasten als auch mit HaCaT-Keratinocyten sowie mit lymphendothelialen Zellen ohne signifikante wachstumshemmenden Einflüsse kultivieren lassen [163].

Erste Versuche wurden mit 3T3 Fibroblasten durchgeführt, die aufgrund einer Verdünnung des Kulturmediums bei der Herstellung von Kokulturen mit einer Wachstumsreduktion im Vergleich zur Kontrolle einhergingen, was bei weiteren Versuchen korrigiert und berücksichtigt wurde. Es ist eine direkte positive Korrelation der Bakterienzahl mit der Proliferationsrate von Fibroblasten aufgefallen. Dies lässt vermuten, dass Cyanobakterien ein günstiges Wachstumsmilieu für Fibroblasten erzeugen [163].

Davon abweichend, beobachtete Yin et al. [174] bei der Inkubation von Cyanobakterien mit HaCaT Keratinocyten und Fibroblasten einen hemmenden Effekt auf die Proliferation beider Zellarten, jedoch stimulierende Effekte auf die Migration von Keratinocyten im Scratch-Assay. Diese Erkenntnisse stehen den in dieser Arbeit *in vitro* generierten Ergebnissen, sowie deren *in vivo* Resultaten entgegen. Nach dem allgemein bekannten Wundheilungsprozess sollte unabhängig der Cyanobakterien in der von Yin et al. generierten Kokultur durch intensivierte Keratinocyten-Fibroblasten Interaktion sowie deren Wachstumsfaktor-Netzwerke die Proliferation und Migration beider Zellarten zur Bildung eines Granulationsgewebes gefördert werden [175]. Zudem zeigte Williams et al. [176] eine signifikante Hochregulation des Keratinocyten-Chemoattraktant / Wachstumsreguliertes Onkogenes (KC/GWO) bereits 4 Stunden nach intravenöser Injektion von *Synechococcus elongatus* in Ratten, was für die Annahme einer Stimulation der Proliferation dieser Zellreihe eine genetische Grundlage

schaft. Diese Studie untersuchte weiterhin die Sicherheit der Anwendung von *Synechococcus elongatus* in Säugetieren mit dem Ergebnis, Toxizität und Pathogenität der Bakterien ausschließen zu können. Auch wenn die Untersuchungen an Ratten durchgeführt wurden und sich nicht direkt auf den Menschen übertragen lassen, decken sich die Ergebnisse mit den hier gewonnenen Erkenntnissen *in vitro* und versprechen für eine Verträglichkeit der Cyanobakterien. Durch die kurze Inkubationszeit können allerdings keine Aussagen über mögliche Langzeitfolgen erhoben werden [163].

Zusammengefasst bestätigen auch andere Autoren eine Biokompatibilität der Cyanobakterien mit humanen dermalen Zellen. Trotz teilweiser widersprüchlicher Ergebnisse *in vitro* zeigen sich bisher keine nachteiligen Auswirkungen. Aus diesen Gründen versprechen *Syn7002* eine hohe Biokompatibilität und großes Potential für den Einbau in biomedizinische Ansätze zur Regeneration chronischer Wunden [163].

### **6.3 Herstellung einer adäquaten Sauerstoffversorgung für dermale Zellen unter hypoxischen Bedingungen**

In der vorgelegten Arbeit wurde die Wirkung des von Cyanobakterien produzierten Sauerstoffes auf die bereits genannten dermalen Zelltypen untersucht. Die Kokultivierung zeigte während der Inkubation in einer sauerstoffarmen Umgebung eine deutliche Wirkung durch die Erhöhung der Zellvitalität und Zellzahl aller untersuchten Zellarten [163].

Eine adäquate Sauerstoffversorgung in Gewebe ist bis heute eine ungelöste Herausforderung im Tissue Engineering. Die hyperbare Sauerstofftherapie (HBOT) wurde 1956 von Boerema et al. [177] erstmals vorgestellt und findet seit Mitte der 1960er Jahren Anwendung als mögliche therapeutische Lösung für die chronische hypoxische Wundsituation. Dabei atmen Patienten in einer Überdruckkammer reinen Sauerstoff ein, um die Oxygenierung des Blutes zu erhöhen und den Metabolismus in schlecht perfundierten Geweben anzuregen. Aufgrund fehlender qualitativ hochwertiger Studien und teilweise inkonsistenter Ergebnisse wurde die Wirkung kontrovers diskutiert [178], jedoch wurden kurzfristige lokale und systemische Effekte zur Heilung diabetischer Fußulzera und eine Senkung der Amputationsrate erreicht [179]. Neueste Studien zeigen einen positiven Effekt auf die Proliferation und Migration von Zellen in das Wundgebiet, sowie eine Stimulation der Angiogenese [121, 122, 180]. Je nach Literatur ist die HBOT allerdings auf eine Anwendungsdauer von 45 min bis maximal 5 Stunden pro Sitzung begrenzt [180, 181] und konnte bisher nur eine kurzfristige Wirkung erreichen [179, 182]. Dies erfordert neue Ansätze zur Nutzung von Sauerstoff als Schlüssel der Wundtherapie.

Durch die photosynthetische Sauerstoffherstellung stellen Cyanobakterien eine mögliche alternative, lokale und kontinuierliche Sauerstoffquelle für das Gewebe unabhängig von der Blutperfusion dar. Dieser Ansatz ist allerdings nicht neu und wurde, wie bereits beschrieben, von Schenck et al. 2015 [167] und Hopfner et al. 2014 [183] mit anderen Mikroorganismen (*Chlamydomonas reinhardtii*) erfolgreich getestet. Shiekh et al. [184] versuchte den Sauerstoffmangel ohne Bioaktivierung zu umgehen, indem ein Scaffold aus einem antioxidativem polymer Kryogel erzeugt wurde, das eine kontinuierliche Sauerstofffreisetzung über 10 Tage und damit einen Erhalt der Lebensfähigkeit von Kardiomyozyten unter Hypoxie ermöglichte. Der Vorteil dieses Ansatzes ist vor allem eine Unabhängigkeit von Mikroorganismen und die Vermeidung potenzieller gesundheitlicher Gefahren für den menschlichen Körper. Jedoch bieten Mikroorganismen neben der Sauerstoffproduktion noch weitere gentherapeutische Ansätze für die komplexe Pathophysiologie der chronischen Wundheilung. Zudem halten sich chronische Wunden nicht an den Zeitverlauf des regulären Wundheilungsprozesses [185]. Der sauerstofffördernde Zeitraum von 10 Tagen ist für eine abgeschlossene Hautregeneration bei chronischen Wunden wahrscheinlich zu kurz.

Zusammengefasst bieten *Synechococcus sp. PCC 7002* durch die kontinuierliche Sauerstofffreisetzung direkt ins chronische Wundbett eine mögliche langfristige und lokale Lösung zur Überwindung hypoxischer Zustände in chronischen Wunden.

#### **6.4 Einfluss der bakteriell-synthetisierten Hyaluronsäure auf Gen- und Proteinexpression der LECs**

Ein wesentlicher Vorteil der Anwendung von *Syn7002* liegt in der bereits weit verbreiteten Verwendung der Organismen in der Biotechnologie. Dank der bereits etablierten Werkzeuge zur Genmodifikation gestaltet sich die Transformation zur Entwicklung transgener Stämme von *Syn7002* mit dem Ziel der Synthese bioaktiver, pro-regenerativer rekombinanter Moleküle, einfach [186]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass Cyanobakterien durch die genetische Modifikation neben der photosynthetischen Sauerstoffproduktion nicht nur das Zellüberleben im Wundgebiet verbessern, sondern auch die Expression lymphatischer Gene erhöhen.

Hierfür wurde die von Bakterien sezernierte HA-Konzentration mit 10 µg/ml im Medium bestimmt und deren Effekt auf bekannte lymphatische Marker nach Hirakawa et al. [160] mittels qPCR und Immunhistologie untersucht. Der gemessene HA-Gehalt entsprach dem von Wu et al. [60], Yu et al. [187] und Bauer et al. [188] nachgewiesenen optimalen Konzentrationsfenster von 1 bis 12 µg/ml zur Induktion eines Lymphgefäßwachstums.

Aufgrund der im Rahmen der Versuche durchgeführten 1:100-Verdünnung des Bakterienmediums mit dem Zellmedium, muss bei den beobachteten Ergebnissen von einer abgeschwächten Wirkung ausgegangen werden. Wie bereits Eingangs beschrieben, bestimmt zudem das molekulare Gewicht der HA deren Funktion und Wirkungsweise [58, 60]. Bisher ist eine Molekülgröße von bis zu 35 kDa der von den Bakterien sezernierten Hyaluronsäure in einer einzigen Studie von Zhang et al. [143] untersucht worden. Doch die Ergebnisse lassen vermuten, dass ausreichend niedrig-molekulare Moleküle das Bakterium verlassen.

Das Ergebnis der qPCR überraschte, indem der erwartete Anstieg der Expression des HA spezifischen Rezeptors LYVE-1 sich nur schwach abzeichnete. Dennoch konnte bei allen lymphatischen Markern eine relativ gleichmäßige Hochregulation nachgewiesen werden, mit einer einzigen Signifikanz im Gen Prox1, das zusammen mit VEGFR-3 die Differenzierung von venösen Gefäßzellen zu lymphendothelialen Zellen sowie Proliferation und Migration induziert [189]. Eine signifikante Hochregulation der Proteinexpression von VEGFR-3 und LYVE-1 nach HA-Stimulation zeigte sich auch auf der Oberfläche der LECs nach immunhistologischer Färbung. Diese Ergebnisse decken sich mit dem von Mondalek et al. [190] beobachteten Einfluss von HA auf die Wundheilung und Regeneration im Urothel der Ratte. Bei immunhistochemisch nachgewiesener HA-Ablagerung während der Blasenregeneration konnte eine erhöhte Expression lymphangiogener Marker wie LYVE-1 und VEGFR3 identifiziert werden, die mit der Urotheldifferenzierung korrelierte.

Die Rolle des LYVE-1 Rezeptors ist noch nicht vollständig aufgeklärt [58]. Jedoch wurde der Zusammenhang zwischen dem Schlüsselmolekül Hyaluronsäure und einer pro-lymphangiogenen Funktion von Bauer et al. [188] bei primären lymphatischen Endothelzellen *ex vivo* sowie in explantiertem Gewebe und Tierversuchen *in vivo* durch die Akkumulation von HA in kolorektalen Karzinomen bestätigt. Vor allem im Rahmen von Tumormetastasierung wurde die Wirkung von HA zur Induktion der Lymphangiogenese in vielen Studien beschrieben [108, 111].

Da der Rezeptor VEGFR-3 bisher dem Schlüsselmolekül VEGF-C zugeordnet wurde [191, 192], kann der stimulierende Effekt durch Hyaluronsäure zur verstärkten Genexpression von VEGFR-3 entweder als Nebeneffekt im Rahmen der Induktion der Lymphangiogenese oder einer bisher unbekanntem Rezeptorwirkung von HA auf VEGFR-3 erklärt werden. Die geringste Steigerung der Genexpression konnte bei VEGF-C beobachtet werden, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass LECs im Rahmen der Lymphangiogenese selbst nur gering VEGF-C produzieren oder nicht über dieses Molekül kommunizieren. Allerdings zeigte die Arbeitsgruppe von Bauer et al. [188] einen synergistischen Effekt von Hyaluronsäure mit VEGF-C auf die Aussprossung von Lymphkapillare. Jung et al. [193] konnte neben einem

stimulierenden Effekt von HA auf die Kapillarbildung, die Lymphangiogenese und die Zellmigration auch eine erhöhte VEGF-C Konzentration in Makrophagen nachweisen. Die Arbeitsgruppe stellte die Hypothese eines Zusammenhanges mit dem Toll-like Rezeptor 4 auf, der somit zur Expression von VEGF-C als Signalmolekül zwischen LECs und Makrophagen dienen könnte. Eine neue Studie entdeckte sogar eine LYVE-1 Rezeptorexpression auf Makrophagen mit Einfluss auf die Kontrolle der Kollagenproduktion [194]. Damit wurde der Rezeptor erstmals außerhalb von Lymphgefäßen lokalisiert, was die potenzielle Wirkung und Therapiestrategien in der Wundheilung erweitern könnte.

Die vielseitige Wirkung von Hyaluronsäure auf Zellen ist Gegenstand aktueller Forschung. Zusammengefasst ist Hyaluronsäure ein möglicher Schlüssel zur Induktion der Lymphangiogenese, deren potenzielle wundheilungsfördernde Effekte noch nicht vollständig erkundet und ausgeschöpft wurden.

## **6.5 Metabolische und morphologische Veränderungen der LECs durch sekretierte Hyaluronsäure**

Der Effekt der Hyaluronsäure zeigte sich neben der veränderten Genexpression auch anhand metabolischer und morphologischer Veränderungen der lymphatischen Zellen. Dabei zeigen die Ergebnisse eine signifikante Steigerung der metabolischen Aktivität nach Zugabe der Bakterienüberstände gegenüber der Kontrolle, was auf eine erhöhte Zellvitalität und Proliferation der lymphatischen Zellen rückschließen lässt. Der stimulierende Effekt auf die Proliferation von LECs wurde bereits in verschiedenen Studien erfolgreich nachgewiesen und geht mit unseren Ergebnissen einher [187, 188]. In dieser Arbeit ist zu beachten, dass aufgrund des verwendeten Basalmediums zur Simulation der chronischen Wundsituation eine nährstoffarme Zellumgebung vorliegt, was mit einem Mangel anderer regenerativer Faktoren vergesellschaftet ist. Die Kultivierung unter diesem eigentlich proliferationshemmenden Milieu ist eine mögliche Ursache für die allgemeine Reduktion der Zellvitalität nach 7 Tagen in beiden Gruppen.

Eine ideale Nachweismethode der Angiogenese stellt der Tube-Formation-Assay dar, der die verstärkte Bildung eines lymphatischen Röhrensystems als Reaktion auf den HA-Stimulus verdeutlichte. Es lassen sich die Unterschiede in der Lymphangiogenese bereits mikroskopisch erkennen, doch mit Hilfe des auch in anderen Studien verwendeten ImageJ Angiogenesis Analyzer konnten einzelne Verbindungen und Knotenpunkte präzise quantifiziert werden [159, 195]. Eine Herausforderung stellte dabei die gleichmäßige Verteilung der gallertigen Basalmembranmatrix Geltrex im Kulturwellboden dar, die durch eine unregelmäßige Struktur die Bildauswertung beeinträchtigen kann.

Eine wesentliche Voraussetzung zur Bildung von lymphatischen Röhren ist die notwendige Zellmotilität der LECs, die durch die Reorganisation des Aktinfilament-Systems erreicht werden kann. Diese morphologischen Veränderungen wurden von Wu et al. 2014 [60] mit Hilfe einer Phalloidin-Färbung erstmals entdeckt und konnte in den Versuchen anhand repräsentativer mikroskopischer Aufnahmen bestätigt werden. Die bakteriell sezernierte Hyaluronsäure erzeugte deutliche Veränderungen im Zytoskelett gegenüber der Vergleichsgruppe. Das Rearrangement der F-Aktin-Stressfasern dient laut Jackson et al. [58] neben der erhöhten Zellmotilität auch einer gesteigerten Beweglichkeit der LYVE-1 Rezeptoren auf der Zelloberfläche zur Dimerisierung und Clusterbildung. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Zusammenlagerung in Clustern die Selektivität der Bindung von LYVE-1 an Hyaluronsäure von unterschiedlichem molekularem Gewicht entscheiden kann [58].

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien wird in dieser Arbeit durch die von Cyanobakterien produzierte Hyaluronsäure eine Verbesserung der Zellvitalität von LECs bei Nährstoffmangel sowie ein stimulierender Effekt auf die Lymphangiogenese mit entsprechenden morphologischen Veränderungen bewirkt.

## **6.6 Kultivierung transgener Cyanobakterien in kollagenbasiertem Hautersatzmaterial**

Im Hinblick auf eine mögliche *in vivo* Applikation der transgenen Cyanobakterien wurde die Biokompatibilität dieser mit dermalen Hautersatzmaterialien untersucht. Angelehnt an die Versuche von Schenck et al. [167] und Hopfner et al. [183] wurden dabei die in einer Flüssigkultur gezüchteten Bakterien unter Verwendung eines Fibrinklebers (TISSEEL, Baxter, Unterschleißheim) in einem herkömmlichen Kollagengerüst (Integra Matrix) fixiert. Das Kollagengerüst findet reguläre Anwendung im klinischen Alltag und ist von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) geprüft [196]. Diese Fixierungsmethode hat sich in verschiedenen Studien bereits als erfolgreich erwiesen und wurde aufgrund der zusätzlichen wundheilungsfördernden Aspekte des Fibrins gewählt [197].

Die Cyanobakterien zeigten eine homogene Verteilung im Kollagengerüst mit einer erhaltenen Vitalität über mindestens 7 Tage sowie eine Proliferation durch farbliche Intensivierung und Steigerung des Chlorophyllgehalts. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen von Schenck et al. [167] überein, der zur Bioaktivierung der Integra Matrix auf den Algenstamm *Chlamydomonas reinhardtii* zurückgriff. Die Algen wurden allerdings nicht genetisch mutiert und dienten somit nur als Sauerstoffquelle zur Wundregeneration. Dabei war die von Cyanobakterien produzierte O<sub>2</sub>-Konzentration um das Dreifache höher als der in der Arbeit

von Schenck et al. [167] gewonnene Sauerstoffgehalt, was eine bessere therapeutische Wirkung versprechen könnte. Als möglicher Grund hierfür kann der fünffach größere Zelldurchmesser der Algen von circa  $\varnothing$  10  $\mu\text{m}$  und die damit verminderte Dichte und Zellzahl im besiedelten Scaffold vermutet werden [198, 199]. Folglich ermöglichen *Synechococcus sp. 7002* mit einer Zellgröße von  $\varnothing$  2  $\mu\text{m}$  eine höhere Besiedelungsdichte in Hautersatzmaterialien [200]. Zudem konnte eine Korrelation der Sauerstoffkonzentration direkt mit der verwendeten Bakterienzahl beobachtet werden, sodass eine besonders hohe Zelldichte für die maximale Sauerstoffausbeute angestrebt werden sollte.

Es ist zu beachten, dass es sich in der vorliegenden Arbeit um eine *in vitro* Studie handelt, die optimale Kulturbedingungen für Zellen und Bakterien bereitstellt. Im Rahmen der *in vivo* Applikation, stellt sich bei Abwesenheit des Kulturmediums die Frage, über welchen Zeitraum das mit dem Fibrin vermischte Kulturmedium als Nährstoffreserve ausreicht. Trotz nachgewiesener Biokompatibilität aller Bestandteile des Scaffolds können zudem körpereigene Stoffe die Vitalität der Cyanobakterien bedrohen. Daneben unterliegt die Hauttemperatur hoher Variabilität [201], was wiederum Einfluss auf die Proliferationskapazität der Cyanobakterien nimmt, sodass diese Studie nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar ist. Dennoch bildet diese Arbeit eine Grundlage für kommende *in vivo* Vorhaben, die eine längerfristige Anwendung der bioaktivierten Scaffolds zur Deckung eines Vollhautdefekts im Mausmodell untersuchen könnten.

## **6.7 Einfluss bioaktivierter Scaffolds auf die Lymphangiogenese unter Hypoxie**

Abschließend wurde die funktionelle Relevanz der bioaktivierten Hautersatzmaterialien *in vitro* untersucht. Unter Verwendung des HABP-Streptavidin-Biotin-Komplexes konnte ein hoher Hyaluronsäuregehalt in den mit Cyanobakterien besiedelten Scaffolds dargestellt werden. Durch die Applikation von Hyaluronidase vor der Färbung ausgewählter Kontrollschnitte, sollten HA-Moleküle abgebaut werden, sodass sichergestellt werden konnte, dass der verwendete Farbkomplex keine anderen Strukturen im Hautersatzmaterial markierte. Dies wurde durch die deutlich reduzierte Farbintensität der mit Hyaluronidase behandelten Schnitte, bestätigt.

Zudem wurde die Hyaluronsäure auch im Kulturmedium außerhalb des Scaffolds detektiert, was ein wichtiger Nachweis für den Austritt von HA aus dem mit Fibrinkleber fixierten Kollagengerüst ist. Allerdings wurde eine deutlich geringere Konzentration von 20 bis 40 ng/ml beobachtet. Als mögliche Ursache kann vermutet werden, dass die sezernierte Hyaluronsäure überwiegend im Fibrinkleber gefangen bleibt und das Scaffold nicht verlassen kann. Auch die

intensive immunhistologische HA-Färbung der Schnitte legt diese Überlegung aufgrund des hohen Gehaltes an Hyaluronsäure nahe.

Interessanterweise konnte die HA-Konzentration durch eine zweifache Stimulation der Cyanobakterien mit IPTG im Rahmen der Herstellung des Scaffolds signifikant gesteigert werden. Dies könnte einen möglichen Lösungsansatz für eine höhere Ausbeute an Hyaluronsäure darstellen.

Durch den Nachweis einer reduzierten HA-Freisetzung aus dem Kollagengerüst wurde in dieser Arbeit der Effekt der bioaktivierten Scaffolds auf lymphatische Endothelzellen mittels Tube-Formation-Assays überprüft. Es zeigte sich eine deutlichere Ausprägung des Lymphgefäßsystems gegenüber der Kontrolle, was eine funktionelle Relevanz weiterhin unterstützt. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese aufstellen, dass Fibrinkleber wie ein Filter fungiert und langkettige Hyaluronsäure zurückhält, sowie niedrigmolekulare HA-Moleküle das Scaffold verlassen können. Im nächsten Schritt könnte eine Unterscheidung des molekularen Gewichtes der Hyaluronsäure in und außerhalb des Scaffolds neue Erkenntnisse liefern.

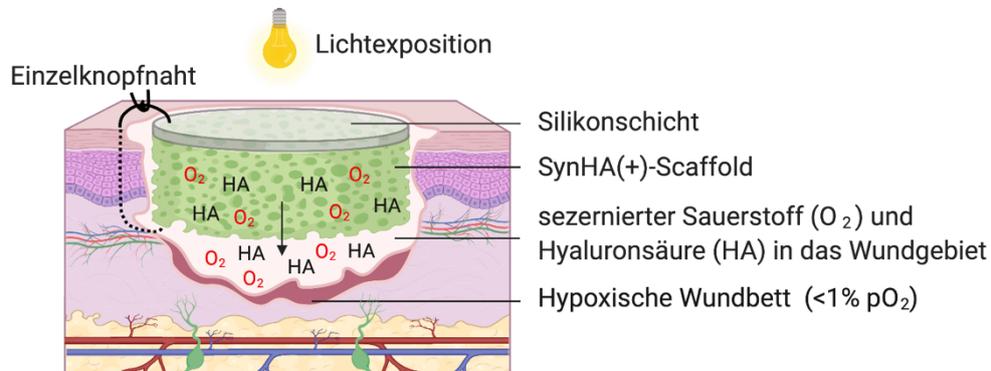
Zusammengefasst erweisen sich bioaktivierte Hautersatzmaterialien als funktionsfähiger Induktor der Lymphangiogenese, deren therapeutische Wirkung im Rahmen einer *in vivo* Studie untersucht werden kann.

## 6.8 Fazit und Ausblick

Aus dieser Arbeit lässt sich folgende Schlussfolgerung ziehen: Die Cyanobakterien-Spezies *Synechococcus sp. PCC 7002* ist biokompatibel und besitzt die notwendigen Eigenschaften zur Anwendung am Menschen. Die Sauerstoffproduktion durch Photosynthese ist ausreichend zur Förderung der Vitalität dermalen Zellen unter Hypoxie. Die mittels Transformation integrierte HA-Synthase *PmHAS* produziert und sezerniert Hyaluronsäure mit einem deutlichen Effekt auf die lymphatische Gen- und Proteinexpression. Die freigesetzten HA-Moleküle induzieren eine gesteigerte Proliferation, Zellvitalität und Lymphangiogenese mit entsprechenden morphologischen Veränderungen der LECs. Die Cyanobakterien eignen sich zur Bioaktivierung von Hautersatzmaterialien mit erhaltener Funktionsfähigkeit zur Sauerstoffproduktion und Stimulation der Lymphgefäßbildung.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für weitere *in vivo* Studien und eine mögliche therapeutische Alternative zur Behandlung chronischer Wunden. Dabei könnte das Scaffold, wie in der schematischen Abbildung 24, mit einer Einzelknopfnahse fixiert werden, sodass der freigesetzte Sauerstoff und die Hyaluronsäure als regenerative Faktoren ihre

Wirkung auf das hypoxische Wundbett entfalten können. Die Silikonschicht könnte bis zur vollständigen Regeneration funktionell die Epidermis ersetzen und eine ausreichende Lichtdurchlässigkeit zur Induktion der Photosynthese ermöglichen.



**Abbildung 24: Schematische Darstellung der *in vivo* Applikation des SynHA(+)-Scaffolds**

Dermale Anwendung eines mit *Synechococcus sp. PCC 7002* besiedelten Scaffolds zur Verbesserung der Lymphangiogenese und Hypoxie im Wundgebiet. Fixierung mittels Einzelknopfnah und kontinuierliche Lichtexposition zur Induktion der Lymphangiogenese.

## 7 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.

Publikation in Fachzeitschriften:

Chávez MN\*, **Fuchs B\***, Moellhoff N\*, Hofmann D, Zhang L, Selão TT, Giunta RE, Egaña JT, Nickelsen J, Schenck TL., Use of photosynthetic transgenic cyanobacteria to promote lymphangiogenesis in scaffolds for dermal regeneration, *Acta Biomater.* 2021 May; 126:132-143. doi: 10.1016/j.actbio.2021.03.033. Epub 2021 Mar 20. PMID: 33753313.

**Fuchs B**, Mert S, Kuhlmann C, Taha S, Birt A, Nickelsen J, Schenck TL, Giunta RE, Wiggerhauser PS, Moellhoff N., Biocompatibility of *Synechococcus* sp. PCC 7002 with Human Dermal Cells In Vitro, *International Journal of Molecular Sciences.* 2024; 25(7):3922. <https://doi.org/10.3390/ijms25073922>.

(\*) Shared first authorship

## Literaturverzeichnis

- [1] M. N. Chávez *et al.*, "Use of photosynthetic transgenic cyanobacteria to promote lymphangiogenesis in scaffolds for dermal regeneration," (in eng), *Acta Biomater*, Mar 20 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.03.033.
- [2] T. A. Mustoe, K. O'Shaughnessy, and O. Kloeters, "Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis," (in eng), *Plast Reconstr Surg*, vol. 117, no. 7 Suppl, pp. 35s-41s, Jun 2006, doi: 10.1097/01.prs.0000225431.63010.1b.
- [3] G. S. Lazarus *et al.*, "Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing," (in eng), *Arch Dermatol*, vol. 130, no. 4, pp. 489-93, Apr 1994.
- [4] L. Martinengo *et al.*, "Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies," (in eng), *Ann Epidemiol*, vol. 29, pp. 8-15, Jan 2019, doi: 10.1016/j.annepidem.2018.10.005.
- [5] M. Augustin and R. Sommer, "Gesundheitsökonomie und patienten-zentrierte Versorgung chronischer Wunden in Deutschland," in *Chronische Wunden*, J. Dissemond and K. Kröger Eds. Elsevier, 2019, ch. 48, pp. 419-428.
- [6] F. Gottrup, "A specialized wound-healing center concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds," (in eng), *Am J Surg*, vol. 187, no. 5a, pp. 38s-43s, May 2004, doi: 10.1016/s0002-9610(03)00303-9.
- [7] "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015," (in eng), *Lancet*, vol. 388, no. 10053, pp. 1545-1602, Oct 8 2016, doi: 10.1016/s0140-6736(16)31678-6.
- [8] K. Heyer, K. Herberger, K. Protz, G. Glaeske, and M. Augustin, "Epidemiology of chronic wounds in Germany: Analysis of statutory health insurance data," (in eng), *Wound Repair Regen*, vol. 24, no. 2, pp. 434-42, Mar 2016, doi: 10.1111/wrr.12387.
- [9] L. Gould *et al.*, "Chronic wound repair and healing in older adults: current status and future research," (in eng), *Wound Repair Regen*, vol. 23, no. 1, pp. 1-13, Jan-Feb 2015, doi: 10.1111/wrr.12245.
- [10] C. K. Sen *et al.*, "Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy," (in eng), *Wound Repair Regen*, vol. 17, no. 6, pp. 763-71, Nov-Dec 2009, doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x.
- [11] R. J. Hay *et al.*, "The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions," (in eng), *J Invest Dermatol*, vol. 134, no. 6, pp. 1527-1534, Jun 2014, doi: 10.1038/jid.2013.446.
- [12] C. Karimkhani *et al.*, "Global Skin Disease Morbidity and Mortality: An Update From the Global Burden of Disease Study 2013," (in eng), *JAMA Dermatol*, vol. 153, no. 5, pp. 406-412, May 1 2017, doi: 10.1001/jamadermatol.2016.5538.
- [13] A. J. Singer and R. A. Clark, "Cutaneous wound healing," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 341, no. 10, pp. 738-46, Sep 2 1999, doi: 10.1056/nejm199909023411006.
- [14] M. Olsson *et al.*, "The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review," (in eng), *Wound Repair Regen*, vol. 27, no. 1, pp. 114-125, Jan 2019, doi: 10.1111/wrr.12683.
- [15] D. Paquette and V. Falanga, "Leg ulcers," (in eng), *Clin Geriatr Med*, vol. 18, no. 1, pp. 77-88, vi, Feb 2002, doi: 10.1016/s0749-0690(03)00035-1.

- [16] F. Gottrup, P. Holstein, B. Jørgensen, M. Lohmann, and T. Karlsmar, "A new concept of a multidisciplinary wound healing center and a national expert function of wound healing," (in eng), *Arch Surg*, vol. 136, no. 7, pp. 765-72, Jul 2001, doi: 10.1001/archsurg.136.7.765.
- [17] G. I. A. Inc. "Global Advanced Wound Care Products Market: A Global Strategic Business Report." <https://www.strategyr.com/market-report-advanced-wound-care-forecasts-global-industry-analysts-inc.asp> (accessed 06.02.2021).
- [18] J. F. Guest *et al.*, "Health economic burden that different wound types impose on the UK's National Health Service," (in eng), *Int Wound J*, vol. 14, no. 2, pp. 322-330, Apr 2017, doi: 10.1111/iwj.12603.
- [19] S. Schreml, R. M. Szeimies, L. Prantl, S. Karrer, M. Landthaler, and P. Babilas, "Oxygen in acute and chronic wound healing," (in eng), *Br J Dermatol*, vol. 163, no. 2, pp. 257-68, Aug 2010, doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09804.x.
- [20] M. Peschen, T. Lahaye, B. Hennig, A. Weyl, J. C. Simon, and W. Vanscheidt, "Expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, LFA-1 and VLA-4 in the skin is modulated in progressing stages of chronic venous insufficiency," (in eng), *Acta Derm Venereol*, vol. 79, no. 1, pp. 27-32, Jan 1999, doi: 10.1080/000155599750011651.
- [21] R. Vanwijck, "[Surgical biology of wound healing]," (in fre), *Bull Mem Acad R Med Belg*, vol. 156, no. 3-4, pp. 175-84; discussion 185, 2001. Biologie chirurgicale de la cicatrisation.
- [22] P. J. Sheffield, "Measuring tissue oxygen tension: a review," (in eng), *Undersea Hyperb Med*, vol. 25, no. 3, pp. 179-88, Fall 1998.
- [23] H. W. Hopf *et al.*, "Wound tissue oxygen tension predicts the risk of wound infection in surgical patients," (in eng), *Arch Surg*, vol. 132, no. 9, pp. 997-1004; discussion 1005, Sep 1997, doi: 10.1001/archsurg.1997.01430330063010.
- [24] T. Mustoe, "Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy," (in eng), *Am J Surg*, vol. 187, no. 5a, pp. 65s-70s, May 2004, doi: 10.1016/s0002-9610(03)00306-4.
- [25] D. R. Knighton, B. Halliday, and T. K. Hunt, "Oxygen as an antibiotic. A comparison of the effects of inspired oxygen concentration and antibiotic administration on in vivo bacterial clearance," (in eng), *Arch Surg*, vol. 121, no. 2, pp. 191-5, Feb 1986, doi: 10.1001/archsurg.1986.01400020077009.
- [26] D. R. Knighton, B. Halliday, and T. K. Hunt, "Oxygen as an antibiotic. The effect of inspired oxygen on infection," (in eng), *Arch Surg*, vol. 119, no. 2, pp. 199-204, Feb 1984, doi: 10.1001/archsurg.1984.01390140057010.
- [27] D. C. Hohn, R. D. MacKay, B. Halliday, and T. K. Hunt, "Effect of O<sub>2</sub> tension on microbicidal function of leukocytes in wounds and in vitro," (in eng), *Surg Forum*, vol. 27, no. 62, pp. 18-20, 1976.
- [28] K. Jönsson, T. K. Hunt, and S. J. Mathes, "Oxygen as an isolated variable influences resistance to infection," (in eng), *Ann Surg*, vol. 208, no. 6, pp. 783-7, Dec 1988, doi: 10.1097/00000658-198812000-00018.
- [29] R. Zhao, H. Liang, E. Clarke, C. Jackson, and M. Xue, "Inflammation in Chronic Wounds," (in eng), *International journal of molecular sciences*, vol. 17, no. 12, p. 2085, 2016, doi: 10.3390/ijms17122085.
- [30] T. K. Hunt, J. Niinikoski, and B. Zederfeldt, "Role of oxygen in repair processes," (in eng), *Acta Chir Scand*, vol. 138, no. 2, pp. 109-10, 1972.
- [31] L. Wu, Y. P. Xia, S. I. Roth, E. Gruskin, and T. A. Mustoe, "Transforming growth factor-beta1 fails to stimulate wound healing and impairs its signal transduction in an aged ischemic ulcer

- model: importance of oxygen and age," (in eng), *The American journal of pathology*, vol. 154, no. 1, pp. 301-309, 1999, doi: 10.1016/s0002-9440(10)65276-5.
- [32] A. Siddiqui, R. D. Galiano, D. Connors, E. Gruskin, L. Wu, and T. A. Mustoe, "Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts: acute versus chronic hypoxia," (in eng), *Wound Repair Regen*, vol. 4, no. 2, pp. 211-8, Apr-Jun 1996, doi: 10.1046/j.1524-475X.1996.40207.x.
- [33] V. Falanga, H. Takagi, P. I. Ceballos, and J. B. Pardes, "Low oxygen tension decreases receptor binding of peptide growth factors in dermal fibroblast cultures," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 213, no. 1, pp. 80-4, Jul 1994, doi: 10.1006/excr.1994.1175.
- [34] L. H. Toledo-Pereyra, F. Lopez-Neblina, and A. H. Toledo, "Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion," (in eng), *Ann Transplant*, vol. 9, no. 1, pp. 81-3, 2004.
- [35] R. C. Schugart, A. Friedman, R. Zhao, and C. K. Sen, "Wound angiogenesis as a function of tissue oxygen tension: a mathematical model," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 7, pp. 2628-33, Feb 19 2008, doi: 10.1073/pnas.0711642105.
- [36] A. Soneja, M. Drews, and T. Malinski, "Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing," (in eng), *Pharmacol Rep*, vol. 57 Suppl, pp. 108-19, 2005.
- [37] L. Connelly, M. Palacios-Callender, C. Ameixa, S. Moncada, and A. J. Hobbs, "Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide," (in eng), *J Immunol*, vol. 166, no. 6, pp. 3873-81, Mar 15 2001, doi: 10.4049/jimmunol.166.6.3873.
- [38] R. Lobmann, A. Ambrosch, G. Schultz, K. Waldmann, S. Schiweck, and H. Lehnert, "Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients," (in eng), *Diabetologia*, vol. 45, no. 7, pp. 1011-6, Jul 2002, doi: 10.1007/s00125-002-0868-8.
- [39] B. C. Nwomeh, H. X. Liang, R. F. Diegelmann, I. K. Cohen, and D. R. Yager, "Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds," (in eng), *Wound Repair Regen*, vol. 6, no. 2, pp. 127-34, Mar-Apr 1998, doi: 10.1046/j.1524-475x.1998.60206.x.
- [40] A. B. Wysocki, L. Staiano-Coico, and F. Grinnell, "Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9," (in eng), *J Invest Dermatol*, vol. 101, no. 1, pp. 64-8, Jul 1993, doi: 10.1111/1523-1747.ep12359590.
- [41] D. R. Yager, L. Y. Zhang, H. X. Liang, R. F. Diegelmann, and I. K. Cohen, "Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids," (in eng), *J Invest Dermatol*, vol. 107, no. 5, pp. 743-8, Nov 1996, doi: 10.1111/1523-1747.ep12365637.
- [42] E. C. Bullen *et al.*, "Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds," (in eng), *J Invest Dermatol*, vol. 104, no. 2, pp. 236-40, Feb 1995, doi: 10.1111/1523-1747.ep12612786.
- [43] R. F. Diegelmann, "Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers," (in eng), *Wound Repair Regen*, vol. 11, no. 6, pp. 490-5, Nov-Dec 2003, doi: 10.1046/j.1524-475x.2003.11617.x.
- [44] T. Tammela and K. Alitalo, "Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise," (in eng), *Cell*, vol. 140, no. 4, pp. 460-76, Feb 19 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.01.045.
- [45] J. Westermann, "Organe des Immunsystemes," in *Anatomie*, K. Zilles and N. B. Tillmann Eds. Springer-Medizin-Verlag Heidelberg, 2010, ch. 7.3, pp. 361-372.

- [46] M. Földi and R. H. K. Strößenreuther, *Foundations of Manual Lymph Drainage*, 3rd ed. Elsevier, 2004, p. 120.
- [47] J. R. Levick and C. C. Michel, "Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle," *Cardiovascular Research*, vol. 87, no. 2, pp. 198-210, 2010, doi: 10.1093/cvr/cvq062.
- [48] X. Jiang, M. R. Nicolls, W. Tian, and S. G. Rockson, "Lymphatic Dysfunction, Leukotrienes, and Lymphedema," (in eng), *Annu Rev Physiol*, vol. 80, pp. 49-70, Feb 10 2018, doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034008.
- [49] F. S. Frueh, N. Sanchez-Macedo, M. Calcagni, P. Giovanoli, and N. Lindenblatt, "The Crucial Role of Vascularization and Lymphangiogenesis in Skin Reconstruction," (in eng), *Eur Surg Res*, vol. 59, no. 3-4, pp. 242-254, 2018, doi: 10.1159/000492413.
- [50] W. Lawrance, S. Banerji, A. J. Day, S. Bhattacharjee, and D. G. Jackson, "Binding of Hyaluronan to the Native Lymphatic Vessel Endothelial Receptor LYVE-1 Is Critically Dependent on Receptor Clustering and Hyaluronan Organization\*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 291, no. 15, pp. 8014-8030, 2016/04/08/ 2016, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708305>.
- [51] A. Saaristo *et al.*, "Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 169, no. 3, pp. 1080-7, Sep 2006, doi: 10.2353/ajpath.2006.051251.
- [52] H. J. Degreef, "How to heal a wound fast," (in eng), *Dermatol Clin*, vol. 16, no. 2, pp. 365-75, Apr 1998, doi: 10.1016/s0733-8635(05)70019-x.
- [53] D. Marino, J. Luginbühl, S. Scola, M. Meuli, and E. Reichmann, "Bioengineering dermo-epidermal skin grafts with blood and lymphatic capillaries," (in eng), *Sci Transl Med*, vol. 6, no. 221, p. 221ra14, Jan 29 2014, doi: 10.1126/scitranslmed.3006894.
- [54] S. Schwager and M. Detmar, "Inflammation and Lymphatic Function," (in eng), *Front Immunol*, vol. 10, p. 308, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00308.
- [55] L. Alderfer, A. Wei, and D. Hanjaya-Putra, "Lymphatic Tissue Engineering and Regeneration," (in eng), *J Biol Eng*, vol. 12, p. 32, 2018, doi: 10.1186/s13036-018-0122-7.
- [56] W. L. Olszewski, P. Jain, M. Zaleska, E. Stelmach, and E. Swoboda, "Chronic lower limb wounds evoke systemic response of the lymphatic (immune) system," (in eng), *Indian J Plast Surg*, vol. 45, no. 2, pp. 255-60, May 2012, doi: 10.4103/0970-0358.101289.
- [57] E. Huethorst *et al.*, "Lymphatic Vascular Regeneration: The Next Step in Tissue Engineering," (in eng), *Tissue Eng Part B Rev*, vol. 22, no. 1, pp. 1-14, Feb 2016, doi: 10.1089/ten.TEB.2015.0231.
- [58] D. G. Jackson, "Hyaluronan in the lymphatics: The key role of the hyaluronan receptor LYVE-1 in leucocyte trafficking," (in eng), *Matrix Biol*, vol. 78-79, pp. 219-235, May 2019, doi: 10.1016/j.matbio.2018.02.001.
- [59] K. Alitalo, T. Tammela, and T. V. Petrova, "Lymphangiogenesis in development and human disease," (in eng), *Nature*, vol. 438, no. 7070, pp. 946-53, Dec 15 2005, doi: 10.1038/nature04480.
- [60] M. Wu *et al.*, "Low molecular weight hyaluronan induces lymphangiogenesis through LYVE-1-mediated signaling pathways," (in eng), *PloS one*, vol. 9, no. 3, pp. e92857-e92857, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0092857.
- [61] M. G. Achen, B. K. McColl, and S. A. Stacker, "Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis," (in eng), *Cancer Cell*, vol. 7, no. 2, pp. 121-7, Feb 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.01.017.
- [62] L. N. Cueni and M. Detmar, "The lymphatic system in health and disease," (in eng), *Lymphatic research and biology*, vol. 6, no. 3-4, pp. 109-122, 2008, doi: 10.1089/lrb.2008.1008.

- [63] P. Saharinen, T. Tammela, M. J. Karkkainen, and K. Alitalo, "Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation," (in eng), *Trends Immunol*, vol. 25, no. 7, pp. 387-95, Jul 2004, doi: 10.1016/j.it.2004.05.003.
- [64] M. J. Karkkainen *et al.*, "Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 5, no. 1, pp. 74-80, Jan 2004, doi: 10.1038/ni1013.
- [65] G. Oliver, "Lymphatic vasculature development," (in eng), *Nat Rev Immunol*, vol. 4, no. 1, pp. 35-45, Jan 2004, doi: 10.1038/nri1258.
- [66] R. S. Srinivasan *et al.*, "Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature," (in eng), *Genes Dev*, vol. 21, no. 19, pp. 2422-32, Oct 1 2007, doi: 10.1101/gad.1588407.
- [67] T. Karpanen and K. Alitalo, "Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis," (in eng), *Annu Rev Pathol*, vol. 3, pp. 367-97, 2008, doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151515.
- [68] G. Jurisic and M. Detmar, "Lymphatic endothelium in health and disease," (in eng), *Cell Tissue Res*, vol. 335, no. 1, pp. 97-108, Jan 2009, doi: 10.1007/s00441-008-0644-2.
- [69] H. Maby-El Hajjami and T. V. Petrova, "Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease," (in eng), *Histochem Cell Biol*, vol. 130, no. 6, pp. 1063-78, Dec 2008, doi: 10.1007/s00418-008-0525-5.
- [70] M. François *et al.*, "Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice," (in eng), *Nature*, vol. 456, no. 7222, pp. 643-7, Dec 4 2008, doi: 10.1038/nature07391.
- [71] J. T. Wigle and G. Oliver, "Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system," (in eng), *Cell*, vol. 98, no. 6, pp. 769-78, Sep 17 1999, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81511-1.
- [72] T. Mäkinen *et al.*, "PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature," (in eng), *Genes Dev*, vol. 19, no. 3, pp. 397-410, Feb 1 2005, doi: 10.1101/gad.330105.
- [73] S. Breiteneder-Geleff *et al.*, "Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 154, no. 2, pp. 385-94, Feb 1999, doi: 10.1016/s0002-9440(10)65285-6.
- [74] V. Schacht *et al.*, "T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema," (in eng), *Embo j*, vol. 22, no. 14, pp. 3546-56, Jul 15 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg342.
- [75] K. Suzuki-Inoue *et al.*, "A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2," (in eng), *Blood*, vol. 107, no. 2, pp. 542-9, Jan 15 2006, doi: 10.1182/blood-2005-05-1994.
- [76] F. Abtahian *et al.*, "Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk," (in eng), *Science*, vol. 299, no. 5604, pp. 247-51, Jan 10 2003, doi: 10.1126/science.1079477.
- [77] L. Juhlin, "Hyaluronan in skin," (in eng), *J Intern Med*, vol. 242, no. 1, pp. 61-6, Jul 1997, doi: 10.1046/j.1365-2796.1997.00175.x.
- [78] S. E. Armstrong and D. R. Bell, "Relationship between lymph and tissue hyaluronan in skin and skeletal muscle," (in eng), *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 283, no. 6, pp. H2485-94, Dec 2002, doi: 10.1152/ajpheart.00385.2002.

- [79] B. Weissmann, K. Meyer, P. Sampson, and A. Linker, "Isolation of oligosaccharides enzymatically produced from hyaluronic acid," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 208, no. 1, pp. 417-29, May 1954.
- [80] B. Weissmann and K. Meyer, "The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord<sup>1,2</sup>," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 76, no. 7, pp. 1753-1757, 1954/04/01 1954, doi: 10.1021/ja01636a010.
- [81] W. Hayen, M. Goebeler, S. Kumar, R. Riessen, and V. Nehls, "Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture," (in eng), *J Cell Sci*, vol. 112 ( Pt 13), pp. 2241-51, Jul 1999.
- [82] N. Liu, F. Gao, Z. Han, X. Xu, C. B. Underhill, and L. Zhang, "Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells," (in eng), *Cancer Res*, vol. 61, no. 13, pp. 5207-14, Jul 1 2001.
- [83] L. X. Guo, K. Zou, J. H. Ju, and H. Xie, "Hyaluronan promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth in xenografts," (in eng), *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, vol. 37, no. 9, pp. 601-6, Sep 2005, doi: 10.1111/j.1745-7270.2005.00083.x.
- [84] L. Zhang, C. B. Underhill, and L. Chen, "Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior," (in eng), *Cancer Res*, vol. 55, no. 2, pp. 428-33, Jan 15 1995.
- [85] B. P. Toole, "Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue," (in eng), *Nat Rev Cancer*, vol. 4, no. 7, pp. 528-39, Jul 2004, doi: 10.1038/nrc1391.
- [86] E. Papakonstantinou, M. Roth, and G. Karakiulakis, "Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging," (in eng), *Dermato-endocrinology*, vol. 4, no. 3, pp. 253-258, 2012, doi: 10.4161/derm.21923.
- [87] M. Slevin, S. Kumar, and J. Gaffney, "Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 277, no. 43, pp. 41046-59, Oct 25 2002, doi: 10.1074/jbc.M109443200.
- [88] M. Slevin *et al.*, "Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways," (in eng), *Matrix Biol*, vol. 26, no. 1, pp. 58-68, Jan 2007, doi: 10.1016/j.matbio.2006.08.261.
- [89] C. M. McKee *et al.*, "Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 98, no. 10, pp. 2403-13, Nov 15 1996, doi: 10.1172/jci119054.
- [90] M. R. Horton *et al.*, "Hyaluronan fragments synergize with interferon-gamma to induce the C-X-C chemokines mig and interferon-inducible protein-10 in mouse macrophages," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 273, no. 52, pp. 35088-94, Dec 25 1998, doi: 10.1074/jbc.273.52.35088.
- [91] P. Teriete *et al.*, "Structure of the regulatory hyaluronan binding domain in the inflammatory leukocyte homing receptor CD44," (in eng), *Mol Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 483-96, Feb 27 2004, doi: 10.1016/s1097-2765(04)00080-2.
- [92] L. Li, C. H. Heldin, and P. Heldin, "Inhibition of platelet-derived growth factor-BB-induced receptor activation and fibroblast migration by hyaluronan activation of CD44," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 281, no. 36, pp. 26512-9, Sep 8 2006, doi: 10.1074/jbc.M605607200.
- [93] E. A. Turley, "The role of a cell-associated hyaluronan-binding protein in fibroblast behaviour," (in eng), *Ciba Found Symp*, vol. 143, pp. 121-33; discussion 133-7, 281-5, 1989, doi: 10.1002/9780470513774.ch8.
- [94] P. Prehm, "Hyaluronate is synthesized at plasma membranes," (in eng), *The Biochemical journal*, vol. 220, no. 2, pp. 597-600, 1984, doi: 10.1042/bj2200597.

- [95] P. Prehm, "Release of hyaluronate from eukaryotic cells," (in eng), *Biochem J*, vol. 267, no. 1, pp. 185-9, Apr 1 1990, doi: 10.1042/bj2670185.
- [96] J. R. Fraser, T. C. Laurent, H. Pertoft, and E. Baxter, "Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit," (in eng), *Biochem J*, vol. 200, no. 2, pp. 415-24, Nov 15 1981, doi: 10.1042/bj2000415.
- [97] R. K. Reed, U. B. Laurent, J. R. Fraser, and T. C. Laurent, "Removal rate of [3H]hyaluronan injected subcutaneously in rabbits," (in eng), *Am J Physiol*, vol. 259, no. 2 Pt 2, pp. H532-5, Aug 1990, doi: 10.1152/ajpheart.1990.259.2.H532.
- [98] U. B. Laurent, L. B. Dahl, and R. K. Reed, "Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver," (in eng), *Exp Physiol*, vol. 76, no. 5, pp. 695-703, Sep 1991, doi: 10.1113/expphysiol.1991.sp003536.
- [99] B. P. Toole, "Hyaluronan promotes the malignant phenotype," *Glycobiology*, vol. 12, no. 3, pp. 37R-42R, 2002, doi: 10.1093/glycob/12.3.37R.
- [100] D. C. West, I. N. Hampson, F. Arnold, and S. Kumar, "Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid," (in eng), *Science*, vol. 228, no. 4705, pp. 1324-6, Jun 14 1985, doi: 10.1126/science.2408340.
- [101] C. C. Termeer *et al.*, "Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 165, no. 4, pp. 1863-70, Aug 15 2000, doi: 10.4049/jimmunol.165.4.1863.
- [102] R. Stern, A. A. Asari, and K. N. Sugahara, "Hyaluronan fragments: an information-rich system," (in eng), *Eur J Cell Biol*, vol. 85, no. 8, pp. 699-715, Aug 2006, doi: 10.1016/j.ejcb.2006.05.009.
- [103] C. Yang *et al.*, "The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 287, no. 51, pp. 43094-107, Dec 14 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.349209.
- [104] D. Jiang, J. Liang, and P. W. Noble, "Hyaluronan in tissue injury and repair," (in eng), *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 23, pp. 435-61, 2007, doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337.
- [105] M. Fronza *et al.*, "Hyaluronidase modulates inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing," (in eng), *PLoS One*, vol. 9, no. 11, p. e112297, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0112297.
- [106] M. E. Monzón, D. Manzanares, N. Schmid, S. M. Casalino-Matsuda, and R. M. Forteza, "Hyaluronidase expression and activity is regulated by pro-inflammatory cytokines in human airway epithelial cells," (in eng), *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 39, no. 3, pp. 289-95, Sep 2008, doi: 10.1165/rcmb.2007-03610C.
- [107] S. Banerji *et al.*, "LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 144, no. 4, pp. 789-801, Feb 22 1999, doi: 10.1083/jcb.144.4.789.
- [108] D. G. Jackson, R. Prevo, S. Clasper, and S. Banerji, "LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis," (in eng), *Trends Immunol*, vol. 22, no. 6, pp. 317-21, Jun 2001, doi: 10.1016/s1471-4906(01)01936-6.
- [109] R. Prevo, S. Banerji, D. J. P. Ferguson, S. Clasper, and D. G. Jackson, "Mouse LYVE-1 Is an Endocytic Receptor for Hyaluronan in Lymphatic Endothelium\*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 22, pp. 19420-19430, 2001/06/01/ 2001, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M011004200>.
- [110] T. A. Stanly *et al.*, "The cortical actin network regulates avidity-dependent binding of hyaluronan by the lymphatic vessel endothelial receptor LYVE-1," *Journal of Biological*

- Chemistry*, vol. 295, no. 15, pp. 5036-5050, 2020/04/10/ 2020, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011992>.
- [111] D. G. Jackson, "Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics," (in eng), *Immunol Rev*, vol. 230, no. 1, pp. 216-31, Jul 2009, doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00803.x.
- [112] S. Banerji *et al.*, "Homodimerization of the Lymph Vessel Endothelial Receptor LYVE-1 through a Redox-labile Disulfide Is Critical for Hyaluronan Binding in Lymphatic Endothelium\*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 291, no. 48, pp. 25004-25018, 2016/11/25/ 2016, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736926>.
- [113] S. Banerji, B. R. S. Hide, J. R. James, M. E. M. Noble, and D. G. Jackson, "Distinctive Properties of the Hyaluronan-binding Domain in the Lymphatic Endothelial Receptor Lyve-1 and Their Implications for Receptor Function\*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 14, pp. 10724-10735, 2010/04/02/ 2010, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.047647>.
- [114] D. Vigetti, M. Viola, E. Karousou, G. De Luca, and A. Passi, "Metabolic control of hyaluronan synthases," *Matrix Biology*, vol. 35, pp. 8-13, 2014/04/01/ 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.002>.
- [115] L. A. Johnson *et al.*, "Dendritic cells enter lymph vessels by hyaluronan-mediated docking to the endothelial receptor LYVE-1," *Nature Immunology*, vol. 18, no. 7, pp. 762-770, 2017/07/01 2017, doi: 10.1038/ni.3750.
- [116] R. G. Frykberg and J. Banks, "Challenges in the Treatment of Chronic Wounds," (in eng), *Advances in wound care*, vol. 4, no. 9, pp. 560-582, 2015, doi: 10.1089/wound.2015.0635.
- [117] I. Roeckl-Wiedmann, M. Bennett, and P. Kranke, "Systematic review of hyperbaric oxygen in the management of chronic wounds," (in eng), *Br J Surg*, vol. 92, no. 1, pp. 24-32, Jan 2005, doi: 10.1002/bjs.4863.
- [118] C. E. Fife and H. Hopf, "Discussion. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy," (in eng), *Plast Reconstr Surg*, vol. 127 Suppl 1, pp. 142s-143s, Jan 2011, doi: 10.1097/PRS.0b013e3181fb5443.
- [119] C. E. Fife, C. Buyukcakil, G. Otto, P. Sheffield, T. Love, and R. Warriner, 3rd, "Factors influencing the outcome of lower-extremity diabetic ulcers treated with hyperbaric oxygen therapy," (in eng), *Wound Repair Regen*, vol. 15, no. 3, pp. 322-31, May-Jun 2007, doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00234.x.
- [120] M. Löndahl, "Hyperbaric oxygen therapy as adjunctive treatment for diabetic foot ulcers," (in eng), *Int J Low Extrem Wounds*, vol. 12, no. 2, pp. 152-7, Jun 2013, doi: 10.1177/1534734613486154.
- [121] S. M. Andrade and I. C. Santos, "Hyperbaric oxygen therapy for wound care," (in eng. ), *Rev Gaucha Enferm*, vol. 37, no. 2, p. e59257, Jun 2016, doi: 10.1590/1983-1447.2016.02.59257. Oxigenoterapia hiperbárica para tratamento de feridas.
- [122] X. Huang *et al.*, "Hyperbaric oxygen potentiates diabetic wound healing by promoting fibroblast cell proliferation and endothelial cell angiogenesis," (in eng), *Life Sci*, vol. 259, p. 118246, Oct 15 2020, doi: 10.1016/j.lfs.2020.118246.
- [123] M. C. Robson *et al.*, "Randomized trial of topically applied repifermin (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers," (in eng), *Wound Repair Regen*, vol. 9, no. 5, pp. 347-52, Sep-Oct 2001, doi: 10.1046/j.1524-475x.2001.00347.x.
- [124] J.-O. Baur, A. Rahmanian-Schwarz, M. Held, J. Schiefer, A. Daigeler, and W. Eisler, "Evaluation of a cross-linked versus non-cross-linked collagen matrix in full-thickness skin defects," *Burns*,

- vol. 47, no. 1, pp. 150-156, 2021/02/01/ 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2020.03.018>.
- [125] A. Rahmani Del Bakhshayesh *et al.*, "Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering," (in eng), *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 46, no. 4, pp. 691-705, Jun 2018, doi: 10.1080/21691401.2017.1349778.
- [126] T. T. Nyame, H. A. Chiang, T. Leavitt, M. Ozambela, and D. P. Orgill, "Tissue-Engineered Skin Substitutes," (in eng), *Plast Reconstr Surg*, vol. 136, no. 6, pp. 1379-1388, Dec 2015, doi: 10.1097/prs.0000000000001748.
- [127] T. A. Ahmed, E. V. Dare, and M. Hincke, "Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications," (in eng), *Tissue Eng Part B Rev*, vol. 14, no. 2, pp. 199-215, Jun 2008, doi: 10.1089/ten.teb.2007.0435.
- [128] D. M. Heimbach *et al.*, "Multicenter Postapproval Clinical Trial of Integra® Dermal Regeneration Template for Burn Treatment," *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*, vol. 24, no. 1, pp. 42-48, 2003, doi: 10.1097/00004630-200301000-00009.
- [129] D. K. Chang, M. R. Louis, A. Gimenez, and E. M. Reece, "The Basics of Integra Dermal Regeneration Template and its Expanding Clinical Applications," (in eng), *Seminars in plastic surgery*, vol. 33, no. 3, pp. 185-189, 2019, doi: 10.1055/s-0039-1693401.
- [130] A. K. Wong, B. H. Schonmeyer, P. Singh, D. L. Carlson, S. Li, and B. J. Mehrara, "Histologic analysis of angiogenesis and lymphangiogenesis in acellular human dermis," (in eng), *Plast Reconstr Surg*, vol. 121, no. 4, pp. 1144-1152, Apr 2008, doi: 10.1097/01.prs.0000302505.43942.07.
- [131] E. Güç *et al.*, "Local induction of lymphangiogenesis with engineered fibrin-binding VEGF-C promotes wound healing by increasing immune cell trafficking and matrix remodeling," (in eng), *Biomaterials*, vol. 131, pp. 160-175, Jul 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.033.
- [132] K. Maruyama, J. Asai, M. Ii, T. Thorne, D. W. Losordo, and P. A. D'Amore, "Decreased Macrophage Number and Activation Lead to Reduced Lymphatic Vessel Formation and Contribute to Impaired Diabetic Wound Healing," *The American Journal of Pathology*, vol. 170, no. 4, pp. 1178-1191, 2007/04/01/ 2007, doi: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060018>.
- [133] R. a. Markets. "Hyaluronic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report by Application (Dermal Fillers, Osteoarthritis (Single Injection, Three Injection, Five Injection), Ophthalmic, Vesicoureteral Reflux), by Region, and Segment Forecasts, 2020 - 2027." <https://www.researchandmarkets.com/reports/3450702/hyaluronic-acid-market-size-share-and-trends#pos-0> (accessed).
- [134] M. A. Selyanin, P. Y. Boykov, V. N. Khabarov, and F. Polyak, "Methods of Hyaluronic Acid Production," in *Hyaluronic Acid*, 2015, pp. 77-95.
- [135] J. D. d. Oliveira, L. S. Carvalho, A. Gomes, L. c. R. Queiroz, B. Magalhães, and N. d. S. Parachin, "Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms," *Microbial Cell Factories*, vol. 15, 2016.
- [136] L. Liu, Y. Liu, J. Li, G. Du, and J. Chen, "Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives," (in eng), *Microb Cell Fact*, vol. 10, p. 99, Nov 16 2011, doi: 10.1186/1475-2859-10-99.
- [137] H. Yu and G. Stephanopoulos, "Metabolic engineering of Escherichia coli for biosynthesis of hyaluronic acid," (in eng), *Metab Eng*, vol. 10, no. 1, pp. 24-32, Jan 2008, doi: 10.1016/j.ymben.2007.09.001.

- [138] Z. Mao, H. D. Shin, and R. Chen, "A recombinant E. coli bioprocess for hyaluronan synthesis," (in eng), *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 84, no. 1, pp. 63-9, Aug 2009, doi: 10.1007/s00253-009-1963-2.
- [139] Y. Jia *et al.*, "Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights," (in eng), *Bioresour Technol*, vol. 132, pp. 427-31, Mar 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.150.
- [140] P. Jin, Z. Kang, P. Yuan, G. Du, and J. Chen, "Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168," (in eng), *Metab Eng*, vol. 35, pp. 21-30, May 2016, doi: 10.1016/j.ymben.2016.01.008.
- [141] B. Widner *et al.*, "Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*," (in eng), *Appl Environ Microbiol*, vol. 71, no. 7, pp. 3747-52, Jul 2005, doi: 10.1128/aem.71.7.3747-3752.2005.
- [142] G. Agarwal, K. K. V, S. B. Prasad, A. Bhaduri, and G. Jayaraman, "Biosynthesis of Hyaluronic acid polymer: Dissecting the role of sub structural elements of hyaluronan synthase," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 12510, 2019/08/29 2019, doi: 10.1038/s41598-019-48878-8.
- [143] L. Zhang, T. T. Selão, P. J. Nixon, and B. Norling, "Photosynthetic conversion of CO<sub>2</sub> to hyaluronic acid by engineered cyanobacteria," *bioRxiv*, p. 691543, 2019, doi: 10.1101/691543.
- [144] C. Zhao, Z. Li, T. Li, Y. Zhang, D. A. Bryant, and J. Zhao, "High-yield production of extracellular type-I cellulose by the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002," (in eng), *Cell Discov*, vol. 1, p. 15004, 2015, doi: 10.1038/celldisc.2015.4.
- [145] T. Ogawa, M. Misumi, and K. Sonoike, "Estimation of photosynthesis in cyanobacteria by pulse-amplitude modulation chlorophyll fluorescence: problems and solutions," (in eng), *Photosynth Res*, vol. 133, no. 1-3, pp. 63-73, Sep 2017, doi: 10.1007/s11120-017-0367-x.
- [146] R. M. Soo, J. Hemp, and P. Hugenholtz, "Evolution of photosynthesis and aerobic respiration in the cyanobacteria," (in eng), *Free Radic Biol Med*, vol. 140, pp. 200-205, Aug 20 2019, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.029.
- [147] J. Morone, G. Lopes, M. Preto, V. Vasconcelos, and R. Martins, "Exploitation of Filamentous and Picoplanktonic Cyanobacteria for Cosmetic Applications: Potential to Improve Skin Structure and Preserve Dermal Matrix Components," (in eng), *Mar Drugs*, vol. 18, no. 9, Sep 22 2020, doi: 10.3390/md18090486.
- [148] A. Sarnaik *et al.*, "Metabolic engineering of cyanobacteria for photoautotrophic production of heparosan, a pharmaceutical precursor of heparin," *Algal Research*, vol. 37, pp. 57-63, 2019/01/01/ 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.010>.
- [149] Y. Hirokawa, Y. Dempo, E. Fukusaki, and T. Hanai, "Metabolic engineering for isopropanol production by an engineered cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, under photosynthetic conditions," (in eng), *J Biosci Bioeng*, vol. 123, no. 1, pp. 39-45, Jan 2017, doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.07.005.
- [150] H. Niederholtmeyer, B. T. Wolfstädter, D. F. Savage, P. A. Silver, and J. C. Way, "Engineering cyanobacteria to synthesize and export hydrophilic products," (in eng), *Appl Environ Microbiol*, vol. 76, no. 11, pp. 3462-6, Jun 2010, doi: 10.1128/aem.00202-10.
- [151] C. J. Knoot, J. Ungerer, P. P. Wangikar, and H. B. Pakrasi, "Cyanobacteria: Promising biocatalysts for sustainable chemical production," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 293, no. 14, pp. 5044-5052, Apr 6 2018, doi: 10.1074/jbc.R117.815886.
- [152] G. Luan and X. Lu, "Tailoring cyanobacterial cell factory for improved industrial properties," (in eng), *Biotechnol Adv*, vol. 36, no. 2, pp. 430-442, Mar-Apr 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.01.005.

- [153] D. C. Ducat, J. C. Way, and P. A. Silver, "Engineering cyanobacteria to generate high-value products," (in eng), *Trends Biotechnol*, vol. 29, no. 2, pp. 95-103, Feb 2011, doi: 10.1016/j.tibtech.2010.12.003.
- [154] A. L. Markley, M. B. Begemann, R. E. Clarke, G. C. Gordon, and B. F. Pflieger, "Synthetic biology toolbox for controlling gene expression in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002," (in eng), *ACS Synth Biol*, vol. 4, no. 5, pp. 595-603, May 15 2015, doi: 10.1021/sb500260k.
- [155] S. Haserodt, M. Aytekin, and R. A. Dweik, "A comparison of the sensitivity, specificity, and molecular weight accuracy of three different commercially available Hyaluronan ELISA-like assays," (in eng), *Glycobiology*, vol. 21, no. 2, pp. 175-83, Feb 2011, doi: 10.1093/glycob/cwq145.
- [156] M. L. Fisher, R. Allen, Y. Luo, and R. Curtiss, 3rd, "Export of extracellular polysaccharides modulates adherence of the Cyanobacterium *synechocystis*," (in eng), *PLoS One*, vol. 8, no. 9, p. e74514, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0074514.
- [157] C. T. Rueden *et al.*, "ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data," *BMC Bioinformatics*, vol. 18, no. 1, p. 529, 2017/11/29 2017, doi: 10.1186/s12859-017-1934-z.
- [158] G. G. and L. T., *Bestimmung allgemeiner Wachstumsparameter* (Zell- und Gewebekultur). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2013.
- [159] G. Carpentier *et al.*, "Angiogenesis Analyzer for ImageJ — A comparative morphometric analysis of "Endothelial Tube Formation Assay" and "Fibrin Bead Assay"," *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, p. 11568, 2020/07/14 2020, doi: 10.1038/s41598-020-67289-8.
- [160] S. Hirakawa *et al.*, "Identification of Vascular Lineage-Specific Genes by Transcriptional Profiling of Isolated Blood Vascular and Lymphatic Endothelial Cells," *The American Journal of Pathology*, vol. 162, no. 2, pp. 575-586, 2003/02/01/ 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63851-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63851-5).
- [161] M. Mulisch, *Signalverstärkung* (Verfahren der Immunlokalisation Ein Überblick). Springer Spektrum; © Springer Fachmedien Wiesbaden, 2014.
- [162] A. B. E. Limited. "Versican G1-domain as HA Binding Protein." <https://www.amsbio.com/hyaluronic-acid-binding-protein/> (accessed).
- [163] B. Fuchs *et al.*, "Biocompatibility of *Synechococcus* sp. PCC 7002 with Human Dermal Cells In Vitro," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, no. 7, p. 3922, 2024.
- [164] B. Laverdet *et al.*, "Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration," (in eng), *Pathol Biol (Paris)*, vol. 62, no. 2, pp. 108-17, Apr 2014, doi: 10.1016/j.patbio.2014.01.002.
- [165] A. Baroni, E. Buommino, V. De Gregorio, E. Ruocco, V. Ruocco, and R. Wolf, "Structure and function of the epidermis related to barrier properties," (in eng), *Clin Dermatol*, vol. 30, no. 3, pp. 257-62, May-Jun 2012, doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007.
- [166] J. M. Jensen and E. Proksch, "The skin's barrier," (in eng), *G Ital Dermatol Venereol*, vol. 144, no. 6, pp. 689-700, Dec 2009.
- [167] T. L. Schenck *et al.*, "Photosynthetic biomaterials: A pathway towards autotrophic tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 15, pp. 39-47, 2015/03/15/ 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.12.012>.
- [168] P. Vance and M. H. Spalding, "Growth, photosynthesis, and gene expression in *Chlamydomonas* over a range of CO<sub>2</sub> concentrations and CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> ratios: CO<sub>2</sub> regulates multiple acclimation states," *Canadian Journal of Botany*, vol. 83, no. 7, pp. 796-809, 2005, doi: 10.1139/b05-064.

- [169] M. Ludwig and D. Bryant, "Synechococcus sp. Strain PCC 7002 Transcriptome: Acclimation to Temperature, Salinity, Oxidative Stress, and Mixotrophic Growth Conditions," (in English), *Frontiers in Microbiology*, Original Research vol. 3, no. 354, 2012-October-11 2012, doi: 10.3389/fmicb.2012.00354.
- [170] M. Shukla, R. Tabassum, R. Singh, and D. W. Dhar, "Influence of light intensity, temperature and CO<sub>2</sub> concentration on growth and lipids in green algae and cyanobacteria," (in eng), *Indian J Exp Biol*, vol. 54, no. 7, pp. 482-487, Jul 2016.
- [171] J. Werner, *Regelung der menschlichen Körpertemperatur*. De Gruyter, 2019.
- [172] G. Gethin, J. D. Ivory, D. Sezgin, H. Muller, G. O'Connor, and A. Vellinga, "What is the "normal" wound bed temperature? A scoping review and new hypothesis," (in eng), *Wound Repair Regen*, vol. 29, no. 5, pp. 843-847, Sep 2021, doi: 10.1111/wrr.12930.
- [173] Q. Xiong *et al.*, "Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the global response of *Synechococcus* to high light stress," (in eng), *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 14, no. 4, pp. 1038-1053, 2015, doi: 10.1074/mcp.M114.046003.
- [174] H. Yin *et al.*, "*Synechococcus elongatus* PCC7942 secretes extracellular vesicles to accelerate cutaneous wound healing by promoting angiogenesis," (in eng), *Theranostics*, vol. 9, no. 9, pp. 2678-2693, 2019, doi: 10.7150/thno.31884.
- [175] S. Werner, T. Krieg, and H. Smola, "Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing," (in eng), *J Invest Dermatol*, vol. 127, no. 5, pp. 998-1008, May 2007, doi: 10.1038/sj.jid.5700786.
- [176] K. M. Williams *et al.*, "Safety of photosynthetic *Synechococcus elongatus* for in vivo cyanobacteria-mammalian symbiotic therapeutics," (in eng), *Microb Biotechnol*, vol. 13, no. 6, pp. 1780-1792, Nov 2020, doi: 10.1111/1751-7915.13596.
- [177] I. Boerema, "HIGH TENSION OXYGEN THERAPY. HYPERBARIC OXYGEN," (in eng), *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, vol. 57, no. 9, pp. 817-818, 1964.
- [178] F. L. Game *et al.*, "Effectiveness of interventions to enhance healing of chronic ulcers of the foot in diabetes: a systematic review," (in eng), *Diabetes Metab Res Rev*, vol. 32 Suppl 1, pp. 154-68, Jan 2016, doi: 10.1002/dmrr.2707.
- [179] B. Hajhosseini, B. A. Kuehlmann, C. A. Bonham, K. J. Kamperman, and G. C. Gurtner, "Hyperbaric Oxygen Therapy: Descriptive Review of the Technology and Current Application in Chronic Wounds," (in eng), *Plastic and reconstructive surgery. Global open*, vol. 8, no. 9, pp. e3136-e3136, 2020, doi: 10.1097/GOX.0000000000003136.
- [180] J. P. Jeter and E. B. Wong, "Hyperbaric oxygen therapy in dermatology," (in eng), *Cutis*, vol. 105, no. 1, pp. 24-27, Jan 2020.
- [181] G. Raman, B. Kupelnick, P. Chew, and J. Lau, "AHRQ Technology Assessments," in *A Horizon Scan: Uses of Hyperbaric Oxygen Therapy*. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2006.
- [182] P. Kranke, M. H. Bennett, M. Martyn-St James, A. Schnabel, S. E. Debus, and S. Weibel, "Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds," (in eng), *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 2015, no. 6, p. Cd004123, Jun 24 2015, doi: 10.1002/14651858.CD004123.pub4.
- [183] U. Hopfner *et al.*, "Development of photosynthetic biomaterials for in vitro tissue engineering," (in eng), *Acta Biomater*, vol. 10, no. 6, pp. 2712-7, Jun 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.055.
- [184] P. A. Shiekh, A. Singh, and A. Kumar, "Oxygen-Releasing Antioxidant Cryogel Scaffolds with Sustained Oxygen Delivery for Tissue Engineering Applications," (in eng), *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 10, no. 22, pp. 18458-18469, Jun 6 2018, doi: 10.1021/acsami.8b01736.

- [185] P. Martin and R. Nunan, "Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing," (in eng), *The British journal of dermatology*, vol. 173, no. 2, pp. 370-378, 2015, doi: 10.1111/bjd.13954.
- [186] A. M. Ruffing, T. J. Jensen, and L. M. Strickland, "Genetic tools for advancement of *Synechococcus* sp. PCC 7002 as a cyanobacterial chassis," (in eng), *Microb Cell Fact*, vol. 15, no. 1, p. 190, Nov 10 2016, doi: 10.1186/s12934-016-0584-6.
- [187] M. Yu *et al.*, "The cooperative role of S1P3 with LYVE-1 in LMW-HA-induced lymphangiogenesis," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 336, no. 1, pp. 150-7, Aug 1 2015, doi: 10.1016/j.yexcr.2015.06.014.
- [188] J. Bauer *et al.*, "TGF $\beta$  counteracts LYVE-1-mediated induction of lymphangiogenesis by small hyaluronan oligosaccharides," (in eng), *J Mol Med (Berl)*, vol. 96, no. 2, pp. 199-209, Feb 2018, doi: 10.1007/s00109-017-1615-4.
- [189] B. W. Wong *et al.*, "The role of fatty acid  $\beta$ -oxidation in lymphangiogenesis," *Nature*, vol. 542, no. 7639, pp. 49-54, 2017/02/01 2017, doi: 10.1038/nature21028.
- [190] F. G. Mondalek *et al.*, "Temporal expression of hyaluronic acid and hyaluronic acid receptors in a porcine small intestinal submucosa-augmented rat bladder regeneration model," (in eng), *World J Urol*, vol. 33, no. 8, pp. 1119-28, Aug 2015, doi: 10.1007/s00345-014-1403-5.
- [191] L. L. Kong *et al.*, "The optimum marker for the detection of lymphatic vessels," (in eng), *Mol Clin Oncol*, vol. 7, no. 4, pp. 515-520, Oct 2017, doi: 10.3892/mco.2017.1356.
- [192] C. Tacconi *et al.*, "Activation of the VEGFC/VEGFR3 Pathway Induces Tumor Immune Escape in Colorectal Cancer," (in eng), *Cancer Res*, vol. 79, no. 16, pp. 4196-4210, Aug 15 2019, doi: 10.1158/0008-5472.Can-18-3657.
- [193] Y. J. Jung *et al.*, "Hyaluronan-induced VEGF-C promotes fibrosis-induced lymphangiogenesis via Toll-like receptor 4-dependent signal pathway," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 466, no. 3, pp. 339-45, Oct 23 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.023.
- [194] H. Y. Lim *et al.*, "Hyaluronan Receptor LYVE-1-Expressing Macrophages Maintain Arterial Tone through Hyaluronan-Mediated Regulation of Smooth Muscle Cell Collagen," (in eng), *Immunity*, vol. 49, no. 2, pp. 326-341.e7, Aug 21 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.06.008.
- [195] G. Carpentier. "Angiogenesis Analyzer for ImageJ." <http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ> (en&artpage=3-6 (accessed 1 März, 2020).
- [196] U. S. D. o. H. a. H. Resources. "Premarket Approval (PMA)." U.S. Food and Drug Administration. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma.cfm?id=P900033S042> (accessed).
- [197] U. Hopfner *et al.*, "Fibrin Glue Enhances Adipose-Derived Stromal Cell Cytokine Secretion and Survival Conferring Accelerated Diabetic Wound Healing," (in eng), *Stem cells international*, vol. 2018, pp. 1353085-1353085, 2018, doi: 10.1155/2018/1353085.
- [198] D. J. Lea-Smith *et al.*, "Hydrocarbons Are Essential for Optimal Cell Size, Division, and Growth of Cyanobacteria," (in eng), *Plant physiology*, vol. 172, no. 3, pp. 1928-1940, 2016, doi: 10.1104/pp.16.01205.
- [199] J. D. Rochaix, "Chlamydomonas reinhardtii," in *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, S. Maloy and K. Hughes Eds. San Diego: Academic Press, 2013, pp. 521-524.
- [200] M. N. Chávez, N. Moellhoff, T. L. Schenck, J. T. Egaña, and J. Nickelsen, "Photosymbiosis for Biomedical Applications," (in eng), *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 8, pp. 577204-577204, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.577204.

- [201] W. Gahlen and N. Klüken, "Über Variation, Norm und Labilität der Hauttemperatur," *Klinische Wochenschrift*, vol. 31, no. 31, pp. 754-758, 1953/08/01 1953, doi: 10.1007/BF01682788.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gesundheitsökonomische Analyse; Verteilung der Indikationen bei chronischen Wunden (Quelle: [50] - teilweise modifiziert).....	8
Abbildung 2: Kostenverteilung in der Versorgung chronischer Wunden nach Kosten-gruppen (Quelle: [50] - teilweise modifiziert). ....	10
Abbildung 3: Aufbau und Eigenschaften des Rezeptors LYVE-1 (Quelle: [127] - teilweise modifiziert mit Biorender) .....	17
Abbildung 4: Schematische HA-Produktion in Syn7002 (Quelle: [206, 208] - teilweise modifiziert mit Biorender) .....	22
Abbildung 5: Indirekte Kokultivierung.....	44
Abbildung 6: Übersicht des Arbeitsablaufes zur Herstellung konditionierter Medien und Kokulturen .....	46
Abbildung 7: Tube-Formation-Assay mit bioaktivierten Scaffolds.....	50
Abbildung 8: Analyseparameter ImageJ Angiogenesis Analyzer-Software .....	51
Abbildung 9: Streptavidin-Biotin-HRP-Komplex – Quelle: [226], [227] teilweise modifiziert. .	58
Abbildung 10: Adaptation von Cyanobakterien Syn 7002 an humane Zellkulturbedingungen .....	62
Abbildung 11: Nachweis der Biokompatibilität von 3T3 Fibroblasten mit Syn 7002 .....	65
Abbildung 12: Nachweis der Biokompatibilität von HaCaT Keratinozyten mit Syn 7002 .....	67
Abbildung 13: Nachweis der Biokompatibilität von LEC mit Syn HA.....	68
Abbildung 14: Nachweis einer Verbesserung der Zellvitalität von LEC durch Kokultivierung mit Syn 7002 unter Hypoxie .....	70
Abbildung 15: Verbesserung der Zellvitalität von HaCaT und 3T3 durch Kokultivierung mit Syn 7002 unter Hypoxie .....	71
Abbildung 16: Nachweis der Hyaluronsäureproduktion von SynHA und Bestimmung der relativen mRNA Expression der LEC nach Stimulation.....	73
Abbildung 17: Immunhistologischer Nachweis der Genexpression von LYVE-1 und VEGFR-3 auf LEC-Oberfläche.....	74
Abbildung 18: Verbesserung der Zellvitalität von LEC durch Stimulation mit SynHA .....	75
Abbildung 19: Stimulierender Effekt der Hyaluronsäure von SynHA auf die Lymphangiogenese in vitro.....	76
Abbildung 20: Reorganisation der F-Aktin-Filamente im Zytoskelett von LEC.....	77
Abbildung 21: Nachweis der Biokompatibilität von SynHA und dermalen Hautersatzmaterialien .....	79
Abbildung 22: Nachweis der Hyaluronsäureproduktion von Syn7002 in dermale Hautersatzmaterialien mit anschließender Sekretion in die Umgebung .....	81
Abbildung 23: Bioaktivierte Scaffolds stimulieren Lymphangiogenese in vitro .....	82
Abbildung 24: Schematische Darstellung der <i>in vivo</i> Applikation des SynHA(+)-Scaffolds ...	94

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Transgene Bakterienstämme von <i>Synechococcus sp. PCC 7002</i> ; adaptiert von [202] .....	24
Tabelle 2: Medien .....	25
Tabelle 3: Lösungen und Puffer .....	26
Tabelle 4: Reagenzien .....	29
Tabelle 5: Kits und Assays .....	30
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.....	32
Tabelle 7: Geräte.....	34
Tabelle 8: Zelllinien .....	40
Tabelle 9: Master-Mix cDNA-Synthese .....	53
Tabelle 10: Primer Sequenzen (5'-3').....	54
Tabelle 11: SYBER-GREEN Standard Mastermix RT-qPCR.....	54

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleinsäure)
ECBM	Endothelial Cell Basal Medium
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Engl.	Englisch
et al. et alii	(und andere)
EtOH	Ethylalkohol
EZM	Extrazellulär Matrix
FBS	Fetal Bovine Serum
HA	Hyaluronic acid (Hyaluronsäure)
HABP	hyaluronic acid binding protein (Hyaluronsäure Bindungsprotein)
HaCaT	Human adult low calcium high temperature keratinocytes
HCL	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible-factor-1 $\alpha$
HRE	hypoxia response element

HRP	Horseradish Peroxidase
HRPT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LDH	Laktatdehydrogenase
LEC	Lymphendothelial cell
LED	light-emitting diode (Leuchtdiode)
LYVE-1	lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NC	Negative Control (Negativkontrolle)
ns	nicht signifikant
Oligo-(dT)	Oligo- Deoxythymidine
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
TAP	Tris-Acetate-Phosphate
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-buffered saline (Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TE	Tris-EDTA

TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
TNS	Trypsin Neutralization Solution (Trypsin Neutralisationslösung)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation hätte ohne fachliche, kollegiale und freundschaftliche Unterstützung nicht in diesem Maße umgesetzt werden können.

Aus diesem Grund möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Dr. med. Thilo Schenck und meinem Betreuer Dr. med. Nicholas Möllhoff für die herausragende Zusammenarbeit, die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und Geduld bedanken.

Besonderer Dank gilt auch den wissenschaftlichen Mitarbeitern Dr. Myra Noemi Chavez Rosas und Alexandra Birt für die stets fachlichen Hilfestellungen. Durch die positive und motivierende Atmosphäre während der engen Zusammenarbeit ist eine wahre Freundschaft entstanden.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. med. Giunta, der mir diese Dissertation in dem Forschungslabor für Hand- und Plastische Chirurgie ermöglicht hat.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie ein großes Dankeschön aussprechen, auf deren Rat ich mich immer verlassen konnte und die mir immer zur Seite standen.

## Affidavit

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Bioaktivierung von Hautersatzmaterial zur Verbesserung der Lymphangiogenese“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München 29.04.2024

Benedikt Fuchs

